



UNIVERSIDADE FEDERAL DE RORAIMA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA - POSAGRO

MORIELI LADISLAU DE OLIVEIRA

BACTÉRIAS NATIVAS DE RORAIMA NO CONTROLE DA QUEIMA-DAS-
BAINHAS NA CULTURA DO ARROZ E ATRIBUTOS DE PROMOÇÃO DE
CRESCIMENTO DE PLANTAS

BOA VISTA - RR

2018

MORIELI LADISLAU DE OLIVEIRA

BACTÉRIAS NATIVAS DE RORAIMA NO CONTROLE DA QUEIMA-DAS-BAINHAS NA CULTURA DO ARROZ E ATRIBUTOS DE PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE PLANTAS

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Agronomia, área de concentração em produção vegetal, da Universidade Federal de Roraima, em parceria com a Embrapa Roraima, para a obtenção do título de Mestre em Agronomia.

Orientador: Dr. Daniel Augusto Schurt.

Coorientadora: Dr^a. Hyanameyka Evangelista de Lima Primo.

BOA VISTA - RR

2018

MORIELI LADISLAU DE OLIVEIRA

BACTÉRIAS NATIVAS DE RORAIMA NO CONTROLE DA QUEIMA-DAS-
BAINHAS NA CULTURA DO ARROZ E ATRIBUTOS DE PROMOÇÃO DE
CRESCIMENTO DE PLANTAS

Dissertação apresentada ao programa de pós-
graduação em Agronomia da Universidade
Federal de Roraima, em parceria com a
Embrapa Roraima, como pré-requisito para a
obtenção do título de Mestre em Agronomia,
Área de Concentração: Produção Vegetal.

Dr. Daniel Augusto Schurt
Orientador - Embrapa Roraima

Dr.^a Hyanameyka Evangelista de Lima Primo
Coorientadora - Embrapa Roraima

Dr. Bernardo de Almeida Halfeld Vieira
Embrapa Meio Ambiente

Dr. Alessandro Antônio Fortunato
UFRR

Dr.^a Kedma da Silva Matos
UFRR

Dados Internacionais de Catalogação na publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal de Roraima

O48b Oliveira, Morieli Ladislau de.

Bactérias nativas de Roraima no controle da queima-das-bainhas na cultura do arroz e atributos de promoção de crescimento de plantas / Morieli Ladislau de Oliveira, 2018.

63 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Augusto Schurt.

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Universidade Federal de Roraima.

1 – Agricultura. 2 – Cultivo de arroz. 3 – Controle biológico. 4 – Roraima. I – Título. II – Schurt, Daniel Augusto (orientador).

CDU – 633.18(811.4)

Bibliotecária responsável: Keyla Rebouças Soares – CRB 11/721 - AM

DEDICATÓRIA

*À Deus, pela oportunidade de realizar mais um sonho
e ter me ajudado a superar todas as dificuldades
que surgiram ao longo de toda esta caminhada.*

À minha família: avó, mãe, irmãos e sobrinha.

Aos amigos pelo apoio nos momentos difíceis.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida, e por estar sempre ao meu lado em todos os momentos da minha vida.

À minha avó Maria Ana, por todo apoio incondicional, amor, educação e por ser meu exemplo de vida.

À minha mãe Ruth Lene, pelo carinho e incentivo nos meus estudos.

Aos meus irmãos, Wallace e o Wesley e minha querida sobrinha e afilhada Rhianna.

À todos os meus familiares, em especial ao Tio Paulo por todo incentivo.

Ao Pesquisador Dr. Daniel Augusto Schurt, pela excelente orientação, paciência, dedicação, confiança e amizade.

Aos amigos da turma de mestrado: Ariel Moura, Marcelo Ribeiro, Leonardo Lima, Luis Sánchez, Miguel Hernandez e Williams Matos, pelo companheirismo e amizade durante esses dois anos.

Às grandes amigas que levarei no coração para onde for, em especial às “bonitonas” Rosianne Barbosa, Maria Xavier e Gabriela Pelzer. Obrigada por toda ajuda, companhia, preocupação e todas as risadas.

À minha amiga Gabriela Pelzer “Gabi” pela valiosa amizade, por toda contribuição neste trabalho, troca de conhecimento e por toda ajuda prestada, muito obrigada por tudo.

Ao meu amigo José Darlon, pela amizade e incentivo nos estudos.

Ao técnico de Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Roraima, Giovanni Souza e aos estagiários: Victor Castro, Taise Pereira, Jéssica Seixas, Lucas Feitosa e Thayná Albuquerque pela amizade e apoio na execução deste trabalho.

Às amigas Andreza Verônica e Renata Pio, que ganhei durante o período do mestrado.

À dona Edileusa e família, por todo acolhimento em sua residência, ajuda e incentivo durante esses dois anos.

Aos docentes da POSAGRO, pelos ensinamentos concebidos.

Ao Programa de Pós-Graduação - Produção Vegetal da Universidade Federal de Roraima pela oportunidade de realização deste curso.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudo.

À Embrapa Roraima pela concessão da estrutura e materiais que possibilitaram a execução dos experimentos.

À todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram na elaboração deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

BIOGRAFIA

MORIELI LADISLAU DE OLIVEIRA, filha de Ruth Lene Ladislau de Oliveira e Douglismar Viana de Oliveira, nasceu em 17 de Julho de 1989 na cidade de Castanhal, Pará. Concluiu o ensino médio na Escola Estadual Cônego Leitão no ano de 2006. Concluiu o curso Técnico em Agropecuária, pela Escola Agrotécnica Federal de Castanhal em 2008. Ingressou no Curso de Agronomia em 2010 pela Universidade Federal Rural da Amazônia e o concluiu em 2015. Em março de 2016, iniciou o Mestrado em Agronomia, do Programa de Pós-Graduação, área de concentração Produção Vegetal e área de atuação Fitopatologia, da Universidade Federal de Roraima-UFRR.

*"Nenhuma mente que se abre para uma nova
idéia voltará a ter o tamanho original"*

(Albert Einstein)

OLIVEIRA, Morieli Ladislau de. **Bactérias nativas de Roraima no controle da queima-das-bainhas na cultura do arroz e atributos de promoção de crescimento de plantas.** 2018. 63 p., Dissertação de Mestrado em Agronomia - Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, 2018.

RESUMO

Objetivou-se com este trabalho selecionar isolados de bactérias da rizosfera, do filoplano e de sementes de plantas de arroz capazes de reduzir a incidência da queima-das-bainhas que tem como agente causal o fungo *Rhizoctonia solani*, e estudar os mecanismos de ação envolvidos no controle biológico e na promoção de crescimento de plantas. A primeira etapa de seleção baseou-se em testes *in vitro* com 414 isolados bacterianos obtidos de plantas de arroz saudáveis coletadas em áreas de cultivos localizadas no estado de Roraima, sendo 67 provenientes da rizosfera, 277 do filoplano e 70 de sementes. Destes, somente 10 isolados bacterianos (325, 326, 327, 329, 224, 225, 226, 388, 205 e 338) foram capazes de reduzir o crescimento micelial de *R. solani*. Posteriormente, as 10 bactérias selecionadas foram testadas em casa-de-vegetação no controle da queima-das-bainhas, através da realização de dois experimentos inteiramente ao acaso, que constaram de: microbiolização de sementes de arroz cv. IRGA-424 com suspensão dos 10 isolados bacterianos contra *Rhizoctonia solani* e o efeito da pulverização foliar no controle da queima-das-bainhas em arroz. Após cada ensaio verificou-se que nenhum dos isolados bacterianos foram capazes de reduzir a incidência da doença por meio do tratamento de sementes. Entretanto, os isolados 327 e 329, procedentes do filoplano de plantas de arroz, foram selecionados devido apresentarem reduções significativas no progresso da queima-das-bainhas quando aplicados via foliar, obtendo uma eficiência de 75% e 54%, respectivamente. Na segunda etapa de seleção realizada *in vitro*, os 10 isolados bacterianos selecionados foram submetidos a bioensaios para verificação da produção de quitinase, compostos voláteis, sideróforos, capacidade de solubilização de fosfato e produção de ácido indol acético. Os resultados demonstraram que a produção de compostos voláteis e a produção de sideróforos são fatores que podem estar relacionados com o biocontrole do *R. solani* pelas bactérias. Enquanto aos mecanismos de promoção de crescimento de plantas, somente o isolado 205 foi eficiente mostrando resultados positivos na solubilização de fosfato, e a produção de auxina foi observada por todos os isolados bacterianos.

Palavras-chave: Auxina. Controle biológico. Queima-das-bainhas. *Oryza sativa*. Sideróforos.

OLIVEIRA, Morieli Ladislau de. **Native bacteria of Roraima in the control of the burning of the sheaths in the rice crop and attributes of promotion of plant growth.** 2018. 63 p., M. S. Dissertation in agronomy - Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, 2018.

ABSTRACT

The objective of this work was to select isolates of rhizosphere, phylloplane and rice plant seeds that are able to reduce the incidence of flue-burning with *Rhizoctonia solani* as the causal agent and to study the mechanisms of action involved in biological control and in the promotion of plant growth. The first selection phase was based on *in vitro* tests with 414 bacterial isolates obtained from healthy rice plants collected in crop areas located in the state of Roraima, 67 from rhizosphere, 277 from phylloplane and 70 from seeds. Of these, only 10 bacterial isolates (325, 326, 327, 329, 224, 225, 226, 388, 205 and 338) were able to reduce *R. solani* mycelial growth. Subsequently, the 10 selected bacteria were tested in the greenhouse in the control of the burning of the sheaths, from the accomplishment of two entirely random experiments, which consisted of: microbiolization of rice seeds cv. IRGA-424 with suspension of the 10 bacterial isolates against *Rhizoctonia solani* and the effect of foliar spraying on the control of the burning of the sheaths in rice. After each test it was found that none of the bacterial isolates were able to reduce the incidence of the disease by seed treatment. However, isolates 327 and 329, from the phylloplane of rice plants, were selected because they showed significant reductions in the progress of the flax-burning when applied through the leaf, obtaining an efficiency of 75% and 54%, respectively. In the second step of the *in vitro* selection, the 10 selected bacterial isolates were submitted to bioassays to verify the production of chitinase, volatile compounds, siderophores, phosphate solubilization capacity and indole acetic acid production. The results demonstrated that the production of volatile compounds and the production of siderophores are factors that can be related to the biocontrol of the *R. solani* by the bacteria. As for the mechanisms of plant growth promotion, only the isolate 205 showed positive results in phosphate solubilization, and auxin production was observed all bacterial isolates.

Keywords: Auxin. Biological control. Burn the Sheaths. *Oryza sativa*. Siderophores.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 - Isolado de *Rhizoctonia solani* AG1 – IA cultivado em meio de cultura BDA (à esquerda); sintomas de queima-das-bainhas em plantas de arroz (cultivar IRGA-424) inoculadas com *Rhizoctonia solani* AG1 – IA (à direita)..... 26
- FIGURA 2 - Teste de antibiose *in vitro* em meio de cultura BDA confirmando o efeito da inibição do crescimento micelial de *Rhizoctonia solani* pelo isolado bacteriano associado a plantas de arroz (à esquerda); crescimento micelial de *Rhizoctonia solani* sem a presença de bactérias (à direita)..... 30
- FIGURA 3 - Área abaixo da curva do progresso do comprimento relativo da lesão (AACPCRL) da queima-das-bainhas em plantas de arroz pulverizadas com suspensões dos dez melhores isolados de bactérias (Tratamentos: 327, 329, 226, 388, 205, 338, 325, 225, 326 e 224) aplicados 24 horas antes da inoculação do *Rhizoctonia solani*. As plantas testemunhas foram pulverizadas com água. Médias seguidas por mesma letra entre as colunas não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a ao nível de 5% de probabilidade. 32
- FIGURA 4 - Produção de compostos voláteis de diferentes isolados de bactérias em relação à taxa de crescimento micelial de *Rhizoctonia solani*. Os tratamentos foram: *R. solani* (testemunha), isolado de bactéria: 205, 338, 326, 388, 327, 224, 226, 225, 325 e 329. Médias seguidas de mesma letra entre as colunas não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% probabilidade 43
- FIGURA 5 - Microtubos contendo meio B de King líquido, mostrando a produção de sideróforos pelos isolados bacterianos: 326, 327, 226, 225, 338, 329, 205, 224, 325 e 388. Os microtubos com a coloração verde correspondem ao meio suplementado com ferro e os de coloração amarela-alaranjada ao meio sem suplementação de ferro..... 44
- FIGURA 6 - Produção de ácido indol acético ($\mu\text{g mL}^{-1}$) por isolados bacterianos associados a plantas de arroz..... 45
- FIGURA 7 - Halo de solubilização de fosfato produzido pelo isolado bacteriano 205 46
- FIGURA 8 - Colonização de raízes de plantas de arroz. As setas vermelhas indicam a colonização da raiz pelo isolado bacteriano 329 47

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Efeitos de bactérias associadas a plantas de arroz selecionadas para o controle da queima-das-bainhas, na taxa de crescimento micelial (mm.dia^{-1}) de <i>Rhizoctonia solani</i> em testes <i>in vitro</i>	30
TABELA 2 - Incidência da queima-das-bainhas em plantas de arroz originadas de sementes microbiolizadas com bactérias selecionadas, aos (7, 10 e 14 dias) após a inoculação do patógeno.....	31
TABELA 3 - Avaliação de mecanismos de ação de bactérias isoladas de plantas de arroz	42
TABELA 4 - Efeito das bactérias isoladas de plantas de arroz selecionadas para o controle da queima-das-bainhas, causada por <i>Rhizoctonia solani</i> , na colonização e comprimento da raiz de plântulas de arroz em meio agar-água	48

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	13
2 REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1 CULTURA DO ARROZ.....	15
2.2 <i>Rhizoctonia solani</i> KÜHN.....	15
2.3 QUEIMA-DAS-BAINHAS.....	16
2.4 RIZOBACTÉRIAS.....	17
2.5 BACTÉRIAS DO FILOPLANO.....	18
2.6 MECANISMOS DE AÇÃO DAS BACTÉRIAS.....	19
2.6.1 Antibiose.....	19
2.6.2 Competição.....	20
2.6.3 Indução de resistência.....	21
3 CAPÍTULO 1: SELEÇÃO MASSAL DE ISOLADOS BACTERIANOS DE PLANTAS DE ARROZ VISANDO O BIOCONTROLE DA QUEIMA-DAS-BAINHAS.....	22
3.1 RESUMO	22
3.2 ABSTRACT	23
3.3 INTRODUÇÃO.....	24
3.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	26
3.4.1 Coletas de Plantas de Arroz.....	27
3.4.2 Isolamento das Rizobactérias e Bactérias do Filoplano	27
3.4.3 Teste de Antibiose	27
3.4.4 Seleção Massal das Bactérias com Capacidade de Biocontrole <i>in vivo</i>	28
3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
3.6 CONCLUSÕES.....	35
4 CAPÍTULO 2: MECANISMOS DE BIOCONTROLE DE <i>Rhizoctonia solani</i> E ATRIBUTOS DE PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE PLANTAS MEDIADOS POR BACTÉRIAS	36
4.1 RESUMO	36
4.2 ABSTRACT	37
4.3 INTRODUÇÃO.....	38
4.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	39
4.4.1 Produção de β 1,3-glucanase.....	39
4.4.2 Produção de Quitinase.....	39
4.4.3 Produção de Compostos Voláteis.....	39

4.4.4 Produção de Sideróforos.....	40
4.4.5 Capacidade de Solubilização de Fosfato	40
4.4.6 Produção de Ácido Indol Acético (AIA).....	40
4.4.7 Capacidade de Colonização de Raízes <i>in vitro</i>	41
4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4.6 CONCLUSÕES	49
REFERÊNCIAS...	50

1 INTRODUÇÃO GERAL

O arroz (*Oryza sativa* L.) é o cereal mais cultivado no mundo, e se destaca como uma cultura de grande importância social e econômica (BORTOLOTTO et al., 2008; YANG et al. 2009; LI et al. 2011a, b). Além disso, apresenta uma rica composição nutricional, e constitui uma fonte de energia para grande parte da população do mundo (NAVES; BASSINELLO, 2006).

A cultura do arroz, durante todo o seu desenvolvimento, é acometida por inúmeras doenças, sobretudo as fúngicas, que reduzem sua produtividade e afetam a qualidade dos grãos (PRABHU et al., 2006). A queima-das-bainhas é uma das principais doenças fúngicas destrutivas do arroz em várias regiões do mundo (LI et al., 2011a).

A doença é causada pelo fungo *Rhizoctonia solani* Kühn, que sobrevive saprofiticamente no solo e que provoca perdas severas em diversas culturas de importância econômica como o arroz, o milho, a soja, o feijão e entre outras (LEWIS; LUMSDEN, 2001; FALTIN et al., 2004; PADASHT-DEHKAEI et al., 2013). A ocorrência da doença em cultivares de arroz provoca danos relevantes como a queima-das-bainhas e colmos, caracterizadas por manchas circulares, com bordas marrons bem acentuadas nos tecidos afetados (OU, 1985). Nos casos mais severos, observa-se manchas semelhantes nas folhas inferiores resultando em seca parcial ou total, e improdutividade de espiguetas, causando a morte da planta (WANG et al., 2015).

