

**CENTRO UNIVERSITÁRIO DE ANÁPOLIS – UniEVANGÉLICA
CURSO DE AGRONOMIA**

**EFICIÊNCIA DOS METABÓLITOS DE *Pseudomonas fluorescens* NA
REDUÇÃO DA COLÔNIA DOS PATÓGENOS DO ARROZ**

Adriana Mendonça Barbosa

**ANÁPOLIS-GO
2018**

ADRIANA MENDONÇA BARBOSA

**EFICIÊNCIA DOS METABÓLITOS DE *Pseudomonas fluorescens* NA
REDUÇÃO DA COLÔNIA DOS PATÓGENOS DO ARROZ**

Trabalho de conclusão de curso apresentado
ao Centro Universitário de Anápolis-
UniEvangélica, para obtenção do título de
Bacharel em Agronomia.

Área de concentração: Fitopatologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Klênia Rodrigues
Pacheco Sá.

**ANÁPOLIS-GO
2018**

Barbosa, Adriana Mendonça

Eficiência dos metabólitos de *Pseudomonas fluorescens* na redução da colônia dos patógenos do arroz./ Adriana Mendonça Barbosa. – Anápolis: Centro Universitário de Anápolis – UniEvangélica, 2018.

46 páginas.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Klênia Rodrigues Pacheco Sá

Trabalho de Conclusão de Curso – Curso de Agronomia – Centro Universitário de Anápolis – UniEvangélica, 2018.

1. Sustentabilidade. 2. Controle biológico 3. Rizobactéria I. Adriana Mendonça Barbosa . II. Extração de metabólitos de *Pseudomonas fluorescens* e sua eficiência na redução da colônia de *Magnaporthe oryzae*

CDU 504

ADRIANA MENDONÇA BARBOSA

EFICIÊNCIA DOS METABÓLITOS DE *Pseudomonas fluorescens* NA
REDUÇÃO DA COLÔNIA DOS PATÓGENOS DO ARROZ

Monografia apresentada ao Centro
Universitário de Anápolis – UniEvangélica,
para obtenção do título de Bacharel em
Agronomia.

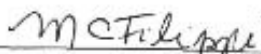
Área de concentração: Fitopatologia

Aprovada em:

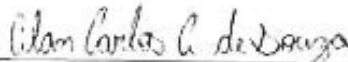
20/06/18



Prof. Dr.ª Klênia Rodrigues Pacheco Sá
UniEvangélica
Presidente



Prof. Dr.ª Marta Cristina Corsi de Filippi
Embrapa Arroz e Feijão



M. Sc. Alan Carlos Alves de Souza
Universidade Federal de Lavras

Dedico primeiramente a Deus, aos meus pais Marcio Leandro e Lucimar, ao meu irmão Daniel, minha cunhada Luciana, minha afilhada Sofia e ao meu marido Tiago pelo amor compreensão e incentivo dado a cada dia.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por tudo que tens feito na minha vida e pela oportunidade que a mim foi dada para chegar até aqui.

Aos meus pais pelo apoio e incentivo que me foi dado diariamente, nos momentos mais difíceis, por lutar tanto em minha formação. Ao meu irmão que acredita na minha capacidade e a minha cunhada Luciana pela preocupação, cuidado e pelas mensagens de conforto. Agradeço a Deus por ter me presenteado minha afilhada Sofia, a qual me proporciona força para lutar e conseguir meus objetivos.

Ao meu marido Tiago, por tudo que tens feito por mim, por nós. Pelas noites mal dormidas e por me consolar nos momentos mais difíceis que passei proporcionando alegria e amor.

Agradeço minha Madrinha Cacilda que sempre me incentivou a estudar e a lutar por aquilo que sempre quis, és um exemplo de luta e persistência.

As minhas amigas Cintia e Larissa, pelos momentos de atenção e pelo comprometimento em me fazer feliz. Agradeço também Rafael e Romário que sempre estiveram presentes na minha vida.

Aos amigos que a faculdade me presenteou, Ilton, Quezia e Ágamo por todos os momentos de descontração, apoio, alegrias e companheirismo.