No Brasil, segundo Filippi et al. (2004), a doença tem provocado grandes prejuízos na produção em áreas de arroz irrigado. Na região norte, os cultivos de arroz têm sofrido radicalmente com a incidência dessa doença (PRABHU et al., 2002).

A queima-das-bainhas é uma doença de difícil controle, visto que o patógeno produz escleródios que favorecem a sua sobrevivência em condições ambientais adversas e também por dispor de uma grande quantidade de hospedeiros (FALTIN et al., 2004). Práticas culturais durante o cultivo asseguram o manejo da doença e são mecanismos de grande relevância que devem ser levados em consideração para garantir o melhor desempenho da cultura, como destruir restos culturais, drenar as áreas durante a entressafra e a rotação de culturas.

Segundo Nagarajkumar et al. (2004), o controle químico não é inviável, pois apresenta difícil execução e elevado custo. Além disso, pode ocasionar a contaminação do solo e induzir o aparecimento de microrganismos resistentes ao patógeno. Todavia, por outro lado, certos fungicidas apresentam eficiência quando são utilizados para reduzir os danos da doença, mas

não é considerado uma solução a longo prazo em virtude das preocupações com a saúde e os riscos com o meio ambiente (LI et al., 2011a ; BOUKAEW et al., 2013).

Portanto, levando em consideração o custo de produção, a sustentabilidade, a segurança ambiental e a qualidade final dos grãos de arroz, torna-se crucial a busca por outros métodos para o manejo da queima-das-bainhas, sendo o controle biológico uma alternativa promissora para o controle da doença (PENG et al., 2014). Desta forma, a utilização de antagonistas para o controle de fitopatógenos tem se intensificado nos últimos anos, em função de vários motivos, principalmente pelos problemas de saúde humana decorrentes do uso indiscriminado de agrotóxicos (GRIGOLETTI JÚNIOR et al., 2000; PERES et al., 2007).

Bactérias saprófitas da rizosfera, denominadas rizobactérias, vêm apresentando grande potencial na redução de fitopatógenos do solo, demonstrando da mesma forma avanços relevantes na produção agrícola, pelo aumento na promoção de crescimento vegetal (PII et al., 2015). Essas bactérias do solo que colonizam as raízes das plantas são antagonistas podendo atuar diretamente no desenvolvimento de plantas. Além disso, esses microrganismos atuam indiretamente na supressão de doenças, utilizando vários mecanismos com intuito de proporcionar a eliminação específica de agentes patogênicos, tais como a antibiose, a competição pelo substrato e para a indução da resistência sistêmica e induzida (KOKALIS-BURELLE et al., 2006; LUGTENBERG; KAMILOVA, 2009; PII et al., 2015).

Desse modo, diante da importância que a queima-das-bainhas representa para a cultura do arroz no Brasil, torna-se relevante conhecer o efeito do controle biológico de isolados bacterianos, oriundos da região Amazônica sobre esta doença. Sendo assim, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de selecionar bactérias antagonistas capazes de controlar a incidência da queima-das-bainhas no arroz, bem como elucidar quais mecanismos estão envolvidos na atividade antifúngica e na promoção de crescimento de plantas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Cultura do arroz

O arroz (*Oryza sativa* L.) é uma das fontes alimentícias mais importantes para metade da população mundial, sendo cultivado e consumido em todos os continentes.

No Brasil, o arroz é cultivado em todos os Estados Brasileiros, sendo as regiões Centro-Oeste e Sul as principais produtoras (FERREIRA; VILLAR, 2004), ocupando aproximadamente 1.980 mil hectares (CONAB, 2018). A produção nacional está em torno de 12.327 mil toneladas, com produtividade de aproximadamente 6.223 kg/ha⁻¹ na safra de 2016/2017. O estado de Roraima apresenta uma produtividade média de 7.077 kg/ha⁻¹. O arroz é elencado como a principal cultura agrícola do Estado com aproximadamente 12.000 ha de área plantada (CONAB, 2018).

A cultura do arroz, assim como todas as demais, é acometida por diversos fatores limitantes tais como o surgimento de doenças, que ocasionam a redução do potencial produtivo dos cultivos. Os fungos são os principais causadores de doenças (PRABHU et al., 2006), destacando-se o fungo *Rhizoctonia solani* Kühn, agente causal da queima-das-bainhas no arroz (SOUZA JÚNIOR et al., 2010).

2.2 *Rhizoctonia solani* Kühn

O *Rhizoctonia solani* Kühn é um patógeno habitante do solo pertence ao Filo Basidiomycota, que se encontra amplamente distribuído no mundo todo e ataca diversas culturas economicamente importantes, tais como arroz, soja, tomate, feijão e entre outras (GONZÁLEZ-GARCIA et al., 2006; SPURLOCK et al., 2016). Possui micélio bem desenvolvido e septado que se subdivide em ângulo de 45° a 90° graus (BEDENDO; PRABHU, 2005).

Entre as condições favoráveis para o fungo, destacam-se os altos teores de matéria orgânica, nitrogênio e fósforo, bem como a elevada umidade e temperaturas em torno de 28 °C (BEDENDO; PRABHU, 2005).

As infecções do fungo *R. solani* podem ocorrer tanto via sementes como através de substratos contaminado. O fungo produz uma estrutura de resistência, chamada escleródios, que apresenta forma globosa, com diâmetro em torno de 5 mm, e com coloração marrom claro a escura (OU, 1985; PRABHU et al., 2006).

2.3 Queima-das-bainhas

A queima-das-bainhas é uma doença fúngica que pode ocorrer tanto em áreas temperadas como em áreas tropicais (EIZENGA et al., 2002). Diversos fatores são responsáveis pela sua ocorrência e severidade, destacando-se entre eles o uso excessivo de adubação nitrogenada, a elevada densidade das plantas, e a utilização de cultivares de ciclo precoce, de baixa estatura, com alto índice de perfilhamento e maior suscetibilidade (SOUZA JÚNIOR et al., 2010).

O *R. solani*, agente causal da queima-das-bainhas causa modificações no equilíbrio de síntese e a decomposição de pigmentos de clorofila nas folhas e nas taxas de fotossíntese, diminuindo também o comprimento da panícula, e o número de espiguetas vazias aumenta aproximadamente 12% (ARAÚJO; ARAÚJO, 2006). Para a cultura, os períodos mais críticos são observados quando as plantas atingem os estágios entre o perfilhamento e a floração (GROTH et al., 1990).

Os sintomas iniciam nas plantas quando os escleródios germinam e o micélio forma várias almofadas de infecções na superfície delas (DATH, 1990), ocasionando lesões circulares e/ou arredondadas de coloração acinzentada, com bordas marrom-escuras (OU, 1985). Quando essas lesões se encontram desenvolvidas, originam a seca parcial ou total das bainhas e das folhas, o acamamento das folhas, maior quantidade de glumas vazias e a diminuição de perfilhos (RUSH; LEE, 1992). Estas estruturas consistem em diferenciações das hifas que sobrevivem no solo e são dispersas por meio da água de irrigação (RABINDRAN; VIDHYASEKARAN, 1996). Os escleródios do fungo *R. solani* sobrevivem no solo por aproximadamente dois anos. Eles se multiplicam, e ao longo do tempo, flutuam na água e se aglomeram em torno da planta, originando as infecções iniciais nos colmos, distribuindo-se ligeiramente, por meio das infecções por hifas, para as partes superiores, as folhas e bainhas (ALONÇO et al., 2006).

Atualmente, o uso de fungicidas tem sido a principal medida de controle da queima-das-bainhas, principalmente pelo fato das cultivares de arroz irrigado disponíveis aos produtores serem suscetíveis a doença (LI et al., 1995). Diante das preocupações com o meio ambiente, segurança dos aplicadores de defensivos, saúde pública e custo de aplicação, faz-se necessário encontrar métodos alternativos para o controle dessa doença.

Tendo em vista que o agente causal da queima-das-bainhas é um patógeno de solo/foliar e as medidas convencionais de controle são limitadas, a densidade de inóculo é crucial para o desenvolvimento da doença. Desse modo, sugere-se a prática do controle biológico, que visa diminuir a densidade de inóculo ou das atividades determinantes da doença provocada por um

patógeno, podendo ser realizada através de um ou mais organismos que não o homem (COOK; BAKER, 1983).

Nos últimos anos tem se intensificado as pesquisas sobre a utilização de microrganismos antagonistas para o controle de patógenos (PERES et al., 2007). Dentre os microrganismos estudados destacam-se as bactérias saprófitas da rizosfera, denominadas de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (KLOEPPER et al., 1989). Estas apresentam grande potencial na redução de fitopatógenos habitantes do solo, atuando como indutores de resistência da planta (OOSTENDORP; SIKORA, 1990) e produzir enzimas e metabólitos antifúngicos (LIAN et al., 2007).

2.4 Rizobactérias

As rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCP) são microrganismos que habitam as raízes das plantas de forma competitiva, podendo promover o crescimento das plantas, sendo conhecidas também por demonstrarem competência no controle de organismos deletérios presentes no solo na região da rizosfera (JI et al., 2014). Além disso, essas bactérias utilizam diversos mecanismos específicos para promover a supressão de patógenos, como a antibiose e competição por espaço e nutriente (KOKALIS-BURELLE et al., 2006).

Sendo assim, pesquisas envolvendo especificamente essas bactérias vêm sendo realizadas com a finalidade de demonstrar as interações entre antagonista-patógeno-hospedeiro (HALFELD-VIEIRA et al., 2006; RYAN et al., 2008), com o intuito de compreender aspectos de sua ecologia e os mecanismos de ação que integram essas interações.

As principais RPCP são encontradas entre as *Pseudomonas* spp.e gêneros correlatos, espécies de *Bacillus*, *Streptomyces*, *Rhizobium*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Burkholderia* e *Serratia* (SAHARAN; NEHRA, 2011).

Os efeitos benéficos exercidos pelas rizobactérias podem ser conseguidos de forma direta, sendo comumente utilizadas como inoculantes, melhorando e estimulando o crescimento da planta e a produção de culturas agrícolas, oferecendo também uma maneira de substituir fertilizantes químicos e pesticidas (STEFAN et al., 2008; ASHRAFUZZAMAN et al., 2009; SAHARAN; NEHRA, 2011) principalmente na ausência dos microrganismos patogênicos, ou de forma indireta, através da proteção microbiológica (ZAGO, 2000).

A promoção direta de crescimento das plantas através das rizobactérias ocorre por meio da produção de fitoreguladores de crescimento, tolerância ao estresse abiótico nas

plantas, fixação de nutrientes para fácil absorção por planta como a solubilização de fosfatos e fixação do nitrogênio (CHOUDHARY et al., 2011; GARCÍA-FRAILE et al., 2015). A promoção indireta de crescimento ocorre quando as rizobactérias atuam como agentes de controle biológico através da produção de compostos inibitórios, competição por espaço, Fe^{+3} e outros nutrientes, parasitismo, indução de resistência e a produção de enzimas como ACC-desaminase, quitinase e glucanase para prevenção de doenças de plantas (MARIANO et al., 2004). Apesar dessa divisão, o agente de controle biológico pode atuar através por mais de um mecanismo de interações, aumentando assim suas chances de sucesso (BETTIOL, 1991).

O uso de biocontroladores, principalmente espécies de *Bacillus* e *Pseudomonas*, é citado para o controle da queima-das-bainhas (NANDAKUMAR et al., 2001; WIWATTANAPATAPEE et al., 2004). Espécies de *Bacillus* foram largamente estudadas para o controle da queima-da-bainha por apresentar a capacidade de produzir antibióticos e endósporos garantindo a permanência do produto (WIWATTANAPATAPEE et al., 2004; KARTHIBA et al., 2010).

2.5 Bactérias do Filoplano

As bactérias do filoplano foram definidas como populações que podem sobreviver e se multiplicar na superfície das plantas (HIRANO et al., 1982). No entanto, a região da filosfera é um habitat com características particulares, em razão das variações intermitentes de umidade, temperatura, incidência da radiação, ventilação, composição e quantidade de nutrientes disponíveis (ANDREWS, 1992).

Um dos principais problemas em relação ao uso bactérias residentes do filoplano para o controle biológico de fitopatógenos provém da baixa capacidade de sobreviver e manter a população em alta densidade. Assim, essas bactérias desenvolvem estratégias que permitem a sua sobrevivência em ambientes de estresse: tolerância e escape. A primeira está voltada para a capacidade de tolerar condições como a incidência da radiação ultravioleta e baixa umidade e a segunda, considera a habilidade da bactéria em explorar sítios que ofereçam um ambiente menos sujeito a estresses ambientais (ANDREWS; HIRANO, 1991; BEATTIE; LINDOW, 1999; WILSON et al., 1999).

Portanto, microrganismos antagonistas com potencial de biocontrole devem ser capazes de se estabelecerem de forma eficiente em locais protegidos e se manterem em condições ambientais adversas. Entretanto, a competição por nutrientes e a capacidade de produzir substâncias antifúngicas por estes agentes de controle biológico, garante a redução das chances dos propágulos de fitopatógenos sobreviverem (BETTIOL, 1997).

Segundo Wilson e Lindow (1994), a capacidade de competição no filoplano é maior quando ocorre uma sobreposição das exigências nutricionais do antagonista e do fitopatógeno, ocasionando em um baixo nível de coexistência entre os dois organismos. Assim, a bactéria residente de filoplano a ser introduzida para atuar no controle biológico deve ser específica e hábil para competir com o patógeno alvo por nutrientes e nichos, multiplicando-se e desenvolvendo-se nas mesmas condições ambientais ideais para a ocorrência da doença (ROMEIRO, 2007).

Em trabalhos realizados por Garcia (2008), objetivando o biocontrole do crestamento bacteriano comum do feijoeiro (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) por procariontes em condições de casa de vegetação, utilizou cinco bactérias pré-selecionadas (*Bacillus cereus* UFV-172 e UFV-75 isoladas de filoplano de feijoeiro; *Pseudomonas putida* UFV-053 isolada de rizosfera de feijoeiro; *B. cereus* UFV-101, isolado de rizosfera de tomateiro; e *P. putida* UFV-Pp, isolada de filoplano de tomateiro), e concluiu que os cinco antagonistas reduziram a severidade da doença em comparação com o controle, que consistiu em plantas tratadas com água. Em outro trabalho, Ocampos (2010) utilizou 324 bactérias isoladas do filoplano visando o biocontrole da alternariose e da podridão negra da couve, e destas selecionou 02 como os mais promissores no experimento em casa de vegetação, os isolados UFV- 215 para o controle da alternariose e o UFV-247 para o controle da podridão negra. Observou também que os dois isolados foram compatíveis em testes *in vitro* e no controle das duas doenças em plantas de couve, concluindo que ambas as bactérias selecionadas apresentaram eficiência como agentes de biocontrole contra as doenças em estudo, em experimentos em casa de vegetação, demonstrando grande potencial para utilização no campo.

Apesar de serem esperadas dificuldades no estabelecimento de populações de antagonistas no filoplano, alguns trabalhos demonstram que bactérias que vivem neste ambiente podem exercer o controle de doenças por ação direta ou indireta sobre os fitopatógenos.

2.6 Mecanismos de ação das bactérias

2.6.1 Antibiose

Dentre os mecanismos conhecidos de antagonismo, o mais importante é a antibiose, na qual um ou mais metabólitos produzidos por um organismo tem efeito nocivo sobre o outro (BETTIOL, 1991). Diversos são os efeitos conhecidos de antibiose, como a inibição de germinação ou crescimento micelial. Estes compostos atuam como bactericidas, fungicidas ou

fungistáticos e, em alguns casos nematicida (ROMEIRO, 2007; BARBOSA, 2009). Os antibióticos são compostos orgânicos com baixo peso molecular que, em baixas concentrações, são deletérios ao crescimento ou às atividades metabólicas de outros organismos (FRAVEL, 1988).

Em relação ao controle de doenças fúngicas, a antibiose também vem sendo descrita como um mecanismo importante em diferentes patossistemas. Em trabalho realizado por Oliveira et al. (2011) a antibiose foi considerada o principal mecanismo responsável pelo controle biológico do cancro-cítrico por um isolado de *Pseudomonas* sp.

Em tomateiro, Lanna Filho et al. (2010) verificaram que dois isolados de *Paenibacillus macerans* e *Bacillus pumilus*, residentes de filoplano, foram capazes de reduzir a severidade da mancha-bacteriana (*Xanthomonas vesicatoria*) e da pinta preta (*Alternaria solani*), por antibiose.

2.6.2 Competição

A competição por nutrientes e espaço também está associada ao controle biológico de patógenos, e sua ocorrência se dá quando os agentes de biocontrole e fitopatógenos requerem os mesmos recursos (CAMPBELL, 1989). A eficiência de competir por nutrientes disponíveis e nichos ecológicos representam um mecanismo relevante na proteção de plantas contra diversos microrganismos patogênicos (CABREFIGA et al., 2007; LUGTENBERG; KAMILOVA, 2009).