Agradeço em especial aos meus amigos irmãos de todas as horas Rafael e Karla que sempre esteve ao meu lado, confiando em mim mais que tudo e por me proporcionar momentos de alegria e palavras de conforto quando eu mais precisei. Sempre estiveram comigo em todas as circunstâncias da minha vida. Serei eternamente grata a tudo que fazem e fizeram por mim, e agradeço a Deus pela vida de vocês.

Ao Centro Universitário de Anápolis - UniEVANGÉLICA, a todos os professores e equipe que contribuíram para minha formação.

A professora Klênia Rodrigues Pacheco Sá por toda paciência, cuidado, incentivo e por me direcionar a pesquisa, me estimulando buscar conhecimento e me aperfeiçoar naquilo que almejo. Vou levar comigo seus ensinamentos e será sempre um espelho profissional para mim.

Ao laboratório de Fitopatologia Da Embrapa Arroz e Feijão, Mônica, Anaíres, Elder, e principalmente Marcio Vinícius pelos ensinamentos atribuídos e pela persistência junto a mim na pesquisa.

A Dra. Marta Cristina por me construir diariamente como cientista, pelos desafios proporcionados e por acreditar na minha capacidade.

Aos amigos que a Embrapa me presenteou Marina, Bruna Alícia e Alan pela amizade, companheirismo, dedicação e comprometimento em me integrar na pesquisa e fazer desta uma atividade prazerosa.

Aos colegas Leilane, Amanda, Thatyane, Daniele, Maythsulene por todo carinho e ensinamento.

A todos, meu muito obrigada.

“As pessoas nunca perdem por serem humildes”.

Márcio Leandro Barbosa

ÍNDICE DE TABELA

TABELA 1 - Composição do meio de cultura NBRIP.....	21
TABELA 2 - Média da área da colônia de <i>Magnaporthe oryzae</i> desenvolvida durante o antagonismo com <i>Pseudomonas fluorescens in natura</i>	30
TABELA 3 - Área das colônias de <i>Magnaporthe oryzae</i> sob diferentes concentrações de metabólito de <i>Pseudomonas fluorescens</i> , utilizando a metodologia 1.....	32
TABELA 4 - Área das colônias de <i>Magnaporthe oryzae</i> sob diferentes concentrações de metabólito de <i>Pseudomonas fluorescens</i> , utilizando a metodologia 2.....	33
TABELA 5 - Teste T ($P < 0,05$) da redução da área da colônia de <i>Bipolares oryzae</i> e <i>Rhizoctnia solani</i> e a formação de escleródios por <i>R. solani</i> submetidas a pareamento com <i>Pseudomonas fluorescens</i>	35
TABELA 6 - Teste T ($P < 0,05$) da redução da área da colônia de <i>Bipolares oryzae</i> e <i>Rhizoctonia solani</i> e a formação de escleródios por <i>R. solani</i> submetidas a pareamento com os metabólitos de <i>Pseudomonas fluorescens</i> extraídos em diferentes horários.....	36