De acordo com Paulitz (1990) a competição por espaço ocorre, principalmente, pela ocupação dos sítios de colonização e competição por nutrientes essenciais para a maioria dos fitopatógenos: carbono, nitrogênio e ferro. As rizobactérias possuem alta afinidade por ferro com capacidade de inibir patógenos nos solos com restrição desse micronutriente (BRUNETTA, 2006). Sideróforos são moléculas sequestradoras de ferro de baixo peso molecular e elevada afinidade pelo substrato. Dentre os compostos sideróforos conhecidos pode-se citar a pioverdina e enterobactina, secretadas por microrganismos em resposta à baixa disponibilidade de Fe^{3+} em solução (ROMEIRO, 2007; BARBOSA, 2009).

Tem-se como exemplo de competição, as bactérias do filoplano do maracujazeiro, que mostraram alta eficiência no controle da *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* (Xap), importante doença do maracujazeiro. A competição por íons de ferro e nitrogênio limitaram as condições para Xap causar maiores severidades (HALFED-VIEIRA et al., 2015).

2.6.3 Indução de resistência

A indução de resistência sistêmica está relacionada com a capacidade que a planta apresenta em expressar respostas de defesa contra infecções ocasionadas por patógenos, através do tratamento com agentes indutores (eliciadores), sem alterações no genoma da planta (STADNIK, 2000). Esses indutores bióticos podem ser organismos vivos, parte desses, ou mesmo seus metabólitos. Eles atuam como eliciadores capazes de ativar respostas de defesa localizada ou sistêmica em plantas (DI PIERO et al., 2005).

Dentre os mecanismos conhecidos, a indução de resistência é um fenômeno amplamente estudado para RPCPs (VAN LOON, 2009), porém há poucos exemplos quando mediado por residentes do filoplano (BARGABUS et al., 2002; HALFELD-VIEIRA, 2005; HALFELD-VIEIRA et al., 2006).

Segundo Van Loon et al. (1998), quando uma RPCP coloniza a raiz, moléculas constituintes da célula bacteriana e por ela sintetizadas, agem como sinalizadores de novas rotas metabólicas (eliciadores). Esses eliciadores atuam como sinais e acionam os mecanismos de defesa, havendo, então, a resistência sistêmica induzida (VAN LOON et al., 1998; BARBOSA, 2009). O ácido salicílico (AS), ácido jasmônico (AJ) e o etileno são os principais sinais endógenos que levam a respostas de defesa nas plantas (BERNARDES, 2006).

Existem vários trabalhos que relatam a indução de resistência sistêmica a diversos patógenos, como pelo uso da bactéria *P. fluorescens* (NANDAKUMAR et al., 2001). Esses mesmos autores verificaram aumentos nas atividades de quitinases e peroxidases quando as plantas foram tratadas com *P. fluorescens* em desafio com *Rhizoctonia solani*, agente causal da queima-das-bainhas em arroz, independentemente do tratamento com o agente indutor.

A indução de resistência também foi constatada em estudos realizados por Halfeld-Vieira et al. (2006) como mecanismo envolvido no controle da mancha-bacteriana pequena (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*), exercido por um isolado de *Bacillus cereus*, onde constatou-se a redução significativa da severidade da doença, sistemicidade da proteção e aumento significativo dos níveis de peroxidases em plantas expostas ao antagonista e inoculadas com o patógeno.

3. CAPÍTULO 1: SELEÇÃO MASSAL DE ISOLADOS BACTERIANOS ORIUNDOS DE PLANTAS DE ARROZ VISANDO O BIOCONTROLE DA QUEIMA-DAS-BAINHAS

3.1 RESUMO

Objetivou-se com este trabalho selecionar bactérias provenientes da rizosfera, filoplano e sementes de plantas de arroz como possíveis agentes de controle biológico da queima-das-bainhas que tem como agente causal o fungo *Rhizoctonia solani* Kühn. Foram obtidas 414 bactérias isoladas de plantas de arroz coletadas em três áreas de cultivos localizadas no estado de Roraima. Para o isolamento, as raízes, folhas e sementes foram colocadas em Erlenmeyers contendo solução salina (0,85%) estéril, permanecendo em shaker por 24 horas. Em seguida, procederam-se diluições em séries e por último, 100 µL da suspensão bacteriana foram depositadas em meio de cultura 523. A partir dos testes de antibiose *in vitro*, 10 isolados de bactérias foram selecionadas. Posteriormente, procederam-se testes em casa-de-vegetação para que houvesse a confirmação da capacidade de biocontrole dos isolados selecionados. A seleção das bactérias *in vivo* ocorreu em duas etapas. Na primeira etapa foram preparadas suspensões bacterianas utilizadas individualmente, para a microbiolização de sementes de arroz (cultivar IRGA-424) por embebição durante 24 horas, seguindo-se a semeadura em bandejas contendo solo estéril e não-estéril. 20 dias após a semeadura, as plantas foram inoculadas com *Rhizoctonia solani* e 14 dias após a inoculação observou-se que nenhum dos 10 isolados bacterianos foi capaz de reduzir a incidência da queima-das-bainhas. Na segunda etapa foram preparadas suspensões das 10 bactérias selecionadas para a pulverização de plantas de arroz (cultivar IRGA-424) e 24 horas depois realizaram-se a inoculação do *Rhizoctonia solani* nas bainhas das plantas. Dentre as dez bactérias somente o isolado 327 obteve o menor comprimento relativo da lesão de 11,60 cm, enquanto a testemunha apresentou 38,57 cm. Em relação à variável Área Abaixo da Curva do Progresso da Doença os isolados 327 e 329 obtiveram valores significativos suprimindo a doença em 75% e 54%, respectivamente.

Palavra-chave: Antibiose. *Oryza sativa* L. *Rhizoctonia solani*. Seleção massal.

3.2 ABSTRACT

The objective of this work was to select bacteria from the rhizosphere, phylloplane and seeds of rice plants as possible biological control agents of the burning of the sheaths that has as a causal agent the fungus *Rhizoctonia solani* Kühn. A total of 414 bacteria isolated from rice plants were collected from three crop areas located in the state of Roraima. For the isolation, the roots, leaves and seeds were placed in erlenmeyers containing sterile saline solution (0.85%), remaining in shaker for 24 hours. Subsequently, serial dilutions were performed and 100 μ L of the bacterial suspension was deposited in culture medium 523. From the *in vitro* antibiosis assays, 10 bacterial isolates were selected. Subsequently, greenhouse tests were carried out to confirm the biocontrol capacity of the selected isolates. The selection of the bacteria *in vivo* occurred in two steps. In the first step, bacterial suspensions were used individually for the microbiolization of rice seeds (cultivar IRGA-424) by imbibition for 24 hours, followed by sowing in trays containing sterile and non-sterile soil. 20 days after sowing, the plants were inoculated with *Rhizoctonia solani* and 14 days after inoculation, it was observed that none of the 10 bacterial isolates were able to reduce the severity of the burn-out of the sheaths. In the second step suspensions of the 10 bacteria selected for the spraying of rice plants (cultivar IRGA-424) were prepared and 24 hours later *Rhizoctonia solani* was inoculated into the plant sheaths. Among the ten bacteria only the 327 isolate obtained the lowest relative length of the lesion of 11.60 cm, whereas the control had 38.57 cm. Regarding the variable Area Below the Progression of Disease Curve, the 327 and 329 isolates obtained significant values suppressing the disease in 75% and 54%, respectively.

Keywords: Antibiosis. *Oryza sativa* L. *Rhizoctonia solani*. Mass selection.

3.3 INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é o segundo cereal mais cultivado do mundo, movimentando de maneira expressiva sua cadeia produtiva. A produtividade desta cultura é afetada por vários fatores bióticos, especificamente as doenças fúngicas responsáveis por enormes prejuízos econômicos (SRIVASTAVA et al., 2016).

A queima-das-bainhas causada pelo fungo *Rhizoctonia solani* é uma das doenças mais destrutivas, causando grandes limitações à produção de arroz (SAIKIA et al., 2006). Estudos com esta cultura mostraram perdas significativas provocadas por esta doença, no rendimento dos grãos em diferentes níveis, estágio de desenvolvimento da cultura e grau de susceptibilidade da cultivar. Estratégias de controle e manejo da doença foram desenvolvidas em função do conhecimento e da importância dos danos ocasionados pela queima-das-bainhas (NAUREEN et al., 2015).

O controle biológico usando microrganismos benéficos é considerado uma alternativa promissora para a substituição de métodos químicos e se apresenta como viável em várias culturas, incluindo o arroz (VIDHYSEKARAN et al., 2001; NARAGHI et al. 2010). Muitos agentes de controle biológico, especificamente as bactérias, foram utilizados para controlar diversas doenças fitopatogênicas em culturas distintas (SAMAVAT et al., 2011; SADRATI et al., 2013).

As rizobactérias promotoras do crescimento de plantas, presentes na região da rizosfera atraíram um grande interesse em virtude das atividades de promoção de crescimento vegetal e a habilidade de controlar doenças de plantas (ZAHIR et al., 2004). Do mesmo modo estudos recentes comprovam a eficiência do biocontrole de bactérias presentes na região da filosfera (LINDOW; BRANDL, 2003; HALFELD-VIEIRA et al., 2008). Neste sentido, o êxito do controle biológico de doenças fúngicas irá depender do desempenho dos agentes de controle, isto é, da capacidade de sobreviver em diferentes nichos ecológicos (CUONG et al., 2011).

Microrganismos antagonistas potenciais foram isolados de plantas de arroz para a supressão de doenças na cultura (WIWATTANAPATAPEE et al. 2007; CHUMTHONG et al. 2008; YANG et al. 2008) e promoção de crescimentos de plantas (NAUREEN et al., 2015). O uso principalmente das espécies de *Bacillus* e de *Pseudomonas* foram relatadas para o controle da queima-das-bainhas na cultura do arroz. As espécies de *Pseudomonas* podem inibir patógenos das plantas através da secreção de substâncias, como a fenazina que apresenta ação antifúngica, e ainda induzir resistência sistêmica nos vegetais (KHABBAZ et

al., 2015), além de serem eficazes em aprimorar o crescimento das plantas (SPAEPEN et al., 2007). De modo semelhante, as espécies de *Bacillus* foram relatadas para promover o crescimento das plantas e suprimir o crescimento de fungos (RAMKUMAR et al., 2015) por meio do lançamento de vários compostos e enzimas que degradam a parede celular (KLOEPPE et al., 2004), além da capacidade de induzir a resistência sistêmica da planta (RUDRAPPA, et al., 2008). Contudo, este trabalho objetivou selecionar bactérias isoladas de plantas de arroz para o biocontrole da queima-das-bainhas, em testes *in vitro* e em condições de casa-de-vegetação, a partir de isolados bacterianos obtidos no estado de Roraima.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no período de fevereiro a dezembro de 2017, no Laboratório de Fitopatologia e em casa de vegetação, com temperatura ajustada a $\pm 28\text{ }^{\circ}\text{C}$, na Embrapa Roraima, Boa Vista, RR.

Para determinar o isolado de *R. solani* a ser utilizado durante a execução do trabalho, realizou-se teste de patogenicidade em casa de vegetação, com diferentes isolados de *Rhizoctonia* spp. (*Rhizoctonia solani* AG-1 IA, *R. solani* AG-1 IF e *R. zae*) pertencentes à coleção de trabalho do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Roraima. Os fungos foram crescidos em meio de cultura BDA (Batata Dextrose Agar) e posteriormente plantas de arroz (cultivar IRGA-424) foram inoculadas por meio da inserção de um pedaço de palito colonizado por hifas dos isolados fúngicos de *R. solani* na metade da bainha do perfilho principal. Todas as plantas foram então cobertas com sacos plásticos previamente umedecidos para manter o máximo de umidade por 24 horas. Após quatro dias foi detectado sintomas da doença nas folhas das plantas semelhantes aos sintomas originais da queima-das-bainhas. O isolado de *R. solani* AG1 – IA (42RR) apresentou as lesões mais severas e características da queima-das-bainhas, sendo selecionado para posterior utilização (Figura 1).

Figura 1 – Isolado de *Rhizoctonia solani* AG1 – IA cultivado em meio de cultura BDA (à esquerda); sintomas de queima-das-bainhas em plantas de arroz (cultivar IRGA-424) inoculadas com *Rhizoctonia solani* AG1 – IA (à direita).



Fonte: Morieli O. (2017).

3.4.1 Coletas de Plantas de Arroz

As plantas de arroz silvestres foram *Oryza glumaepatula* (Steud) e arroz *Oryza sativa* (L.) foram as cultivares BRS PAMPERA, IRGA 424, BRS CATIANA e genótipos, foram coletadas entre os meses de fevereiro a abril de 2017 em área de cerrado no município de Bonfim (N 03° 17' 23,1''; W 60° 24' 10,1''), no Campo experimental da Embrapa Roraima no município do Cantá (N 02° 48' 14,91''; W 60° 39' 25,85'') e em viveiro pertencente à Embrapa Roraima no município de Boa Vista (N 02° 45' 26,89''; W 60° 43' 52,78''), ambos no estado de Roraima. Foram coletadas plantas em diferentes estágios vegetativos cultivadas em condições de solo alagado e seco. As plantas foram acondicionadas em sacos plásticos e encaminhadas ao Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Roraima em temperatura ambiente. Após as coletas procedeu-se a separação do material vegetal em parte aérea e sistema radicular.

3.4.2 Isolamento das rizobactérias e bactérias do filoplano

As bactérias foram isoladas da rizosfera, filoplano e sementes de plantas de arroz saudáveis. As amostras, raízes, folhas e sementes foram colocadas separadamente em Erlenmeyers de 125 mL de capacidade, contendo 75 mL de solução salina (0,85% de NaCl) estéril e submetida a agitação por 24 horas em agitador para a obtenção da suspensão.

Logo após, ao término da agitação, 1 mL das suspensões foram pipetados em tubos de ensaio, contendo 9 mL de solução salina, até a diluição em série 10^{-6} , sendo depositados 100 μ L das amostras obtidas na diluição em placas de Petri, contendo meio de cultura 523 (KADO; HESKETT, 1970) e B de King (KING et al., 1954), espalhando-se com alça de Drigalski sobre a superfície do meio.

Posteriormente, as placas foram mantidas em incubadora a 27 °C, em fotoperíodo de 12 horas até o desenvolvimento das colônias, e após 24 horas observou-se, sob luz ultravioleta, o aparecimento de colônias bacterianas. Essas colônias foram transferidas para tubos de ensaio contendo meio de cultura 523 e armazenadas.

3.4.3 Teste de Antibiose

A partir do isolamento das bactérias, efetuaram-se os testes de antagonismo *in vitro* para determinar a eficiência de cada isolado no biocontrole de *R. solani*. No total, foram obtidos 414 isolados bacterianos, sendo 67 provenientes da rizosfera, 277 do filoplano e 70 de sementes de plantas de arroz saudáveis, sendo estes testados em meio de cultura BDA, semeando-se quatro bactérias isoladas nas extremidades da placa de Petri e um disco de

micélio de *R. solani* de 0,5 cm no centro. Esses discos foram retirados da borda da colônia do fungo, o qual estava crescendo ativamente no meio de cultura BDA por três dias. Para cada tratamento foram utilizados cinco repetições.

As placas de Petri inoculadas apenas com *R. solani* foram utilizadas como controles. Em seguida todas as placas foram mantidas a uma temperatura de 27 °C. As avaliações foram realizadas a cada 24 horas, medido o crescimento micelial de *R. solani* com o auxílio de um paquímetro digital, procedendo-se até o momento em que o fungo presente na placa controle atingisse o crescimento máximo de até três dias. Em seguida, foi observada a capacidade antagonista das bactérias em reduzir o crescimento micelial do fungo através da presença ou ausência do halo de inibição.

3.4.4 Seleção Massal das Bactérias com Capacidade de Biocontrole *in vivo*

Os 10 melhores isolados bacterianos selecionados no teste de antibiose foram avaliados em casa-de-vegetação. Foram instalados dois experimentos para avaliar a efetividade das bactérias no biocontrole da queima-das-bainhas. No primeiro ensaio realizou-se a microbiolização de sementes. Para isso, as bactérias foram repicadas para meio sólido 523 e incubadas a 27 °C por 48 h em incubadora BOD. Prepararam-se suspensões de cada um dos isolados, em solução salina (NaCl 0,85%) e ajustadas em absorbância a $A_{540}=0,2$, aproximadamente 10^{-2} células mL⁻¹. As sementes de arroz cv. IRGA-424 foram desinfestadas em hipoclorito de sódio 2% por 2 min, álcool 70 por 2 min e lavadas três vezes em água destilada por 2 min (SOUZA JÚNIOR et al., 2010). Em seguida foram microbiolizadas nestas suspensões, e permaneceram durante 24 horas, à temperatura ambiente. Como testemunha, sementes foram imersas em água destilada.

Após o período de imersão, as sementes foram semeadas em bandejas de plástico com 162 células, contendo solo esterilizado e não esterilizado. Após 20 dias da germinação das plantas de arroz, procedeu-se a inoculação com o isolado de *R. solani* por meio da inserção de discos de micélio de 0,5 cm (três dias de idade) em contato com a bainha das plantas até a manifestação dos sintomas da doença, avaliando-se a incidência da doença aos sete, 10 e 14 dias após a inoculação.