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 - Colônia das rizobactérias, (1) <i>Burkholderia pyrrocinia</i> (BRM 32113 - R46), (2) <i>Bacillus sp</i> (BRM 32109 - 138.7), (3) <i>Pseudomonas fluorescens</i> (BRM 32111 - R55) e (4) <i>Bacillus sp</i> (BRM 32110 - 82R).....	20
FIGURA 2 - Colônia de <i>Pseudomonas fluorescens</i> (BRM 32111).....	22
FIGURA 3 - Na figura A, observa-se a metodologia 1, denominada “cavidades” e na figura b, a metodologia 2 do teste de voláteis sendo que P1” adicionamos o patógeno <i>Magnaporthe oryzae</i> e P2” adicionamos as diferentes dosagens de metabólitos de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	25
FIGURA 4 - Formação de biofilme por rizobactérias <i>Pseudomonas fluorescens</i> (R55), <i>Burkholderia pyrrocinia</i> (R46), <i>Bacillus sp</i> .(138.7) e <i>Bacillus sp</i> (82R).....	26
FIGURA 5 - Solubilização de fósforo inorgânico por rizobactérias <i>Pseudomonas fluorescens</i> (R55), <i>Burkholderia pyrrocinia</i> (R46), <i>Bacillus sp</i> .(138.7) e <i>Bacillus sp</i> (82R).....	28
FIGURA 6 - Variação de crescimento de <i>Pseudomonas fluorescens</i> quantificado durante 96 horas.....	30
FIGURA 7 - Antagonismo entre <i>Pseudomonas fluorescens</i> e <i>Magnaporthe oryzae</i> . A figura A representa a metodologia quadrangular, figura B representa a metodologia de linha e a figura C representa o teste de voláteis.....	31
FIGURA 8 - Antagonismo <i>in natura</i> entre <i>Pseudomonas fluorescens</i> e os patógenos <i>Rhizoctonia solani</i> (A) e <i>Bipolares oryzae</i> (B). As imagens do lado direito compreendem o tratamento controle e as imagens do lado esquerdo são os tratamentos.....	34
FIGURA 9 - Antagonismo entre o metabólito de <i>Pseudomonas fluorescens</i> extraído em 16 horas após crescimento inicial, contra <i>Rhizoctonia solani</i> (Rs) e <i>Bipolares oryzae</i> (Ho).....	36

SUMÁRIO

RESUMO	x
1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1. CULTURA DO ARROZ	13
2.2. BRUSONE.....	14
2.3. CONTROLE BIOLÓGICO	15
2.4. AGENTE BIOLÓGICO - <i>Pseudomonas fluorescens</i>	16
2.5. METABÓLITOS BACTERIANOS.....	17
3. MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1. CARACTERIZAÇÕES BIOQUÍMICAS.....	20
3.1.1. Produção de biofilme	20
3.1.2. Solubilização de fosfato	21
3.2. RIZOBACTÉRIA <i>Pseudomonas fluorescens</i> (BRM 32111).....	21
3.3. CURVA DE CRESCIMENTO DE <i>Pseudomonas fluorescens</i>	22
3.4. ANTAGONISMO <i>in natura</i> ENTRE <i>Pseudomonas fluorescens</i> E <i>Magnaporthe oryzae</i>	23
3.5. EXTRAÇÃO DE METABÓLITOS DE <i>Pseudomonas fluorescens</i> E METODOLOGIAS DE CARACTERIZAÇÃO COMO ANTAGONISTA	24
3.6. AVALIAÇÃO DO ANTAGONISMO DA <i>Pseudomonas fluorescens</i> CONTRA <i>Bipolares oryzae</i> E <i>Rhizoctônia solani</i> PATÓGENOS DA CULTURA DO ARROZ	25
3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	26
4.1. CARACTERIZAÇÕES BIOQUÍMICAS.....	26
4.1.1. PRODUÇÃO DE BIOFILME.....	26
4.1.2. SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO.....	28
4.2. CURVA DE CRESCIMENTO DE <i>Pseudomonas fluorescens</i>	29
4.3. ANTAGONISMO <i>in natura</i> ENTRE <i>Pseudomonas fluorescens</i> E <i>Magnaporthe oryzae</i>	30

4.4. EXTRAÇÃO DE METABÓLITOS DE <i>Pseudomonas fluorescens</i> E METODOLOGIAS DE CARACTERIZAÇÃO COMO ANTAGONISTA	31
4.5. AVALIAÇÃO DO ANTAGONISMO DA <i>Pseudomonas fluorescens</i> CONTRA <i>Bipolares oryzae</i> E <i>Rhizoctônia solani</i> PATÓGENOS DA CULTURA DO ARROZ	34
5. CONCLUSÕES.....	37
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

RESUMO

A cultura do arroz (*Oryza sativa*) é ameaçada por fatores que tendem a limitar a sua produção. A brusone (*Magnaporthe oryzae*) é a principal doença do arroz causando perdas de até 100% da produção. A rizobactéria *Pseudomonas fluorescens* vem se destacando como agente biológico, antifúngico, indutor de resistência e promotor de crescimento que afetam benéficamente a produtividade do arroz. Este trabalho teve por objetivo verificar a eficiência de metabólitos de *Pseudomonas fluorescens* (BRM 32111), em diferentes concentrações, na redução micelial de *M. oryzae*. Avaliou-se a partir das bactérias benéficas da coleção da embrapa arroz e feijão a eficiência na formação de biofilme e solubilização de fosfato. Foram realizados 3 testes com 4 repetições para verificar a natureza antagonista da rizobactéria *P. fluorescens* contra o patógeno *M. oryzae*. No primeiro teste, com a bactéria *in natura*, foi realizado pareamento com um disco do patógeno envolto por um cultivo quadrangular e em forma de linha com a rizobactéria ajustada a absorvância de 0,500abs. Posteriormente, foram realizadas as extrações dos metabólitos submetidos a diferentes horários de crescimento em caldo nutriente, com 6, 16, 24, 48, 72 e 96 horas, nos quais foram devidamente centrifugados e filtrados por filtro de membrana de 22 e 45nm. Foram realizadas duas metodologias distintas para análise de eficiência do mesmo, sob diferentes concentrações e pareados com o patógeno *M. oryzae* avaliando a área da colônia do patógeno sete dias após incubação condicionados a temperatura controlada e luz branca. Para teste com os filtrados, na metodologia 1, em placa de Petri contendo meio de cultura BDA, foram realizados quatro poços em volta do patógeno situado no centro da placa onde foram aliqüotados as diferentes concentrações de metabólitos (0, 20, 50, 100, 150 e 200µl), distribuídas por igual entre os poços. Na metodologia 2, diferentes concentrações de metabólitos extraídos em diferentes horários, foram incorporados no meio de cultura BDA, uma placa contendo metabólito incorporado e outra contendo o patógeno foram sobrepostas, vedadas e incubadas para verificação da ação dos voláteis. Todas as bactérias apresentaram eficiência na solubilização de fosfato e somente a *P. fluorescens* na formação de biofilme. No pareamento com a bactéria *in natura*, observou-se que todos os tratamentos se diferiram estatisticamente do controle exceto no teste de voláteis, no qual não apresentou diferença. No teste com os filtrados, na metodologia 1, os metabólitos extraídos em 16 horas apresentaram diferença significativa bastante expressiva, seguido pelos tratamentos de 48, 24 e 6 horas apresentando menores médias comparados ao controle. No pareamento através de voláteis, metodologia 2, o tratamento de 72 horas, apresentou melhor resultado na redução da área da colônia de *M. oryzae* em relação ao controle ao comparar as médias. Portanto, conclui-se que, a extração de metabólitos de *P. fluorescens* é mediado por 16 a 48 horas a partir do crescimento inicial de células, sendo um agente promissor no controle biológico de doenças. Este trabalho proporcionou uma base metodológica para extração de metabólitos bacterianos de *P. fluorescens* com grande viabilidade e eficiência.

Palavras-chave: Controle biológico, Rizobactéria, Sustentabilidade.

1. INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa*) é um cereal consumido por milhares de pessoas dentre os mais diversos continentes. Na América Latina, são consumidos, em média, 30 kg⁻¹ habitante⁻¹ ano⁻¹, pelo que o Brasil se destaca como grande consumidor, com média de 45 a 30 kg⁻¹ pessoa⁻¹ ano⁻¹ (FAO, 2016). No Brasil, na safra 2016/17, a produção pressupõe-se a 11.865,2 milhões de toneladas, um aumento de 11,9% em relação à safra passada, mesmo com redução de 3,3% da área plantada. O Brasil destaca-se por ser o nono maior produtor mundial com taxas de exportação de 40,3 mil toneladas de arroz base casca e importação de 100,1 mil toneladas em dezembro de 2016 (CONAB, 2017), sendo assim considerado o maior produtor fora do continente Asiático.

A cultura do arroz é ameaçada por fatores que tendem a limitar a sua produção, como incidência de pragas, doenças e fatores climáticos nos quais atingem drasticamente sua produtividade e qualidade dos grãos. As doenças que apresentam maior comprometimento econômico na cultura do arroz, são de origens fúngicas. As principais doenças do arroz são brusone, mancha parda, manchas dos grãos e escaldadura (WEBSTER; GUNNELL, 1992; PRABHU; FILIPPI, 1997).