No segundo ensaio foi utilizado o método da pulverização foliar. Plantas de arroz cv. IRGA-424, com aproximadamente 30 dias de idade, foram cultivadas em vasos com 500 mL contendo solo não estéril previamente adubado conforme a recomendação da cultura, e mantidas em casa-de-vegetação. As colônias dos antagonistas foram semeadas em meio 523 sólido e incubadas a 27 °C por 48 h em incubadora BOD. Cada planta foi pulverizada com

uma suspensão ajustada em absorbância a $A_{540}=0,2$, aproximadamente 10^{-2} células mL^{-1} . A pulverização ocorreu de baixo para cima, na segunda bainha do colmo principal, todas as plantas foram mantidas em câmara úmida. Após 24 horas, cada planta foi submetida à inoculação colocando, com auxílio de uma pinça estéril, um pedaço de palito colonizado pelo isolado fúngico de *R. solani*. (RODRIGUES et al., 2001).

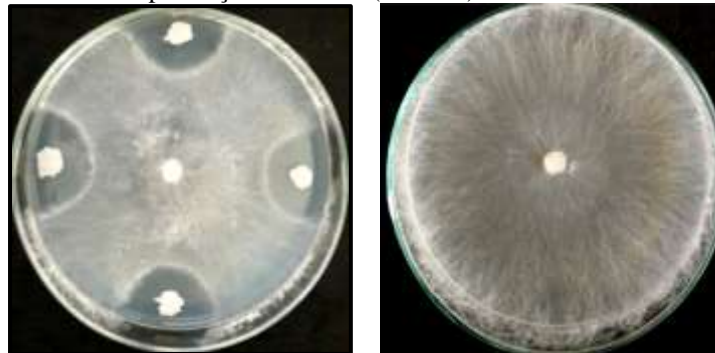
As bainhas inoculadas foram então amarradas aos perfilhos das plantas com auxílio de barbantes. A testemunha consistiu de plantas em que a bainha foi pulverizada com água. Posteriormente, todas as plantas foram mantidas em câmara úmida por 24 horas, com temperatura de 25 ± 2 °C e umidade relativa de $90 \pm 5\%$.

As avaliações foram iniciadas a partir do surgimento das lesões, onde avaliou-se o comprimento da lesão em cada bainha inoculada às 24, 48, 72 e 96 horas após inoculação, com auxílio de um paquímetro digital. O comprimento relativo da lesão (CRL) foi calculado dividindo-se o comprimento da lesão pelo comprimento da bainha $\times 100$. O comprimento das bainhas foi padronizado em 15 cm. Os dados do CRL foram utilizados para calcular a área abaixo da curva do progresso do comprimento relativo da lesão (AACPCRL) pela integração trapezoidal das curvas de progresso do CRL, de acordo com método de Shaner e Finney (1977). O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições para cada tratamento, onde cada repetição foi constituída por uma planta de arroz, transplantada independente, sendo que apenas a bainha do colmo principal foi inoculada com *R. solani*. Os dados foram submetidos à análise de variância, onde as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott no nível de 5% de significância, utilizando o software SISVAR (FERREIRA, 2011).

3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir dos testes de antagonismo *in vitro*, foram selecionados 19 isolados bacterianos que demonstraram inibição do crescimento micelial do fitopatógeno. O teste foi repetido novamente e destes 19, 10 demonstraram resultados significativos na redução do crescimento de *R. solani*, por meio da formação de halo de inibição confirmando a ocorrência da antibiose (Figura 2).

Figura 2 – Teste de antibiose *in vitro* em meio de cultura BDA confirmando o efeito da inibição do crescimento micelial de *Rhizoctonia solani* pelo isolado bacteriano 338 associado a plantas de arroz (à esquerda); e] crescimento micelial de *Rhizoctonia solani* sem a presença de bactéria (à direita).



Fonte: Morieli O. (2017).

As dez melhores bactérias apresentaram taxas de crescimento micelial relativamente baixas quando comparadas ao tratamento constituído pela testemunha (Tabela 1).

Tabela 1 - Efeitos de bactérias associadas a plantas de arroz selecionadas para o controle da queima-das-bainhas, na taxa de crescimento micelial ($\text{mm}\cdot\text{dia}^{-1}$) de *Rhizoctonia solani* em testes *in vitro*

Isolados Bacterianos	TAXAS DE CRESCIMENTO DE <i>R. solani</i>	
	Com presença de Bactérias	Sem presença de Bactérias
325 Filoplano	6,11 a	11,71 b
326 Filoplano	7,21 a	11,71 b
327 Filoplano	9,63 a	11,71 b
329 Filoplano	7,99 a	11,71 b
338 Filoplano	8,41 a	11,71 b
225 Rizosfera	6,78 a	8,46 b
226 Rizosfera	6,79 a	8,46 b
205 Rizosfera	10,21 a	13,63 b
388 Rizosfera	7,97 a	11,54 b
224 Rizosfera	11,89 a	13,63 b

Médias das taxas de crescimento micelial seguidas com mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a ao nível de 5% de probabilidade.

Estes resultados demonstraram que os antagonistas produzem algum tipo de substância inibitória ao patógeno. Possivelmente, compostos produzidos nos testes de antibiose são metabólitos com ação antifúngica (STEIN 2005; ONGENA; JACQUES 2008). Alguns autores afirmam que diversas espécies de bactérias são capazes de excretar substâncias como enzimas líticas, antibióticos e vários metabólitos que podem inibir o crescimento de diferentes microrganismos fitopatogênicos (BAREA et al., 2005; MOJICA et al., 2009; GUERRERO et al., 2011).

Nos últimos anos, a aplicação de compostos antifúngicos, tem ganhado grande importância na agricultura, sendo considerado um suplemento ou uma alternativa aos pesticidas químicos (FRAVEL, 1988; SHANMUGAIAH et al., 2010). Efeitos significativos na atividade antagonista *in vitro* contra o *R. solani* foi confirmada por Li et al. (2011a) utilizando um isolado bacteriano procedente da rizosfera de plantas de arroz. Assim como também, Lanna Filho et al. (2010) encontraram resultados satisfatórios no teste de antibiose *in vitro* que mostrou a atividade direta de bactérias isoladas de folhas de tomateiro saudáveis contra *Xanthomonas vesicatoria* e *Alternaria solani*.

Com relação as 10 bactérias selecionadas nenhuma foi capaz de reduzir a incidência da queima-das-bainhas em casa-de-vegetação, mediante ao tratamento de sementes microbiolizadas, sendo um método de colonização não eficaz para o controle da doença (Tabela 2).

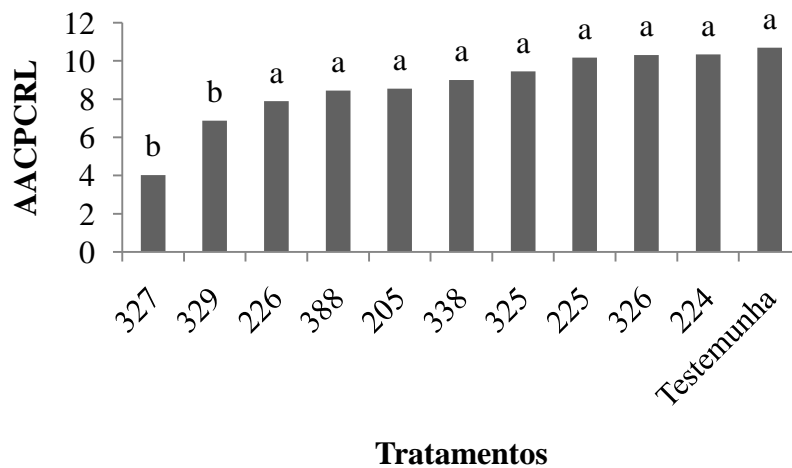
Tabela 2 – Incidência da queima-das-bainhas em plantas de arroz originadas de sementes microbiolizadas com bactérias selecionadas, aos (7, 10 e 14 dias) após a inoculação do patógeno

Isolados	7 Dias	10 Dias	14 Dias
Bacterianos			
325 Filoplano	+	+	-
326 Filoplano	+	+	-
327 Filoplano	+	+	-
329 Filoplano	+	+	-
338 Filoplano	+	+	-
225 Rizosfera	+	+	-
226 Rizosfera	+	+	-
205 Rizosfera	+	+	-
388 Rizosfera	+	+	-
224 Rizosfera	+	+	-
Testemunha	+	+	-

Plantas com sintomas da doença (+) e plantas mortas (-).

Em contrapartida, foi verificada a eficiência do controle biológico destes isolados contra a queima-das-bainhas, por meio de pulverização das plantas de arroz com suspensões destes antagonistas 24 horas antes de realizar a inoculação com *R. solani*. As lesões iniciais nas bainhas das plantas foram observadas logo no primeiro dia após a inoculação com o patógeno em todos os tratamentos. A incidência da queima-das-bainhas em relação a todos os isolados de bactérias diferiu significativamente da testemunha. Dentre os isolados, o 327 proveniente da região do filoplano, proporcionou a menor incidência da doença, sendo o mais efetivo. Com o isolado 327 o comprimento relativo da lesão foi de 11,60 cm, enquanto que a testemunha apresentou uma lesão média de 38,57 cm. Considerando a variável AACPCRL, ambos os isolados 327 e 329 foram superiores estatisticamente na redução da queima-das-bainhas (Figura 3), sendo que a eficiência de controle da doença pelos isolados foi igual a 75% e 54%, respectivamente. Outros três isolados (226, 388 e 205) também restringiram as lesões da doença em menos de 40%. Os demais isolados não foram eficazes neste ensaio quando comparados a testemunha, sendo que os isolados 326 e 224 obtiveram os menores valores.

Figura 3 - Área Abaixo da Curva do Progresso do Comprimento Relativo da Lesão (AACPCRL) da queima-das-bainhas em plantas de arroz pulverizadas com suspensões dos dez melhores isolados de Bactérias (Tratamentos: 327, 329, 226, 388, 205, 338, 325, 225, 326 e 224) aplicados 24 horas antes da inoculação do *Rhizoctonia solani*. As plantas testemunhas foram pulverizadas com água. Médias seguidas por mesma letra entre as colunas não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a ao nível de 5% de probabilidade.



Resultados semelhantes foram encontrados por Shrestha et al. (2016) ao avaliarem o controle biológico de isolados de *Bacillus* spp. contra o *R. solani* e *Burkholderia glumae* em plantas de arroz. Os autores confirmaram a efetividade dos antagonistas através de testes *in vitro* e da pulverização via foliar realizada 24 horas antes da inoculação dos patógenos. E ainda sugeriram, que bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus* são frequentes em plantas de arroz, sendo antagonistas promissores contra diversos patógenos.

Similarmente, Peng et al. (2014) relataram que *Bacillus subtilis* mostrou efetividade no controle preventivo de *R. solani* inoculado em mudas de arroz após 24 horas da aplicação foliar. Da mesma forma, Liu et al. (2018) constataram a eficácia de *Bacillus subtilis* aplicados na superfície de folhas de arroz para o biocontrole de *R. solani*. Vários estudos afirmam que bactérias do gênero *Bacillus* são predominantes em plantas de arroz, e se destacam por formar endósporo e exibirem uma multiplicidade de mecanismos antagônicos contra diversos patógenos, incluindo a antibiose, a indução de resistência da planta hospedeira e a competição por espaço e nutrientes (ONGENA et al., 2007; CHOUDHARY; JOHRI, 2009; PEREZ-GARCIA et al., 2011; SOLANKI et al., 2012).

Espécies de *Bacillus* têm sido frequentemente utilizadas no controle de doenças em diversificadas culturas (JACOBSEN et al., 2004; PEREZ-GARCIA et al., 2011). Exemplos recentes incluem doenças fúngicas causadas por *R. solani* e *Fusarium verticillioides* em morango (BASURTO-CADENA et al., 2012), o tombamento ou damping-off em tomate (SOLANKI et al., 2015), a rizoctoniose em batata (BEN KHEDHER et al., 2015) e o tombamento de plantas em algodão (SELIM et al., 2017), ambas causadas por *R. solani*.

Por outro lado, demais pesquisas revelaram que bactérias do gênero *Pseudomonas* sp. isoladas de solos da rizosfera de plantas de arroz mostraram potencial no antagonismo contra o *R. solani* (KANJANAMANEESATHIAN et al., 1998), especificamente *Pseudomonas fluorescens* (KAZEMPOUR, 2004). Em outros relatos foi evidenciada a efetividade do uso de combinações de agentes de biocontrole como forma de intensificar o controle de doenças. A combinação de *Pseudomonas* spp. e *Bacillus subtilis* registraram efeitos positivos no controle de *Phytophthora capsici* e *R. solani* em plantas de pepino (KHABBAZ et al., 2015). Assim como também, combinações de bactérias mostraram reduções significativas no controle de *Pyricularia grisea*, *Bipolaris oryzae* e *Gerlachia oryzae* em plantas de arroz (SOUZA JÚNIOR et al., 2017).

De modo geral, o interesse no controle biológico de patógenos de plantas é crescente a cada ano, em virtude principalmente do uso exagerado de pesticidas agrícolas. Resultados promissores são alcançados com a utilização de agentes de controle biológico quando

aplicados preventivamente. Isto ocorre especificamente devido à alta capacidade e o desempenho destes microrganismos em sobreviver e tolerar diferentes nichos ecológicos de plantas, ampliando a sua utilização em cultivos economicamente importantes (LANNA FILHO et al., 2013). Todavia, a habilidade de exclusão do patógeno pelo antagonista pode se dar por meio da competição de carbono e nitrogênio orgânico, reduzindo a disponibilidade destes nutrientes (WILSON; LINDOW, 1994a, b; DIANESE et al., 2003), bem como através do mecanismo da antibiose, com a produção de substâncias antimicrobianas para o controle preventivo de populações fitopatogênicas nos vegetais (CAVAGLIERI et al., 2004; ZHOU et al., 2012; SUÁREZ-ESTRELLA et al., 2013; LIN et al., 2014).

Contudo, constatou-se nesta pesquisa que o patógeno *R. solani* possui rápido crescimento micelial. Sendo assim, para que os agentes de controle biológico sejam efetivos, é importante que a população inicial seja elevada, e que os microrganismos sejam tolerantes a condições ambientais propícias a sua multiplicação. Então, a colonização prévia com agentes de biocontrole pode ser considerada uma estratégia eficaz que visa garantir um número suficiente de antagonistas para colonizar diferentes regiões da planta e reduzir a intensidade da doença (LANNA FILHO et al., 2013).

No presente estudo, o uso de suspensões provenientes de bactérias alcançou reduções significativas na incidência da doença em comparação com a testemunha. Recentemente Yu et al. (2017) relataram que suspensões de *Pseudomonas fluorescens* pulverizadas nas folhas de plantas de arroz reduziu significativamente a incidência da doença e a ainda promoveu o crescimento das plantas. Do mesmo modo, Naeimi et al. (2010) relataram que o desenvolvimento das lesões foi significativamente reduzida quando suspensões de esporos de isolados de *Trichoderma* foram aplicadas em plantas de arroz inoculadas com *R. solani*. A colonização de plantas por meio de pulverização foliar demonstra ser satisfatória, permitindo o estabelecimento dos agentes de controle biológico no filoplano das plantas, reduzindo os efeitos nocivos de *R. solani*.

Portanto, sugere-se que mais estudos envolvendo as bactérias selecionadas sejam realizados, em relação ao biocontrole não somente de *R. solani*, como também de outros agentes patogênicos importantes da cultura do arroz. Conseqüentemente, o aumento na demanda por pesquisas para suplementar o controle biológico com outros métodos é importante, pois desta forma o controle da doença é intensificado, e cada vez mais reduz a necessidade do uso de produtos químicos, e ainda garante a segurança do meio ambiente e alimentos mais saudáveis.

3.6 CONCLUSÕES

Os isolados bacterianos provenientes da rizosfera e filoplano de plantas de arroz reduziram o crescimento de *Rhizoctonia solani*, em teste de antibiose *in vitro*.

Plantas originadas de sementes de arroz microbiolizadas em suspensões dos dez isolados bacterianos selecionados, quando inoculadas com *Rhizoctonia solani*, não apresentaram redução da queima-das-bainhas.

A pulverização foliar em plantas de arroz com os isolados bacterianos selecionados foi eficiente no controle da queima-das-bainhas, alcançando os melhores resultados quando aplicados preventivamente, demonstrando os menores valores de AACPCRL.

4. CAPÍTULO 2: MECANISMOS DE BIOCONTROLE DE *Rhizoctonia solani* E ATRIBUTOS DE PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE PLANTAS MEDIADOS POR BACTÉRIAS

4.1 RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar os mecanismos de antagonistas responsáveis pelo biocontrole do *Rhizoctonia solani* e os possíveis mecanismos envolvidos na promoção de crescimento de plantas. Foram utilizadas dez bactérias isoladas de plantas de arroz. Os testes foram realizados utilizando indicadores bioquímicos e bioensaios, sendo verificadas: a capacidade de produção de enzima lítica, capacidade da produção de compostos voláteis, produção de sideróforos, solubilização de fosfato, capacidade de colonização da raiz e produção de auxinas. Os resultados demonstraram que a produção de compostos voláteis e a produção de sideróforos, são fatores que podem está relacionados com o biocontrole promovido pelas bactérias contra o *Rhizoctonia solani*. Enquanto a solubilização de fosfato foi observada somente pelo isolado 205, a produção de auxina foi constatada em todos os isolados bacterianos testados. Testes *in vitro* envolvendo os mecanismos de ação promovidos por bactérias é uma ferramenta importante para elucidar as pesquisas referentes ao controle biológico de doenças fitopatogênicas e na promoção de crescimento de plantas, pois contribui na obtenção de produtos biológicos.

Palavras-chave: Arroz. Auxina. Compostos voláteis. Sideróforos.

4.2 ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the mechanisms of antagonists responsible for the biocontrol of *Rhizoctonia solani* and the possible mechanisms involved in the promotion of plant growth. Ten bacteria isolated from rice plants were used. The tests were carried out using biochemical indicators and bioassays, being verified: lithic enzyme production capacity, volatile compound production capacity, siderophores production, phosphate solubilization, root colonization capacity and auxin production. The results demonstrated that the production of volatile compounds and the production of siderophores are factors that may be related to the biocontrol promoted by the bacteria against *Rhizoctonia solani*. While phosphate solubilization was observed only by isolate 205, and auxin production was observed all bacterial isolates. *In vitro* tests involving mechanisms of action promoted by bacteria is an important tool to elucidate the researches related to the biological control of phytopathogenic diseases and the promotion of plant growth, since it contributes to the obtaining of biological products.

Keywords: Auxin. Rice. Siderophores. Volatile compounds.

4.3 INTRODUÇÃO

Grandes progressos para o desenvolvimento de novos sistemas integrados de manejo da doença com intuito de proporcionar melhorias na qualidade das culturas são necessários, bem como reduzir o uso de pesticidas agrícolas (CHUCHILL, 2011). Além disso, a crescente demanda global por medidas de segurança ocasionou um grande interesse na busca por métodos biológicos para o manejo de doenças. Neste sentido, determinados esforços são aplicados a identificar bactérias e seus possíveis mecanismos de ação capazes de contribuir para o controle de doenças em plantas. Conhecer os mecanismos de ação é importante e contribui para a implantação de métodos eficazes e melhorias do biocontrole, a partir da utilização de agentes de controle biológicos de forma ativa (HAIDAR et al., 2016).

Em geral, diversas bactérias se destacam por apresentarem mais de um mecanismo de biocontrole, os quais podem ocorrer de forma conjunta. Um exemplo a ser citado é a eficácia da atividade de antagonismo de dois isolados de *Pseudomonas fluorescens* juntamente com um isolado de *Pseudomonas aureofaciens* empregando diferentes mecanismos como produção de substância antifúngica, sideróforos e metabólitos voláteis e não voláteis no biocontrole de *Rhizoctonia solani* em mudas de algodão (SAMAVAT et al., 2014). Da mesma forma, espécies de *Bacillus* demonstraram efeitos antagônicos contra isolados de *Rhizoctonia solani* em arroz através da produção de diferentes metabólitos voláteis, e ainda foram capazes de colonizar a superfície das raízes das plantas em níveis elevados (MOUSIVAND et al., 2012).

Inúmeros mecanismos estão relacionados com a eficácia do controle biológico promovido pelas bactérias. Esses mecanismos podem ocorrer de forma direta através da promoção do crescimento da planta com a produção de auxinas, ACC-desaminase, fixação de nitrogênio, solubilização de fósforo e sequestro de ferro por sideróforos bacterianos. Ou ainda, de forma indireta por meio da inibição de um ou mais microrganismos patogênicos de plantas, ocasionados pela liberação de antibióticos, enzimas degradadoras da parede celular, competição por espaço e nutrientes e resistência sistêmica induzida ao hospedeiro (OLANREWAJU et al., 2017). Os diferentes mecanismos de antagonismo e condições propícias aos microrganismos propõem que a sua aplicação, garante o desenvolvimento de um efetivo produto biológico (MOUSIVAND et al., 2012). Com isso, este capítulo tem como objetivo determinar quais os mecanismos explicam a capacidade de controle de bactérias associadas a plantas de arroz selecionadas para o biocontrole de *R. solani* e que fatores estão envolvidos na promoção de crescimento de plantas.

4.4 MATERIAL E MÉTODOS

Os bioensaios foram conduzidos no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Roraima. As bactérias identificadas como isolados, 325, 326, 327, 329, 205, 224, 225, 226, 388 e 338, foram selecionadas dentre 414 isolados, para o controle de *R. solani* na cultura do arroz, conforme descrito no capítulo 1.

4.4.1 Produção de β 1,3-glucanase

A detecção da produção de glucanase foi realizada utilizando o meio mineral Renwick et al. (1991), contendo uma única fonte de carbono 0,5% de laminarina. Em seguida ao realizar o semeio dos isolados bacterianos, as placas foram mantidas a 25 °C durante 10 dias. Após esse período, foi adicionada uma solução de 0,5% de vermelho do Congo na superfície do meio, permanecendo por 90 min. A comprovação da produção de β 1,3-glucanase foi evidenciada pela observação de um halo de cor vermelho-laranja claro ao redor da colônia.

4.4.2 Produção de Quitinase

A capacidade dos isolados em produzir quitinases foi determinada através da utilização do meio mineral de Renwick et al. (1991), contendo quitina coloidal a 0,08%, sendo esta a única fonte de carbono. O semeio dos isolado foi realizado em pontos distintos da superfície do meio, adotando-se cinco repetições para cada bactéria e logo em seguida as placas foram incubadas a 27 °C durante 10 dias. Após este período, verificou-se a presença do halo transparente ao redor das colônias indicando o resultado positivo da produção de quitinase.

4.4.3 Produção de Compostos Voláteis

Para avaliar a produção de compostos voláteis, utilizaram-se placas de Petri de plástico com dois compartimentos. O primeiro compartimento de todas as placas foi preenchido com meio 523 (KADO; HESKETT, 1970) e semeado as diferentes culturas bacterianas, selecionadas nos experimentos anteriores. Já no segundo compartimento foi acrescentado o meio BDA, onde se depositou um disco de micélio de *R. solani* com 5 mm de diâmetro. Como testemunha foi utilizada placas contendo somente o disco de micélio de *R. solani* em meio BDA em um dos compartimentos. As placas foram lacradas com Parafilm “M” (Pechiney Plastic Packaging) para isolar a atmosfera interna e evitar a perda de voláteis

formados. Logo após, as placas foram mantidas em BOD a uma temperatura de 26 °C, com fotoperíodo de 12 h. O arranjo experimental foi inteiramente casualizado contendo 5 repetições para cada tratamento. A produção de compostos voláteis foi verificada medindo a taxa de crescimento fúngico a cada 24 h durante três dias consecutivos e comparando-as com as placas do controle. As médias de cada tratamento foram analisadas pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico SISVAR.

4.4.4 Produção de sideróforos

Para realização do teste foi utilizada a metodologia descrita por Schwyn; Neilands (1987), adaptada por Macagnan et al. (2008), onde as culturas bacterianas foram cultivadas durante 48 horas em meio líquido B de King (KING et al., 1954), sob agitação contínua. Como controle negativo as bactérias foram cultivadas no mesmo meio acrescido de 2 μM de $\text{Fe}^{2+} \cdot \text{mL}^{-1}$ preparada a partir de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Em seguida, as bactérias foram centrifugadas a 10.000 g por 20 min, sendo posteriormente adicionado 1 mL do sobrenadante a 1 mL da solução indicadora de Cromo Azurol S (CAS). Após, foi verificada a comparação da coloração adquirida nos meios sem o cultivo de bactérias. A comprovação da produção de sideróforos pelas bactérias foi determinada pela mudança de coloração da mistura de azul para amarelo-alaranjado, durante um período de 15 min.

4.4.5 Capacidade de Solubilização de Fosfato

A capacidade de solubilização de fosfato foi determinada a partir do cultivo dos isolados em meio NBRIP sólido (NAUTIYAL, 1999). Cada bactéria foi semeada em pontos distintos na superfície do meio de cultura e incubada por 10 dias a 30 °C, utilizando-se cinco repetições. Após este período verificou-se a formação de halo transparente em torno das colônias indicando a ocorrência da capacidade de solubilização de fosfato de cálcio.

4.4.6 Produção de Ácido Indol Acético (AIA)

A capacidade de produção de ácido indol acético foi realizada conforme a metodologia descrita por Sarwar; Kremer (1995). Cada isolado bacteriano foi cultivado em 10 mL de meio de cultura DYGS líquido com 0,025 g mL^{-1} de triptofano por 48 h a 30 °C, sob agitação constante a 150 rpm. Depois do período de incubação, uma alíquota de 2 mL da suspensão bacteriana foi centrifugada por 5 min a 520 g e 75 μL do sobrenadante foram colocados em cavidades contidas em microplacas com capacidade para 150 μL , com oito repetições para cada bactéria. Posteriormente, foram adicionados sobre as amostras 50 μL do

reagente de Salkowsk (1 mL de $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ 0,5 M em 50 mL de HClO_4 a 35%) e as placas foram mantidas no escuro por 30 min. A produção de AIA foi identificada através da leitura de placas ELISA, em comprimento de onda de 492 nm.

A concentração de ácido indol acético foi estimada conforme metodologia adaptada de Porto et al. (2017), utilizando uma curva padrão previamente preparada com um meio de cultura estéril não inoculado e quantidades conhecidas de ácido indol acético (AIA), 0, 10, 25, 50, 75 e 100 μg de AIA mL^{-1} (Sigma Aldrich, I3750).

4.4.7 Capacidade de Colonização de Raízes *in vitro*

Os isolados bacterianos foram cultivados em meio sólido 523 e incubados por 48 horas a 27 °C. Posteriormente, preparam-se suspensões, a partir dessas culturas, em solução salina (NaCl 0,85%) e ajustadas em absorbância a $A_{540}=0,2$, aproximadamente 10^8 células mL^{-1} . Sementes de arroz cv. IRGA 424 foram desinfestadas em hipoclorito de sódio 2% por 2 min, álcool 70 por 2 min e lavadas três vezes em água destilada por 2 min. Em seguida foram microbiolizadas nestas suspensões durante 24 horas, à temperatura ambiente. Como testemunha, sementes foram imersas em água destilada. Após esse período as sementes foram semeadas em agar-água (0,6%) contido em tubos de ensaio e permaneceram em temperatura ambiente. O arranjo experimental foi inteiramente casualizado com cinco repetições para cada tratamento. Os tubos foram observados visualmente e a turbidez do meio em torno do sistema radicular foi verificada devido à colonização pelas bactérias. A capacidade de colonização das raízes foi detectada após 10 dias, sendo realizada a medição do seu comprimento, assim como também da parte aérea. Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade.

4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os mecanismos de cada bactéria isolada de diferentes partes de plantas de arroz (rizosfera, filoplano e sementes) foram analisados. No entanto, foi avaliado o potencial dos isolados bacterianos (325, 326, 327, 329, 205, 224, 225, 226, 338 e 388) em promover os mecanismos envolvidos tanto no controle biológico, como na promoção de crescimento vegetal, sendo este considerado um método eficaz na busca por pesquisas que integram os aspectos relacionados à promoção de crescimento *in vitro*, pois garante a obtenção e o uso de microrganismos como biofertilizantes (RODRIGUES et al., 2016) (Tabela 3).

Tabela 3 - Avaliação de mecanismos de ação de bactérias isoladas de plantas de arroz

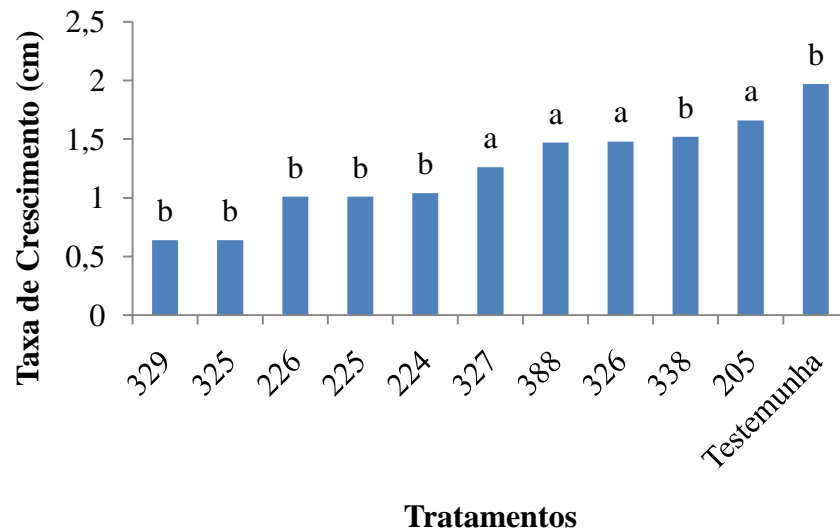
Testes Biológicos	Isolados Bacterianos									
	329	327	388	224	325	326	205	225	338	226
Produção de AIA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Solubilização de fosfato	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Produção de sideróforos	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Produção de glucanase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Produção de quitinase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Produção de compostos voláteis	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+

Testes com resultados positivos (+) e resultados negativos (-)

As atividades de antagonismo referente à produção de enzimas líticas, não foi observada pelos isolados, isto é, nenhuma das bactérias demonstrou a capacidade de produzir β -1,3 glucanase e quitinase, comprovando que estas enzimas não estão associadas com a capacidade de biocontrole destes isolados testados.

Quanto a produção de compostos voláteis, os resultados demonstraram que os isolados 329, 325, 226, 225 e 224 diferiram significativamente da testemunha quanto a redução do crescimento micelial de *R. solani*, sendo que as colônias do fitopatógeno atingiram taxas de crescimento, respectivamente de 0,64 cm, 0,64 cm, 1,01 cm, 1,01 cm e 1,04 cm, enquanto a testemunha apresentou 1,97 cm (Figura 4). A porcentagem de inibição do crescimento micelial de *R. solani* pelos isolados 329, 325, 226, 225 e 224 foi respectivamente: 68%, 68%, 49%, 49%, e 48%.

Figura 4 - Produção de compostos voláteis de diferentes isolados de bactérias em relação à taxa de crescimento micelial de *Rhizoctonia solani*. Os tratamentos foram: *R. solani* (Testemunha), isolados de bactérias: 325, 326, 327, 329, 205, 224, 225, 226, 388 e 338. Médias seguidas de mesma letra entre as colunas não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% probabilidade.



Os resultados da produção de compostos voláteis pelas bactérias mostrou a importância que desempenham na inibição do crescimento micelial de *R. solani*. Conforme relatos, os compostos voláteis podem ser considerados um mecanismo essencial na obtenção de resultados promissores referente ao controle biológico de plantas contra patógenos (RYU et al., 2004; EFFMERT et al., 2012).

Bactérias antagonistas podem produzir diferentes tipos de compostos voláteis como os alcenos, hidrocarbonetos aromáticos, alcoóis, terpenos, ésteres, cetonas e compostos de enxofre (WAN et al., 2008; LI et al., 2010). A produção de metabólitos voláteis foi relatada em muitas pesquisas (KAI et al., 2009; EFFMERT et al., 2012).

Segundo Boukaew et al. (2013) compostos voláteis produzidos por *Streptomyces philanthi* inibiram o crescimento micelial de fungos patogênicos como o *R. solani*, *Pyricularia grisea*, *Bipolaris oryzae* e *Fusarium fujikuroi*. De modo semelhante, foi relatado o potencial significativo de compostos voláteis produzidos por *Streptomyces corchorusii* na inibição de importantes patógenos na cultura do arroz, sendo que a maior redução foi verificada contra o *R. solani* (TAMREIHAO et al., 2016). Além disso, *Pseudomonas* sp. isolada de folhas saudáveis de oliveiras apresentou elevada atividade antifúngica contra o *R. solani* por meio da produção de compostos voláteis à base de enxofre (ELKAHOUI, et al.,

2015). Os compostos voláteis produzidos por bactérias além de prevenir o crescimento de fungos, ainda estão envolvidos na promoção do crescimento das plantas (KAI et al., 2007; KAI et al., 2009; WEISSKOPF, 2013).

Outro mecanismo envolvido no antagonismo das bactérias contra o *R. solani* consiste na produção de sideróforos que foi comprovada entre a maioria dos isolados bacterianos analisados, mostrando serem capazes de retirar íons de ferro do CAS (Figura 6). A produção de sideróforos foi evidenciada por meio de uma coloração amarelo-alaranjada intensa quando adicionado o CAS ao meio não suplementado com $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e coloração verde clara em meio suplementado por este composto (Figura 5). Os isolados bacterianos apresentaram alta capacidade de indisponibilizar íons de ferro, exceto os isolados 388, 326 e 327.