A brusone causada pelo fungo *Magnaporthe oryzae*, [anamorfo *Pyricularia oryzae*] produz perdas de até 100% da produtividade do arroz (PRABHU et al., 2009), sendo a principal doença de arroz no planeta. Esta doença ocorre desde o estágio de plântula até a fase de maturação da cultura (PRABHU; FILIPPI, 2006). A severidade da doença na planta depende gradativamente de sua cultivar e do manejo adotado. Existem cultivares altamente suscetíveis a brusone onde os danos podem comprometer toda lavoura. Condições climática favoráveis, sistemas de plantio e presença de plantas daninhas podem ser fatores precursores para instalação da doença. As perdas causadas por brusone nas folhas são indiretas e afetam a fotossíntese e a respiração (BASTIAANS et al., 1994). Nas panículas, os danos são diretos, em virtude de seu efeito em diferentes componentes de produção (PRABHU et al., 2003).

O sistema de manejo integrado da brusone objetiva controlar a população do patógeno a níveis toleráveis, sem causar danos econômicos à cultura, mediante a adoção de um conjunto de medidas preventivas, de maneira não isolada, como a resistência genética da cultivar, práticas culturais e controle químico. A aplicação de fungicidas no controle de doenças torna-se importante, quando o grau de resistência da cultivar é ineficaz (PRABHU; FILIPPI, 2006). O controle biológico vem sendo uma alternativa de interação benéfica entre planta e

microrganismos, atuando no Manejo Integrado de Doenças e Pragas (MIP/MID), (GARCIA et al., 2015).

Há uma demanda crescente por estratégias ecologicamente corretas na agricultura e segundo WHIPPS, (2001), bactérias e os fungos têm uma sistêmica interação com suas plantas hospedeiras e são capazes de promover o crescimento das plantas, resistência contra patógenos e parasitas, maior resistência a condições de estresse biótico. Portanto a utilização de rizobactérias vem tomando espaço nos estudos destinados ao controle biológico. Bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Serratia*, vem sendo utilizada para supressão de doenças do arroz.

A rizobactéria *Pseudomonas fluorescens*, demonstra ser agente potencial para o controle biológico que reprime as doenças das plantas, protegendo as sementes e as raízes da infecção por fungos. Essas rizobacterias são conhecidas por promover o crescimento das plantas e reduzir a gravidade de muitas doenças de ordem fúngica. A indução de resistência sistêmica às doenças e o aumento do crescimento da planta por meio de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas em condições de campo são caracterizadas (HOFFLAND et al., 1996). As rizobactérias apresentam alternativa promissora de uso como agente de controle biológico, estando indiretamente relacionadas com a produção de metabólitos, como antibióticos, sideróforos e ácido hidrocianico, que diminuem o crescimento de fitopatógenos (MYOUNGSU et al., 2005).

As extrações de metabólitos secundários permitem identificar e quantificar moléculas de ação antagonista que tem papel fundamental para controlar patógenos. Estes podem atuar como antibiose, antagonista ou até mesmo competidor. A produção de metabólitos pode resultar na completa lise e dissolução da estrutura celular e independente do contato físico entre os microrganismos. (BETTIOL; GHINI, 1995).

Visando as necessidades de implantação de agentes de biocontrole para a supressão de doenças da cultura do arroz, este trabalho teve por objetivo verificar a eficiência de metabólitos de *Pseudomonas fluorescens* (BRM 32111), em diferentes concentrações, no controle da incidência de Brusone na orizicultura.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. CULTURA DO ARROZ (*Oryza sativa* L.)

O arroz (*Oryza sativa*) originou-se na Ásia e se espalhou para os outros continentes, sendo uma das principais fontes de carboidrato e alimento básico predominante na dieta mundial, desempenhando um importante papel econômico e social (MCLEAN et al., 2002). O arroz é uma planta da família das gramíneas, do gênero *Oryza*, que possui em torno de vinte espécies, sendo a mais cultivada a *Oryza sativa* (JULIANO, 1993).