Figura 5 - Microtubos contendo meio B de King líquido, mostrando a produção de sideróforos pelos isolados bacterianos: 325, 326, 327, 329, 205, 224, 225, 226, 388 e 338. Os microtubos com a coloração verde correspondem ao meio suplementado com ferro e os de coloração amarela-alaranjada ao meio sem suplementação de ferro.



Fonte: Morieli O. (2018).

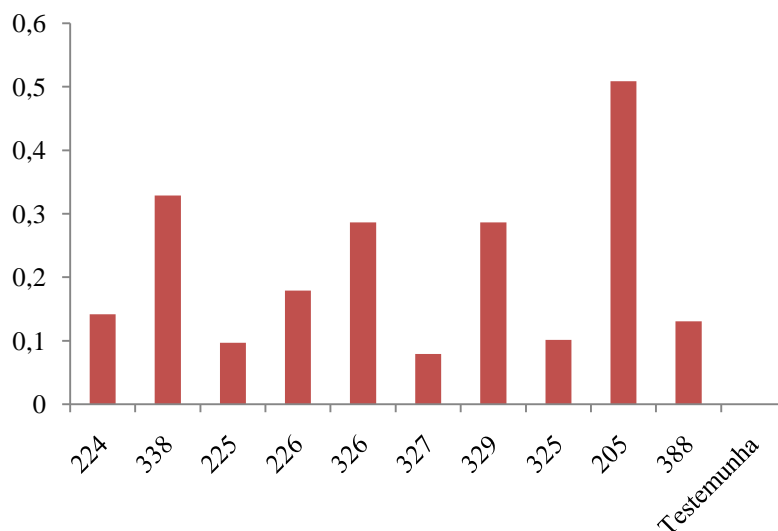
Realizar testes para detecção de sideróforos bacteriano é uma propriedade importante que confere o desempenho dos agentes de controle biológico (COMPANT et al., 2010). Sideróforos são pequenas moléculas peptídicas com cadeias e grupos funcionais que podem se ligar aos íons de ferro (GOSWAMI et al., 2016). Esses compostos estão envolvidos no processo de quelação de ferro do meio ambiente. Assim, quando ocorre a limitação de ferro,

os sideróforos produzidos por microrganismos podem suprir as plantas com este elemento, sendo que a competição pelo ferro é considerada um mecanismo relevante para o controle de doenças, visto que diversas bactérias podem prevenir e diminuir a proliferação de agentes patogênicos quando sintetizam e liberam sideróforos que se ligam ao Fe^{3+} , tornando-o menos disponível para um determinado patógeno (SIDDIQUI, 2006; SHEN et al., 2013). O ferro é indispensável para a respiração aeróbica microbiana, visto que microrganismos com capacidade de produzir sideróforos em condições de baixo teor de ferro dispõem de uma vantagem competitiva em relação aos que não produzem sideróforos. Conforme Naureen et al. (2015) isolados de bactérias associados à rizosfera de arroz mostraram elevado potencial na produção de sideróforos e seus resultados indicaram uma forte ligação destas substâncias com antagonismo *in vitro* de *R. solani*.

No que se refere aos mecanismos envolvidos na promoção do crescimento vegetal, a capacidade de produzir ácido indol acético (AIA) é o mais mencionado e utilizada para confirmar os efeitos exercidos pelas bactérias promotoras de crescimento de plantas. Diversas bactérias apresentam a capacidade de produzir AIA quando são expostas na presença de triptofano. Porém, a quantidade disponível de triptofano para cada planta é instável (SETHIA et al., 2014).

Neste estudo verificou-se que todos os isolados bacterianos produziram AIA, porém somente o isolado 205 proporcionou uma produção de $0,50 \mu\text{g mL}^{-1}$, sendo superior aos demais isolados, apresentando uma porcentagem de 86% a mais que o isolado 327 que produziu $0,07 \mu\text{g mL}^{-1}$ de AIA (Figura 6).

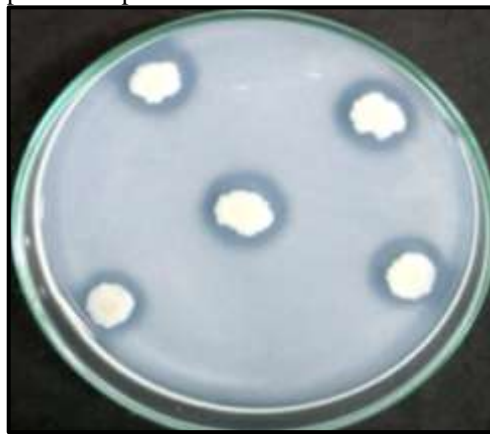
Figura - 6: Produção de ácido indol acético ($\mu\text{g mL}^{-1}$) por isolados bacterianos associados a plantas de arroz



Trabalhos realizado por Porto et al. (2017) também constataram a produção de AIA por isolados da espécie *Bradyrhizobium ingae* em concentrações próximas ao isolado 205. Da mesma forma, Dagnaw et al. (2015) encontraram baixos valores na produção de AIA para microrganismos da rizosfera. Porém, os baixos valores de AIA produzidos por isolados de bactérias são relevantes, devido a alguns métodos desenvolvidos pelos vegetais serem fundamentados na aplicação do triptofano. Grande parte das bactérias requer triptofano para que possam produzir o AIA, visto que as rotas para a síntese da auxina são totalmente dependentes deste aminoácido (UL HASAN; BANO, 2015).

Também foi evidenciado que apenas o isolado 205 mostrou ser capaz de solubilizar fosfato insolúvel no meio NBRIP sólido (Figura 6).

Figura 7 - Halo de solubilização de fosfato produzido pelo isolado bacteriano 205.



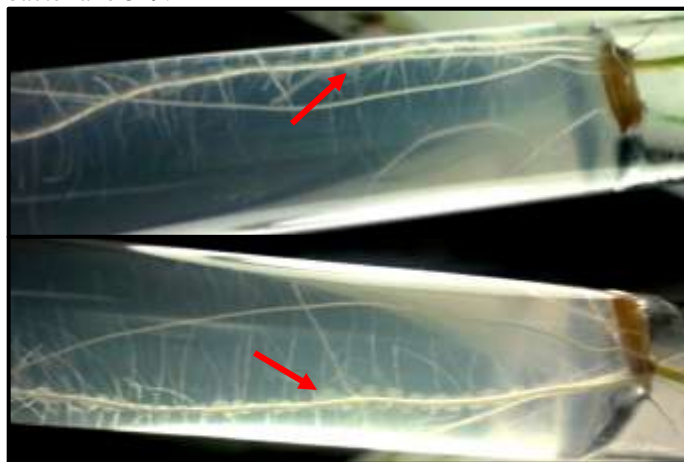
Fonte: Morieli O. (2017)

Entretanto, Rodrigues et al. (2016) alcançaram índices variáveis na solubilização de fosfato, confirmando que este mecanismo apresenta uma característica altamente instável entre as bactérias. Valores positivos na solubilização de fosfato foram encontrados por uma comunidade bacteriana isolada de cana-de-açúcar (SILVA et al., 2012), enquanto Liu et al. (2015) relataram que todos os isolados bacterianos estudados por eles apresentaram pouca capacidade de solubilizar fosfato. Esses autores ressaltaram ainda que a produção de um halo transparente em meio de cultura não deve ser a única estratégia para se testar a solubilização de fosfato por uma bactéria, um teste adicional em meio líquido para avaliar a dissolução de fósforo deve ser realizado simultaneamente, devido a ocorrência de diversificados complexos nos solos naturais afetarem a disponibilidade deste elemento, uma vez que as bactérias são isoladas de plantas cultivadas nesses solos.

No entanto, sendo o fósforo um dos principais nutrientes envolvidos no crescimento das plantas, e que influencia uma variedade de processos metabólicos, incluindo desenvolvimento e divisão de células, transporte de energia, síntese de macromoléculas, respiração e fotossíntese (KHAN et al., 2014). Além disso, em muitas pesquisas tem-se confirmado a produção de elevadas taxas de solubilização de fosfato por microrganismos, favorecendo o beneficiamento de fósforo de forma assimilável para as plantas, sem ocasionar danos prejudiciais ao meio ambiente.

Portanto, das 10 bactérias selecionadas, somente o isolado 205 demonstrou resultados positivos para as duas características referentes à promoção de crescimento. Além destas vantagens, resultados significativos foram verificados entre o isolado 205, seguido dos isolados 225, 329, 325, 338, 388 e 226, mostrando serem capazes de colonizar as raízes de plantas de arroz *in vitro*, através de sementes de arroz microbiolizadas nas suspensões destes isolados e supridas apenas por exsudatos radiculares (Figura 7).

Figura 8 - Colonização de raízes de plantas de arroz. As setas vermelhas indicam a colonização da raiz pelo isolado bacteriano 329.



Fonte: Morieli O. (2017).

Foi verificado o comportamento do isolado 205, sendo significativo em ambas as variáveis colonização e crescimento da raiz (Tabela 4), o que confirma a sua efetividade em promover o crescimento vegetal e comprova a habilidade do isolado em produzir AIA, hormônio vegetal que age principalmente na diferenciação do tecido vascular, divisão celular e no alongamento do caule e da raiz (GROBELAK et al., 2015). Já o isolado 224 procedente da rizosfera, interferiu negativamente, apresentando efeito deletério no desenvolvimento do sistema radicular, quando comparado com a testemunha que foi superior a este isolado em

relação à variável crescimento da raiz, o que pode estar associado à presença de bactérias endofíticas. Sementes de arroz se constituem em importante veículo de disseminação destas bactérias, sendo que a ocorrência de bactérias na parte interna de sementes de arroz pode ser resultado da colonização endofítica do solo, migrando ascendentemente na planta e atingindo os tecidos aéreos (DA SILVA et al., 2011).

Tabela 4 - Efeito das bactérias isoladas de plantas de arroz selecionadas para o controle da queima-das-bainhas, causada por *Rhizoctonia solani*, na colonização e comprimento da raiz de plântulas de arroz em meio agar-água

Isolados Bacterianos	Colonização da raiz (cm)	Comprimento da raiz (cm)
205	2,59 b	3,47 b
225	2,29 b	3,31 b
329	2,27 b	2,94 b
325	2,08 b	2,78 b
338	2,05 b	3,49 b
388	1,78 b	2,81 b
226	1,73 b	2,53 b
327	1,45 a	3,03 b
326	1,46 a	2,81 b
224	1,11 a	1,21 a
Testemunha	0,70 a	3,30 b

Médias seguidas com mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5%

A capacidade dos microrganismos em colonizar o sistema radicular dos vegetais, influencia diretamente no crescimento das plantas, promovendo a absorção de nutrientes e a condução do crescimento da raiz por meio da disponibilidade de hormônios vegetais presentes na região da rizosfera (MURCI et al., 2012). A colonização da raiz é vista como um dos aspectos mais importantes para que as bactérias atuem como agentes de controle biológico, em razão de promover a colonização da raiz de forma eficiente, favorecendo a permanência duradoura destes antagonistas na região da rizosfera, e garantindo ainda a proteção da planta hospedeira (IDRIS et al., 2007).

Com este estudo foi possível avaliar os principais mecanismos de ação desenvolvidos pelos 10 isolados bacterianos selecionados no capítulo anterior, a partir de testes *in vitro*, comprovando a potencialidade destes isolados nas atividades referentes ao controle biológico e a capacidade de promover o crescimento de plantas. Entretanto, realizar esses testes é fundamental e contribui positivamente para selecionar microrganismos eficientes do ponto de vista agrônomo (SZILAGYI-ZECCHIN et al., 2016).

4.6 CONCLUSÕES

A produção de sideróforos e a produção de compostos voláteis são fatores que podem explicar o biocontrole do *Rhizoctonia solani* em condições *in vitro* pelos isolados.

Todos os isolados bacterianos testados foram capazes de produzir auxina. Porém, o isolado 205 mostrou-se eficiente nos testes referentes à promoção de crescimento vegetal *in vitro*, tais como produção de auxina e solubilização de fosfato.

REFERÊNCIAS

- ALONÇO, A. S. et al. Avaliação técnica de uma máquina para a correção de microrrelevo do solo de áreas destinadas ao cultivo de arroz irrigado. **Ciência Rural**, v. 36, n. 5, p. 1643-1646, 2006.
- ANDREWS, J. H. Biological control in the phyllosphere. **Annual Review of Phytopathology**, v. 30, p. 603-635, 1992.
- ANDREWS, J. H.; HIRANO, S. S. (Eds.) *Microbial Ecology of Leaves*. New York. **Springer-Verlag**. 1991.
- ARAÚJO, A. S. F.; ARAÚJO, R. S. Sobrevivência e nodulação de *Rhizobium tropici* em sementes de feijão tratadas com fungicidas. **Ciência Rural**, v. 36, p. 973-976, 2006.
- ASHRAFUZZAMAN, M.; HOSSEN, F. A.; ISMAIL, M. R.; HOQUE, M. A.; ISLAM, M. Z.; SHAHIDULLAH, S. M. Efficiency of plant growth promoting Rhizobacteria (PGPR) for the enhancement of rice growth. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, p. 1247-52, 2009.
- BARBOSA, R. N. T. **Seleção de rizobactérias visando o controle biológico da murcha-de-esclerócio em tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.)**. 44 p. 2009. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, 2009.
- BAREA, J.; POZO, M.; AZCÓN, R.; AGUILAR, C. Microbial co-operation in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, n. 417, p. 1761-1778, 2005.
- BARGABUS, R. L.; ZIDACK, N. K.; SHERWOOD, J. E.; JACOBSEN, B. J. Characterization of systemic resistance in sugar beet elicited by a non-pathogenic, phyllosphere-colonizing *Bacillus mycoides*, biological control agent. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 61, p. 289-298, 2002.
- BASURTO-CADENA, M. G. L.; VÁZQUEZ-ARISTA, M.; GARCÍA-JIMÉNEZ, J.; SALCEDO-HERNÁNDEZ, R.; BIDESHI, D. K.; BARBOZA-CORONA, J. E. Isolation of a New Mexican Strain of *Bacillus subtilis* with Antifungal and Antibacterial Activities. **The Scientific World Journal**, v. 2012, p. 7, 2012.
- BEATTIE, G. A.; LINDOW, S. E. Bacterial colonization of leaves: a spectrum of strategies. **Phytopathology**, v. 89, p. 353-359, 1999.
- BEN KHEDHER, S.; KILANI-FEKI, O.; DAMMAK, M.; JABNOUN-KHIAREDDINE, H.; DAAMI-REMADI, M.; TOUNSI, S. Efficacy of *Bacillus subtilis* V26 as a biological control agent against *Rhizoctonia solani* on potato. **Comptes Rendus Biologies**, v. 338, p. 784-792, 2015.
- BERNARDES, F. S. **Rizobactérias na indução de resistência sistêmica em cultivos hidropônicos**. 58f. 2006. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) – Instituto Agronômico de Campinas, Campinas, 2006.

BETTIOL, W. Capítulo 1 - **Componentes do controle biológico de doenças de plantas**. In: BETTIOL, W. Controle biológico de doenças de plantas. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, p. 01-05, 1991.

BETTIOL, W. Biocontrole na filosfera: problemas e perspectivas. In: **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 5, p. 59-97, 1997.

BORTOLOTTO, R. P.; MENEZES, N. L.; GARCIA, D. C.; MATTIONI, N. M. Teor de proteína e qualidade fisiológica de sementes de arroz. **Bragantia**, Campinas, v. 67, n. 2, p. 513-518, 2008.

BOUKAEW, S.; KLINMANEE, C.; PRASERTSAN, P. Potential for the integration of biological and chemical control of sheath blight disease caused by *Rhizoctonia solani* on Rice. **World Journal of Microbiology Biotechnology**, v. 29, p. 1885–1893, 2013.

BOUKAEW, S.; PLUBRUKAM, A.; PRASERTSAN, P. Effect of volatile substances from *Streptomyces philanthi* RM-1-138 on growth of *Rhizoctonia solani* on rice leaf. **BioControl**, v. 58, p. 471–482, 2013.

BRUNETTA, J. M. F. C. **Isolamento e seleção de rizobactérias para a produção de mudas de *Pinus* spp.** 2006. 57f. Tese (Doutorado em Ciência Florestal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2006.

CABREFIGA, J.; BONATERRA, A.; MONTESINOS, E. Mechanisms of antagonism of *Pseudomonas fluorescens* EPS62 e against *Erwinia amylovora*, the causal agent of fire blight. **International Microbiology**, v. 10, p. 123–132, 2007.

CAMPBELL, R. Biocontrol of postharvest diseases - Introduction. In: Biological control of foliar and post-harvest diseases (N.J. Fokkema, J. Kohl, Y. Elad, ed.), **IOBC/WPRS Bulletin**, v. 16, p. 93–94, 1989.

CAVAGLIERI, L.; PASSONE, A.; ETCHEVERRY, M. Screening procedures for selecting rhizobacteria with biocontrol effects upon *Fusarium verticillioides* growth and fumonisin B1 production. **Research in Microbiology**, v. 155, p. 747–754, 2004.

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

CHOUDHARY, D. K.; SHARMA, K. P.; GAUR, R. K. Biotechnological perspectives of microbes in agro-ecosystems. **Biotechnology Letters**, v. 33, p. 1905–1910, 2011.