O Brasil é o nono maior produtor mundial, destacando-se como o maior produtor fora do continente asiático. O grande volume produzido nos Estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina é considerado estabilizador para o mercado brasileiro de arroz e garante o seu suprimento à população brasileira. Quase todo o arroz produzido nestes dois Estados apresenta grãos da classe longo-fino e com alta qualidade de cocção, características exigidas pelo mercado brasileiro, principalmente nas Regiões Sul e Sudeste (SOSBAI, 2014).

Sua botânica complexa apresenta características individuais na qual exprimem claramente suas particularidades. As raízes seminais, surgem da coleoriza logo após o seu aparecimento e é seguida por uma ou duas raízes seminais secundárias, todas elas desenvolvendo raízes laterais com estruturas parenquimáticas em forma de aerênquimas, nos quais são responsáveis pelo seu desempenho em sistema irrigado e/ou inundação. A última folha a surgir em cada colmo denomina-se folha-bandeira, aquela considerada principal, na qual destina seus fotoassimilados para o enchimento de grão das panículas. O caule da planta de arroz é composto por um colmo principal e um número variável de colmos primários e secundários denominados perfilho. Durante o período vegetativo, um perfilho é visualizado com uma estrutura composta de folhas e gema axilares conforme o colmo principal. A inflorescência determinada da planta de arroz denomina-se panícula. Está localizada sobre o último entrenó do caule, erroneamente considerado como um pedúnculo e é subtendida pela folha-bandeira. (PRABHU et al., 2006). O grão é formado pelo tegumento, que envolve a semente e se encontra diretamente ligado ao pericarpo, membrana que envolve o fruto. O pericarpo é envolvido pelas glumelas, pela lema e pela pálea, que constituem a casca e são removidas durante o beneficiamento (VIEIRA; CARVALHO, 1999).

O sistema de cultivo de arroz pode ser implantado de duas formas distintas: arroz de terras altas (sequeiro) e irrigado (terras baixas). O sistema de terras altas é caracterizado pela condição aeróbica de desenvolvimento radicular da planta. O arroz pode ser cultivado com

irrigação suplementar por aspersão ou sem irrigação, ou seja, a disponibilidade de água para a cultura é totalmente dependente da precipitação pluvial. O sistema de cultivo de arroz com irrigação por aspersão caracteriza-se pelo intenso uso do solo, com rotação de culturas e elevado uso de tecnologia (EMBRAPA, 2008).

O arroz possui classificação imposta pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) do Brasil, de acordo com a Instrução Normativa N.º 6 de 16/02/2009, como arroz em casca natural e beneficiado (integral, polido, parabolizado), sendo dividido em classes: longo fino, longo, médio, curto e misturado. Após a colheita, o arroz é seco para atingir o grau de umidade de 12%, armazenado em silos e encaminhado para o beneficiamento (BRASIL, 2009).

2.2. BRUSONE (*Magnaporthe oryzae*)

Considerada a principal doença da cultura do arroz, a brusone pode causar perdas de até 100% da produtividade da lavoura de arroz. A brusone (*Magnaporthe oryzae* (Herbert) Barr, forma imperfeita *Pyricularia oryzae* (Cooke) Sacc.), pode ser encontrada em todos os estádios da cultura desde plântula até a fase de maturação da cultura (PRABHU, 2008).

Os sintomas nas folhas são caracterizados por pequenas lesões necróticas, de coloração marrom, que evoluem, tornando-se elípticas e centro cinza ou esbranquiçado. Em condições favoráveis, as lesões coalescem, causando a morte das folhas ou da planta inteira, (WILSON; TALBOT, 2009; WEBSTER; GUNNELL, 1992). Nas panículas os danos são diretos, devido ao seu efeito no enchimento de grãos onde a doença interrompe o fluxo de seiva para os grãos, provocando a redução no peso de grãos e até mesmo a esterilidade completa da panícula, resultando em danos na produtividade que podem chegar a 100% (PRABHU et al., 2003). A brusone de pescoço é aquela infecção do nó da base da panícula que impede a passagem de fotoassimilados. Os grãos são infectados logo após a emissão até a fase de grão leitoso serão totalmente chochos, já aqueles atacados mais tarde sofrem redução no peso (LOBO; FILIPPI, 2017).

Segundo PRABHU (2002), as fases do ciclo da doença, desde a germinação dos esporos até o desenvolvimento das lesões, são altamente influenciadas pelos fatores climáticos. O mais crucial é o período de molhamento das folhas pela chuva ou pela deposição do orvalho. A temperatura ideal para o rápido desenvolvimento da brusone varia entre 20- 25°C. O desenvolvimento da infecção é acelerado quando a umidade relativa do ar é superior a 93%.

Para controle da brusone do arroz, se faz necessário o manejo integrado de doenças. Medidas preventivas devem ser tomadas tais como espaçamento e densidade de plantio adequados, plantio contrário ao sentido do vento, irrigação e drenagem, variedades resistentes ou moderadamente resistentes. O uso de adubação nitrogenada é um fator de extrema importância pois em excesso pode aumentar a susceptibilidade a doença. O controle de plantas daninhas exprime importância por ser uma fonte de inóculo bastante comum e favorecer o desenvolvimento da doença gerando microclima propício. O uso de químicos é o mais utilizado tanto no tratamento de sementes quando em pulverizações onde diversas aplicações devem ser realizadas durante o ciclo da cultura. Atualmente, o controle biológico vem sendo uma alternativa de manejo integrado na qual permite reduzir o número de aplicações químicas sucessivas e induzir melhorias fitossanitárias para as orízicolas que garantem a sustentabilidade do sistema de produção (LOBO; FILIPPI, 2017).

2.3. CONTROLE BIOLÓGICO

O uso intensivo de agrotóxico para controle de pragas, doenças e plantas invasoras, vem sendo umas das principais causas de discussões no ramo produtivo e na cadeia alimentar. Altos índices de resíduos químicos são encontrados nos alimentos prejudicando a saúde do homem e do meio ambiente. Algumas moléculas dispostas nos ingredientes ativo dos produtos comerciais contribuem para o surgimento de doenças iatrogênicas e a escassez de componentes biológicos de ordem benéfica no solo e no ecossistema geral (BETTIOL; GHINI, 2003).

O cenário agrícola vem sofrendo modificações, exigindo do mercado produtos sem adição de defensivos químicos ou sua utilização adequada firmada por selo. Entretanto, o controle biológico abrange uma alternativa exploratória podendo utilizar recursos naturais não substituindo inteiramente o produto químico pelo biológico, mas promover uma agricultura sustentável menos dependentes do uso de agrotóxicos (BIRD et al., 1990).

O controle biológico tem-se por função a utilização de microrganismos naturais, encontrados na natureza, ou seja, um microrganismo controlando outro microrganismo, que possuem ação antagonista por antibiose, competição, predação, hipovirulência, indução de defesa do hospedeiro, antifúngica ou bactericida produzidos por fungos, bactérias e até mesmo por outras plantas através de produção de metabólitos secundários (BETTIOL, 1991).

Contudo, a diversidade da microbiota natural, bem como suas relações antagônicas, são ferramentas importantes no controle biológico. Algumas bactérias isoladas da rizosfera e

rizoplano de plantas podem promover o crescimento das plantas e controlar fitopatógenos de solo e possuem capacidade de crescer e colonizar o sistema radicular, inibindo sua ação (LUCON, 2008).

As rizobactérias que promovem o crescimento de plantas são bactérias do solo que habitam em torno da superfície da raiz e estão direto ou indiretamente envolvidas na promoção do crescimento e desenvolvimento das plantas, através da produção e secreção de substâncias químicas regulatórias nas proximidades da rizosfera. Estas apresentam características de aquisição de nutrientes ou moduladores de níveis de hormônios na planta (AHEMAD; KIBRET, 2013).

2.4. AGENTE BIOLÓGICO - *Pseudomonas fluorescens*

A rizobactéria *Pseudomonas fluorescens* tem forma de bacilo, caracterizada gram-negativa, de aspecto direta ou ligeiramente curvas e saprófitas. São encontradas no ecossistema aquático e no solo. A temperatura ideal para seu desenvolvimento é de 25 a 30 ° C, embora pode crescer de 5 a 42 ° C. Requer pH neutro e não cresce sob condições ácidas. Com característica de mobilidade livre, seus flagelos possibilitam o seu movimento ativo em meio líquido. Apresenta pigmento fluorescente (fluoresceína) visivelmente observado sob luz ultravioleta (ALVARÉZ et al., 2015).