CHUMTHONG, A.; KANJANAMANEESATHIAN, M.; PENGNOO, A.; WIWATTANAPATAPEE, R. Water-soluble granules containing *Bacillus megaterium* for biological control of Rice sheath blight: formulation, bacterial viability and efficacy testing. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 2499–2507, 2008.

CHURCHILL, A. *Mycosphaerella fijiensis*, the black leaf streak pathogen of banana: progress towards understanding pathogen biology and detection, disease development, and the challenges of control. **Molecular Plant Pathology**, v. 14, n. 2, p. 307-328, 2011.

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

CONAB (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO), **Séries históricas** 2018. <http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1252&t=2>. Acesso em março de 2018.

COOK, R. J.; BAKER, K. F. The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens. **American Phytopathological Society**, St. Paul, Minnesota. 539 p. 1983.

CUONG, N. D.; NICOLAISEN, M. H.; SORENSEN, J.; OLSSON, S. Hyphae-Colonizing *Burkholderia* sp. A New Source of Biological Control Agents Against Sheath Blight Disease (*Rhizoctonia solani* AG1-IA) in Rice. **Microbial Ecology**, v. 62, p. 425–434, 2011.

DAGNAW, F. Characterization of plant growth promoting bacteria from sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) rhizosphere of Wonji-Shoa Sugar Estate and farmers landraces of Ethiopia. **Biotechnology**, v. 14, n. 1, p. 58- 64, 2015.

DA SILVA, D. M.; ANTONIOLLI, Z. I.; JACQUES, R. J. S. Ocorrência de bactérias diazotróficas em sementes de duas cultivares de arroz irrigado. **Revista Brasileira Agrociência**, v. 17, n.1-4, p.158-161, 2011.

DATH, A. P. Sheath blight disease of rice and its management. New Delhi, India. **Associated Publishing Company**, 1990.

DI PIERO, R. M.; GARCIA JUNIOR, D.; TONUCCI, N. M. Indutores bióticos. In: CALVALCANTI, L. S.; DI PIERO, R. M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S. F.; RESENDE, M. L. V.; ROMEIRO, R. da S. (Ed.). **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**, p. 29-50, 2005.

DIANESE, A. C.; JI, P.; WILSON, M. Nutritional similarity between leaf-associated nonpathogenic bacteria and the pathogen is not predictive of efficacy in biological control of bacterial spot of tomato. **Applied Environmental Microbiology**, v. 69, p. 3484–3491, 2003.

EFFMERT U.; KALDERAS, J.; WARNKE, R.; PIECHULLA, B. Volatile Mediated Interactions Between Bacteria and Fungi in the Soil. **Journal of Chemical Ecology**, v. 38, p. 665–703, 2012.

EIZENGA, G. C.; LEE, F. N.; RUTGER, J. N. Screening *Oryza* species plants for rice sheath blight resistance. **Plant Disease**, v. 86, p. 808-812, 2002.

ELKAHOUI, S.; DJÉBALI, N.; YAICH, N.; AZAIEZ, S.; HAMMAMI, M.; RYM ESSID, R.; LIMAM, F. Antifungal activity of volatile compounds-producing *Pseudomonas* P2 strain against *Rhizoctonia solani*. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v. 31, p. 175–185, 2015.

FALTIN, F.; LOTTMANN, J.; GROSCHE, R.; BERG, G. Strategy to select and assess antagonistic bacteria for biological control of *Rhizoctonia solani* Kuhn. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 50, p. 811-820, 2004.

FERREIRA, C. M.; VILLAR, P. M. DEL. Aspectos da produção e do mercado de arroz. **Informe Agropecuário**, v. 25, n. 222, p.11-18, 2004.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

FILHO LANNA, R.; FERRO, H. M.; PINHO, R. S. C. Controle Biológico mediado por *Bacillus subtilis*. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 4, n. 2, p. 12, 2010.

FRAVEL, D. Role of antibiotics in the biocontrol of plant diseases. **Annual Review of Phytopathology**, v. 26, p. 75-92, 1988.

GARCIA, F. A. O. **Biocaracterização de procariotas como agentes de biocontrole de enfermidades e como promotores de crescimento em feijoeiro**. 146f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, 2008.

GARCÍA-FRAILE, P.; MENÉNDEZ, E.; RIVAS, R. Role of bacterial biofertilizers in agriculture and forestry. **AIMS Bioengineering**, v. 2, p. 183–205, 2015.

GONZÁLEZ-GARCÍA, V.; PORTAL ONCO, M. A.; RUBIO SUSAN V. Review. Biology and Systematics of the form genus *Rhizoctonia*. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v. 4, p. 55–79, 2006.

GOSWAMI, D.; THAKKER, J. N.; DHANDHUKIA, P. C.; TEJADA MORAL M. Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): a review. **Cogent Food & Agriculture**, v. 2, p. 1127500, 2016.

GRIGOLETTI JÚNIOR, A.; SANTOS, A. F.; AUER, C. G. Perspectivas do uso do controle biológico contra doenças florestais. **Revista Floresta**, v. 30, p.155-165, 2000.

GROBELAK, A.; NAPORA, A.; KACPRZAK, M. Using plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) to improve plant growth. **Ecological Engineering**, v. 84, p. 22–28, 2015.

GROTH, D. E.; RUSH, M. C.; LINDBERG, G. D. Foliar fungicides for control of Rice diseases in the United States. Pages 31-52 in: Pest Management in Rice. B. T. Grayson, M. B. Green, and L. G. Copping, eds. **Elsevier Applied Science**, London, 1990.

GUERRERO, Y.; RODRÍGUEZ, A.; RODRÍGUEZ, N.; DEL VALLE, M.; LAUZARDO, A. Perspectivas del uso de bacterias rizosféricas en el control de *Pyricularia grisea* (Cooke Sacc.) em el cultivo de arroz (*Oryza sativa* L.). **Revista Colombiana de Biotecnología**, v. 13, n. 1, p. 16-22, 2011.

Haidar, R.; FERMAUD1, M.; CALVO-GARRIDO, C.; ROUDET, J.; DESCHAMPS, A. Modes of action for biological control of *Botrytis cinerea* by antagonistic bacteria. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 55, n. 3, p. 301–322, 2016.

HALFELD-VIEIRA, B. A. Bactérias residentes de filoplano e seu potencial na indução de resistência em plantas a patógenos. In: CAVALCANTI, L. S.; DI PIERO, R. M.; CIA P.;

PASCHOLATI, S. F.; RESENDE, M. L. V.; ROMEIRO, R. S. (Org.). **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. 1 ed. Piracicaba: FEALQ, p. 183-193, 2005.

HALFELD-VIEIRA, B. A.; VIEIRA JÚNIOR, J. R.; ROMEIRO, R. S.; SILVA, H. S. A.; BARACAT-PEREIRA, M. C. Induction of systemic resistance in tomato by the autochthonous phylloplane resident *Bacillus cereus*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, p. 1247-1252, 2006.

HALFELD-VIEIRA, B. de A.; DA SILVA, W. L. M.; SCHURT, D. A. ; ISHIDA, A. K. N.; DE SOUZA, G. R.; NECHET, K. DE L. Understanding the mechanism of biological control of passionfruit bacterial blight promoted by autochthonous phylloplane bacteria. **Biological Control**, v. 80, p. 40-49, 2015.

HALFELD-VIEIRA, B. de A.; ROMEIRO, R. da S.; MOUNTEER, A.; MIZUBUTI, E.S.G. Efficiency of phylloplane bacteria in controlling aerial tomato diseases under field conditions. **Summa Phytopathologica**, v. 34, p. 86-87, 2008.

IDRIS, H. A.; LABUSCHAGNE, N.; KORSTEN, L. Screening rhizobacteria for biological control of *Fusarium* root and crown rot of sorghum in Ethiopia. **Biological Control**, v. 40, p. 97-106, 2007.

JACOBSEN, B. J.; ZIDACK, N. K.; LARSON, B. J. The role of *Bacillus*-based biological control agents in integrated pest management systems: plant diseases. **Phytopathology**, v. 94, n. 11, p. 1272–5, 2004.

JI, H. S.; GURURANI, A. M.; CHUN, S. Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic diazotrophic bacteria from Korean rice cultivars. **Microbiological Research**, v. 169, p. 83– 98, 2014.

KADO, C. I.; HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, v. 60, p. 969-979, 1970.

KAI, M.; EFFMERT, U.; BERG, G.; PIECHULLA, B. Volatiles of bacterial antagonists inhibit mycelial growth of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*. **Archives of Microbiology**, v. 187, p. 351–360, 2007.

KAI, M.; HAUSTEIN, M.; MOLINA, F.; PETRI, A.; SCHOLZ, B.; PIECHULLA, B. Bacterial volatiles and their action potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 81, p. 1001–1012, 2009.

KANJANAMANEESATHIAN, M.; KUSONWIRIYAWONG, C.; PENGNOO, A.; NILRATANA, L. Screening of potential bacterial antagonists for control of sheath blight in rice and development of suitable bacterial formulations for effective application. **Australasian Plant Pathology**, v. 27, p. 198–206, 1998.

KARTHIBA, L.; SAVEETHA, K.; SURESH, S.; RAGUCHANDER, T.; SARAVANAKUMAR, D.; SAMIYAPPAN, R. PGPR and entomopathogenic fungus bioformulation for the synchronous management of leafhopper pest and sheath blight disease of rice. **Pest Management Science**, v. 66, p. 555–564, 2010.

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

KHABBAZ, S. E. et al. Characterisation of antagonistic *Bacillus* and *Pseudomonas* strains for biocontrol potential and suppression of damping-off and root rot diseases. **Annals of Applied Biology**, v. 166, n. 3, p. 456–471, 2015.

KHABBAZ, S. E.; ZHANG, L.; CACERES, L. A.; SUMARAH, M.; WANG, A.; ABBASI, P. A. Characterisation of antagonistic *Bacillus* and *Pseudomonas* strains for biocontrol potential and suppression of damping-off and root rot diseases. **Annals of Applied Biology**, v. 166, p.456–471, 2015.

KHAN, M. S.; ZAIDI, A.; AHMAD, E. Mechanism of phosphate solubilization and physiological functions of phosphate-solubilizing microorganisms. In: Khan, M. S., Zaidi, A., Musarrat, J. (Eds.), *Phosphate Solubilizing Microorganisms: Principles and Application of Microphos Technology*. **Springer International Publishing**, Switzerland, p. 31–62, 2014.

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

KLOEPPER J. W.; LIFSHITZ R.; ZABLOTWICZ R. M. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. **Trends in Biotechnology**, v. 7, p. 39–43, 1989.

KLOEPPER, J. W.; RYU, C. M.; ZHANG, S. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* sp. **Phytopathology**, 94, 1259–1266, 2004.

LANNA FILHO, R.; ROMEIRO, R. S.; ALVES, E. Bacterial spot and early blight biocontrol by epiphytic bacteria in tomato plants. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, n. 12, p. 1381–1387, 2010.

LANNA FILHO, R.; SOUZA, M. R.; FERREIRA, A.; QUECINE, C. M.; ALVES, E.; AZEVEDO, L. J. Biocontrol activity of *Bacillus* against a GFP-marked *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* on tomato phylloplane. **Australasian Plant Pathol**, v. 42, p. 643–651, 2013.

LI, B.; LIU, B. P.; YU, R. R.; LOU, M. M.; WANG, Y. L.; XIE, G. L.; LI, H. Y.; SUN, G. C. Phenotypic and molecular characterization of rhizobacterium *Burkholderia* sp. strain R456 antagonistic to *Rhizoctonia solani*, sheath blight of rice. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v. 27, p. 2305–2313, 2011a.

LI, Q.; NING, P.; ZHENG, L.; HUANG, J.; LI, G.; HSIANG, T. Fumigant activity of volatiles of *Streptomyces globisporus* JK-1 against *Penicillium italicum* on Citrus microcarpa. **Postharvest Biol Technol**, v. 58, p. 157–165, 2010.

LI, W.; LI, L.; LI, K.; LIN, J.; SUN, X.; TANG, K. Expression of biologically active human insulin-like growth factor 1 in *Arabidopsis thaliana* seeds via oleosin fusion technology. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 58, p. 139–146, 2011b.

- LI, Z.; PINSON, S. R. M.; MARCHETTI, M. A.; STANSEL, J. W.; PARK, W. D. Characterization of quantitative trait loci (QTLs) in cultivated rice contributing to field resistance to sheath blight (*Rhizoctonia solani*). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 91, p. 382-388, 1995.
- LIAN, LH.; TIAN, B. Y.; XIONG, R.; ZHU, M. Z.; XU, J.; ZHANG, K. Q. Proteases from *Bacillus*: a new insight into the mechanism of action for rhizobacterial suppression of nematode populations. **Letters in Applied Microbiology**, v. 45, p. 262-269, 2007.
- LIN, Y.; DU, D.; SI, C.; ZHAO, Q.; LI, Z.; LI, P. Potential biocontrol *Bacillus* sp. strains isolated by an improved method from vinegar waste compost exhibit antibiosis against fungal pathogens and promote growth of cucumbers. **Biological Control**, v. 71, p. 7–15, 2014.
- LINDOW, S. E.; BRANDL, M. T. Microbiology of the phyllosphere. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 1875-1883, 2003.
- LIU, L.; LIANG, M.; LI, L.; SUN, L.; XU, Y.; GAO, J.; WANG, L.; HOU, Y.; HUANG, S. Synergistic effects of the combined application of *Bacillus subtilis* H158 and strobilurins for rice sheath blight control. **Biological Control**, v. 117, p. 182–187, 2018.
- LIU, Z.; LI, C. Y.; ZHANG, S.; FU, Y.; FAN, X.; PATEL, S. J.; ZHANG, M. Characterization of phosphate-solubilizing bacteria isolated from calcareous soils. **Applied Soil Ecology**, v. 96, p. 217–224, 2015.
- LUGTENBERG, B.; KAMILOVA, F. Plant growth-promoting rhizobacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 63, p. 541-556, 2009.
- MACAGNAN, D.; ROMEIRO, R. S.; POMELLA A. W. V.; de SOUZA, J. T. Production of lytic enzymes and siderophores, and inhibition of germination of basidiospores of *Moniliophthora* (ex *Crinipellis*) *perniciosa* by phylloplane actinomycetes. **Biological Control**, v. 47, p. 309–314, 2008.
- MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B.; ASSIS, S. M. P.; GOMES, A. M. A.; NASCIMENTO, A. R. P.; DONATO, V. M. T. S. Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, v. 1, n. 91, 2004.
- MOJICA, M.; LUNA, H. A.; SANDOVAL, C. F.; PEREYRA, B.; MORALES, L. H.; GONZÁLEZ, N. A.; HERNÁNDEZ, C. E.; ALVARADO, O. G. Control biológico de La marchitez del chile (*Capsicum annuum* L.) por *Bacillus thuringiensis*. **Revista Internacional de Botânica Experimental**, v. 78, p. 105-110, 2009.
- MOUSIVAND, M.; JOUZANI, G. S.; MONAZAH, M.; KOWSARI, M. Characterization and antagonistic potential of some native biofilm-forming and surfactant-producing *Bacillus subtilis* strains against six pathotypes of *Rhizoctonia solani*. **Journal of Plant Pathology**, v. 94, n. 1, 171-180, 2012.
- MURCI, L. A.; JORQUERA, A. M.; ÁVILA, I. Á.; RENGEL, Z.; CROWLEY, E. D.; MORA, L. M. A combination of cellular automata and agent-based models for simulating the root surface colonization by bacteria. **Ecological Modelling**, v. 247, p. 1-10, 2012.

NAEIMI, S.; OKHOVVAT, S. M.; JAVAN-NIKKHAH, M.; VÁGVÖLGYI, C.; KHOSRAVI, V.; KREDICS2LGYI, L. Biological control of *Rhizoctonia solani* AG1-1A, the causal agent of rice sheath blight with *Trichoderma* strains. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 49, p. 287-300, 2010.

NAGARAJKUMAR, M.; BHASKARAN, R.; VELAZHAHAN, R. Involvement of secondary metabolites and extracellular lytic enzymes produced by *Pseudomonas fluorescens* in inhibition of *Rhizoctonia solani*, the rice sheath blight pathogen. **Microbiological Research**, v. 159, p. 73-81, 2004.

NARAGHI, L.; HEYDARI, A.; REZAEI, S.; RAZAVI, M. MAHMOODI KHALEDI E. Biological control of tomato *Verticillium* wilt disease by *Talaromyces flavus*. **Journal of Plant Protection Research**, v. 50, n. 3, p. 341–346, 2010.

NAUREEN, Z.; HAFEEZ, F. Y.; HUSSAIN, J.; AL HARRASI, A.; BOUQELLAH, N.; ROBERTS, M. R. Suppression of incidence of *Rhizoctonia solani* in rice by siderophore producing rhizobacterial strains based on competition for iron. **European Scientific Journal January**, v. 11, n. 3, p. 186-207, 2015.

NAUTIYAL, C. S. Na efficient microbiological growth médium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, Malden, v. 170, n. 1, p. 265-270, 1999.

NAVES, M. M. V.; BASSINELLO, P. Z. Importância na nutrição humana. In: SANTOS, A. B., SONE, L. F., VIEIRA, N. R. **A cultura do arroz do Brasil**. 2. ed. rev. ampl. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2006.

OCAMPOS, C. J. G. **Bactérias isoladas do filoplano no biocontrole da altemariose e da podridão negra da couve**. Viçosa, 2010, 50f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa.

OLANREWAJU, O. S.; GLICK, B. R.; BABALOLA, O. O. Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v. 33, p. 197, 2017.

OLIVEIRA, A. G.; MURATE, L. S.; SPAGO, F. R.; LOPES, L. P.; BERANGER, J. P. O.; SAN MARTIN, J. A. B.; NOGUEIRA, M. A.; MELLO, J. C. P.; ANDRADE, C. G. T. J.; ANDRADE, G. Evaluation of the antibiotic activity of extracellular compounds produced by the *Pseudomonas* strain against the *Xanthomonas citri* pv. *citri* 306 strain. **Biological Control**, v. 56, n. 2, p. 125-131, 2011.

ONGENA, M.; JOURDAN, E.; ADAM, A.; PAQUOT, M. et al. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. **Environmental Microbiology**, v. 9, p. 1084–1090, 2007.

ONGENA, M.; JACQUES, P. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. **Trends Microbiology**, v. 16, p. 115–125, 2008.

OU, S. H. 2nd Ed., Kew, Surrey, England: Commonwealth Mycological Institute, p. 380, 1985.

PADASHT-DEHKAELI, F.; CERESINI, P. C.; ZALA, M.; OKHOVVAT, S. M.; NIKKHAH, M. J.; MCDONALD, B. A. Population genetic evidence that basidiospores play an important role in the disease cycle of rice-infecting populations of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA in Iran. **Plant Pathology**, v. 62, p. 49–58, 2013.

PAULITZ, T. C. Biochemical and ecological aspects of competition in biological control. In: BAKER, R. R. **New directions in biological control: alternatives for suppressing agricultural pests and diseases**, p. 713-724, 1990.

PENG, D.; LI, S.; WANG, J.; CHEN, C.; ZHOU, M. Integrated biological and chemical control of rice sheath blight by *Bacillus subtilis* NJ-18 and jinggangmycin. **Pest Management Science**, v. 70, p. 258–263, 2014.

PERES, F.; MOREIRA, J. C.; CLAUDIO, L. Os impactos dos agrotóxicos sobre a saúde e o ambiente. **Ciência & Saúde coletiva**, v. 12, p. 4, 2007.

PEREZ-GARCIA, A.; ROMERO, D.; DE VICENTE, A. Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of *Bacillus* in agriculture. **Curr Opi Biotech**, v. 22, n. 2, p. 187–93, 2011.

PII, Y.; MIMMO, T.; TOMASI, N.; CESCO, S.; CRECCHIO, C. Microbial interactions in the rhizosphere: beneficial influences of plant growth-promoting rhizobacteria on nutrient acquisition process. A review. **Biology and Fertility of Soils**, Firenze, v. 51, p. 403-415, 2015.

PORTO, D. S.; FARIAS, E. N. C.; CHAVES, J. S.; SOUZA, B. F.; MEDEIROS, R. D.; ZILLI, J. E.; SILVA, K. Symbiotic effectiveness of *Bradyrhizobium ingae* in promoting growth of *Inga edulis* Mart. seedlings. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. v. 41, p. 1-15. 2017.

PRABHU, A. S.; FILIPPI, M. C.; SILVA, G. B.; SANTOS, G. R. Resistência de cultivares de arroz a *Rhizoctonia solani* e *Rhizoctonia oryzae*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 37, 2002.

PRABHU, A. S.; FILIPI, M. C. C.; RIBEIRO, A. S. Doenças e seu controle. In: SANTOS, A. B.; STONE, L. F.; VIEIRA, N. R. A. **A cultura do arroz no Brasil**. 2. ed. Santo Antônio de Goiás: EMBRAPA/CNPAP, p. 561-590, 2006.

RABINDRAN, R.; VIDHYASEKARAN, P. Development of a formulation of *Pseudomonas fluorescens* PfALR2 for management of rice sheath blight. **Crop Protection**, v. 15, p. 715-721, 1996.

RAMKUMAR, B. N.; NAMPOOTHIRI, K. M.; SHEEBA, U.; JAYACHANDRAN, P.; SREESHMA, N. S.; SNEHA, S. M.; SIVAPRASAD, P. Exploring Western Ghats microbial diversity for antagonistic microorganisms against fungal phytopathogens of pepper and chickpea. **Journal of Bioscience and Biotechnology**, v. 4, p. 207–218, 2015.

RENWICK, A.; CAMPBELL, R.; COE, S. Assessment of *in vitro* screening systems for potential biocontrol agents of *Gaeumannomyces graminis*. **Plant Pathology**, v. 40, p. 524-532, 1991.

RODRIGUES, A. A.; FORZANI, V. M.; SOARES, S. R.; SIBOV, T. S.; VIEIRA, G. D. J. Isolation and selection of plant growth-promoting bacteria associated with sugarcane. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 46, n. 2, p. 149-158, 2016.

RODRIGUES, F. Á.; DATNOFF, L. E.; KORNDÖRFER, G. H.; SEEBOLD, K.W.; RUSH, M. C. Effect of silicon and host resistance on sheath blight development in rice. **Plant Disease**, v. 85, p. 827-832, 2001.

ROMEIRO, R. S. **Controle biológico de doenças de plantas – Fundamentos**. Viçosa - MG: UFV, 2007. 296 p.

ROMEIRO, R. S.; GARCIA, F. A. O. Residentes de filoplano como agentes de controle biológico de enfermidades de plantas. **Summa Phytopathologica**, v. 33, p. 143-147, 2007.

RUDRAPPA, T.; CZYMMEK, K. J.; PARE, P. W.; BAIS, H. P. Root-secreted malic acid recruits beneficial soil bacteria. **Plant Physiology**, v. 148, p. 1547–1556, 2008.

RUSH, M. C.; LEE, F. N. Sheath blight. In: Webster RK, Gunnell PS (Eds.). Compendium of Rice Diseases. **American Phytopathological Society**, St. Paul, MN, p. 22-23. 1992.

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

RYU C. M.; FARAG, M. A.; HU, C. H.; REDDY, M. S.; KLOEPPER, J. W.; PARE, P. W. Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 134, p. 1017–1026, 2004.

SADRATI, N.; DAOUD, H.; ZERROUG, A.; DAHAMNA, S.; BOUHARATI, S. Screening of antimicrobial and antioxidant secondary metabolites from endophytic fungi isolated from wheat (*Triticum durum*). **Journal of Plant Protection Research**, v. 53, n. 2 p. 128–136, 2013.

SAHARAN, B.; NEHRA, V. Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. **Life Science and Medical Research**, v. 21, p. 1–30, 2011.

SAIKIA, R.; KUMAR, R.; ARORA, D. K.; GOGOI, D. K.; AZAD, P. *Pseudomonas aeruginosa* inducing resistance against *Rhizoctonia solani*: production of salicylic acid and peroxidases. **Folia Microbiology**, v. 51, p. 375-380, 2006.

SAMAVAT, S.; BESHARATI, H.; BEHBOUDI, K. Interactions of Rhizobia cultural filtrates with *Pseudomonas fluorescens* on bean damping-off control. **Journal of Agricultural Science and Technology**, v. 13, n. 6 p. 965–976, 2011.

SAMAVAT, S.; HEYDARI, A.; ZAMANIZADEH, H.; REZAEI, S.; ALIABADI, A. A. A comparison between *Pseudomonas aureofaciens* (*chlororaphis*) and *P. fluorescens* in

biological control of cotton seedling damping-off disease. **Journal of Plant Protection Research**, v. 54, n. 2, 2014.

SARWA, M.; KREMER, R. Determination of bacterially derived auxins using a microplate method. **Letters in Applied Microbiology**, v. 20, p. 282-285, 1995.

SCHWYN, B.; NEILANDS, J. B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. **Analytical Biochemistry**, v. 160, p. 47-56, 1987.

SELIM, H. M. M.; GOMAA, N. M.; ESSA, A. M. M. Application of endophytic bacteria for the biocontrol of *Rhizoctonia solani* (Cantharellales: ceratobasidiaceae) damping-off disease in cotton seedlings. **Biocontrol Science and Technology**, v. 27, n. 1, p. 81-95, 2017.

SETHIA, B.; MUSTAFA, M.; MANOHAR, S.; PATIL, S. V.; JAYA-MOHAN, N. S.; KUMUDINI, B. S. Indole acetic acid production by fluorescent *Pseudomonas* sp. from the rhizosphere of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng and their variation in extragenic repetitive DNA sequences. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 53, p. 342-349, 2014.

SHANER, G.; FINNEY, R. E. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. **Phytopathology**, v. 67, p. 1051-1056, 1977.

SHANMUGAIAH, V.; MATHIVANAN, N.; VARGHESE, B. Purification, crystal structure and antimicrobial activity of phenazine-1-carboxamide produced by a growth-promoting biocontrol bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* MML2212. **Journal of Applied Microbiology**, v. 108, p. 703-711, 2010.

SHEN, X.; HU, H.; PENG, H.; WANG, W.; ZHANG, X. Comparative genomic analysis of four representative plant growth-promoting rhizobacteria in *Pseudomonas*. **BMC Genomics**, v. 14, p. 1471-2164, 2013.

SHRESTHA, B. K.; KARKI, H. S.; GROTH, D. E.; JUNGKHUN, N.; HAM, J. H. Biological Control Activities of Rice-Associated *Bacillus* sp. Strains against Sheath Blight and Bacterial Panicle Blight of Rice. **PLOS ONE**, v. 11, n. 1, 0146764, 2016.

SIDDIQUI, Z. PGPR: prospective biocontrol agents of plant pathogens. In: SIDDIQUI, Z. editor. PGPR: **Biocontrol and Biofertilization**, p. 111-42, 2006.

SOLANKI, M. K.; ROBERT, A. S.; SINGH, R. K.; KUMAR, S. et al. Characterization of mycolytic enzymes of *Bacillus* strains and their bio-protection role against *Rhizoctonia solani* in tomato. **Current Microbiology**, v. 65, p. 330-336, 2012.

SOLANKI, M. K.; SINGH, R. K.; SRIVASTAVA, S.; KUMAR, S.; KASHYAP, P. L.; SRIVASTAVA, A. K. Characterization of antagonistic-potential of two *Bacillus* strains and their biocontrol activity against *Rhizoctonia solani* in tomato. **Journal of Basic Microbiology**, v. 55, p. 82-90, 2015.

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

- SOUZA JÚNIOR, I. T.; SCHAFER, J. T.; CORRÊA, B. O. ; FUNCK, G. D.; MOURA, A. B. Expansion of the biocontrol spectrum of foliar diseases in rice with combinations of rhizobacteria. **Revista Ciência Agronômica**, v. 48, n. 3, p. 513-522, 2017.
- SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; REMANS, R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 31, p. 425–448, 2007.
- SPURLOCK, T. N.; ROTHROCK, C. S.; MONFORT, W. S.; GRIFFIN, T. W. The distribution and colonization of soybean by *Rhizoctonia solani* AG 11 infields rotated white rice. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 94, p. 29-36, 2016.
- SRIVASTAVA, S.; BIST, V.; SRIVASTAVA, S.; SINGH, P. C.; TRIVEDI, P. K.; ASIF, M. H.; S. CHAUHAN, P. S.; S. NAUTIYAL, C. S. Unraveling Aspects of *Bacillus amyloliquefaciens* Mediated Enhanced Production of Rice under Biotic Stress of *Rhizoctonia solani*. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, 2016.
- STADNIK, M. Indução de resistência a oídios. **Summa Phytopathologica**, v. 26, p. 175-177, 2000.
- STEFAN, M.; MIHASAN, M.; DUNCA, S. Plant growth promoting rhizobacteria can inhibit the *in vitro* germination of *Glycine max* L seeds. **Genetics and Molecular Biology**, v. 3, p. 105–110, 2008.
- STEIN, T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. **Molecular Microbiology**, v. 56, p. 845–857, 2005.
- SUÁREZ-ESTRELLA, F.; ARCOS-NIEVAS, M. A.; LÓPEZ, M. J.; VARGAS-GARCÍA, M. C.; MORENO, J. Biological control of plant pathogens by microorganisms isolated from agro-industrial composts. **Biological Control**, v. 67, p. 509–515, 2013.
- SZILAGYI-ZECCHIN, V. J.; MÓGOR, A. F.; FIGUEIREDO, G. G. O. Strategies for characterization of agriculturally important bacteria. In: SINGH, D. P.; SINGH, H. B.; PRABHA, R. Microbial inoculants in sustainable agricultural productivity, **Maunath Bhanjan: Springer**, p. 1-21, 2016.
- TAMREIHAO, K.; NINGTHOUJAM, D. S.; NIMAICHAND, S.; SINGH, E. S.; PASCAL REENA, SINGH, S. H.; NONGTHOMBA, U. Biocontrol and plant growth promoting activities of a *Streptomyces corchorusii* strain UCR3-16 and preparation of powder formulation for application as biofertilizer agents for rice plant. **Microbiological Research**, v. 192, p. 260–270, 2016.
- UL HASSAN, T.; BANO, A. The stimulatory effects of L-tryptophan and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on soil health and physiology of wheat. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 15, n. 1, p. 190-201, 2015.
- VAN LOON, L. C.; BAKKER, P. A. H. M.; PIETERSE, C. M. J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 36, n. 1, p. 453-483, 1998.

VAN LOON, L.C. *Advances in Botanical Research*, v. 51, p. 754, 2009.

WAN, M.; LI, G.; ZHANG, J.; JIANG, D.; HUANG, H. C. Effect of volatile substances of *Streptomyces platensis* F-1 on control of plant fungal diseases. **Biological Control**, v. 46, p. 552–559, 2008.

WANG, L.; LIU, L. M.; HOU, Y. X.; LI, L.; HUANG, W. S. Pathotypic and genetic diversity in the population of *Rhizoctonia solani* AG1-IA causing rice sheath blight in China. **Plant Pathology**, v. 64, p. 718–728, 2015.

WEISSKOPF, L. The potential of bacterial volatiles for crop protection against phytopathogenic fungi. In: *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education* (A. Méndez-Vilas, ed.), Formatex: Badajoz, **Spanish National Biotechnology**, p. 1352–1363, 2013.

WILSON, M.; HIRANO, S. S.; LINDOW, S. E. Location and survival of leaf-associated bacteria in relation to pathogenicity and potential for growth within the leaf. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 1435-1443. 1999.

WILSON, M.; LINDOW, S. E. Coexistence among epiphytic bacterial populations mediated through nutritional resource partitioning. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, p. 4468–4477, 1994a.

WILSON, M.; LINDOW, S. E. Ecological similarity and coexistence of epiphytic ice-nucleating (ICE+) *Pseudomonas syringae* strains and a non-ice-nucleating (ICE-) biological control agents. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, p. 3128-3137, 1994.

WILSON, M.; LINDOW, S. E. Ecological similarity and coexistence of epiphytic ice-nucleating (Ice+) *Pseudomonas syringae* strains and a non-ice-nucleating (Ice) biological control agent. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, p. 3128–3137, 1994b.

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

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

YANG, D.; WANG, B.; WANG, J.; CHEN, Y.; ZHOU, M. Activity and efficacy of *Bacillus subtilis* strain NJ-18 against rice sheath blight and Sclerotinia stem rot of rape. **Biological Control**, v. 51, p. 61–65, 2009.

YANG, J. H.; LIU, H. X.; ZHU, G.M.; PAN, Y. L.; XU, L. P.; GUO, J. H. Diversity analysis of antagonists from rice associated bacteria and their application in biocontrol of Rice diseases. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, p. 91–1, 2008.

YU, Y. Y.; JIANGA, C. H.; WANGA, C.; CHENA, L. J.; LIE, H. Y.; XUA, Q.; GUOA, J. H. An improved strategy for stable biocontrol agents selecting to control rice sheath blight caused by *Rhizoctonia solani*. **Microbiological Research**, v. 203, p. 1–9, 2017.

ZAHIR, Z. A.; ARSHAD, M.; FRANKENBERGER, W. T. Plant growth promoting rhizobacteria: Applications and perspectives in agriculture. **Advances in Agronomy**, v. 81, p. 97-168, 2004.

ZAGO, V. C. P.; DE-POLLI, H.; RUMJANEK, N. G. ***Pseudomonas* spp. Fluorescentes - Bactérias promotoras de crescimento de plantas e biocontroladoras de fitopatógenos em sistemas de produção agrícola**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, Documentos, 127, p. 04, 2000.

ZHOU, T.; CHEN, D.; LI, C.; SUN, Q.; LI, L.; LIU, F.; SHEN, Q.; SHEN, B. Isolation and characterization of *Pseudomonas brassicacearum* J12 as an antagonist against *Ralstonia solanacearum* and identification of its antimicrobial components. **Microbiological Research**, 167, 388–394, 2012.