A *P. fluorescens* é capaz de habitar em muitos ambientes como plantas, solo e superfícies de água. Esta reside na rizosfera da planta e produz uma variedade de metabólitos secundários, incluindo antibióticos contra patógenos de plantas de solo. As bactérias do gênero *Pseudomonas* tem grande capacidade de usar a diversidade de nutrientes, pelo que sua onipresença é explicada. Sua atividade enzimática, faz deles um grupo de importantes microrganismos, porque são responsáveis pela degradação aeróbia de muitos em diferentes ecossistemas (NAVA et al., 2012).

Ação de múltiplos mecanismos exercem controle biológico efetivo, incluindo antagonismo direto e indução de resistência em a planta (LEE et al., 2013). No entanto, as *Pseudomonas* não possuem a capacidade de produzir esporos de resistência, que limita sua formulação para uso comercial sendo uma das espécies mais estudadas pois produzem metabólitos como sideróforos, antibióticos, compostos voláteis, enzimas e fitohormônios (SHOWKAT et al., 2012).

Outro aspecto importante é que as *Pseudomonas fluorescens* produzem substâncias favoráveis ao crescimento das plantas de ordem hormonal como auxina, giberelina e citocininas com grande capacidade de solubilizar o fósforo. A bactéria pode realizar esta ação através de dois canais: o primeiro é a produção de ácidos orgânicos (cítrico, oxálico, glucônico) que atuam sobre o pH do solo, favorecendo a solubilização do fósforo inorgânico e liberação fosfato para o solo. A outra rota é através da fosfatases, estas são enzimas hidrolases (Monoesterases e diésterases fosfóricas) que atuam nas ligações éster, liberando os grupos fosfato de matéria orgânica. Ambas as formas geram uma quantidade de fosfato disponível para ser absorvido pelas raízes das plantas (CORNELI, 2008).

Essas rizobactérias são denominadas PGPB (Plant Growth Promoting Bacteria), ou seja, Bactérias Promotoras de Crescimento que favorece beneficemente as plantas através do seu próprio metabolismo (solubilização de fosfatos, produção de hormônios, fixação de nitrogênio), produzindo benefícios ao metabolismo das plantas aumentando a ingestão de água e minerais, melhorando o crescimento e resistência das raízes e a atividade enzimática de plantas. As PGPB's podem promover, diretamente, o crescimento de plantas através de diferentes mecanismos de ação. Os efeitos diretos são evidentes na ausência de outros microrganismos, e incluem Fixação biológica de nitrogênio (FBN) e sistemas fitormonais. Mecanismos indiretos são revelados quando ocorre a interação do microrganismo de interesse com um fitopatógeno, diminuindo os efeitos nocivos deste último na planta. Os mecanismos de ação: competição por um nicho ou substrato ecológico, produção de inibidores aleloquímicos e resistência sistêmica nas plantas hospeda um amplo espectro de agentes patogênicos e / ou estresse (MAYAK et al., 2004; RIVES et al., 2012).

A *P. fluorescens* como PGPR são amplamente utilizadas em várias culturas, pela sua capacidade em colonizar as raízes e promover o crescimento das plantas e ação remediadora estabelecida na inserção de agentes patogênicos. Além disso eles favorecem a absorção de água e nutrientes, de modo que favorece aspectos vegetativos mais vigorosos como consequência alto teor produtivo e tolerância as condições climáticas adversas (ALVARÉZ et al., 2015).

2.5. METABÓLITOS BACTERIANOS

Os metabólitos são compostos químicos extracelulares secretados no meio de cultura, durante o crescimento e diferenciação de um organismo vivo (DREYFUSS; CHAPELA, 1994). Em relação aos microrganismos há uma importância de identificar e caracterizar novos

compostos químicos que possibilite a obtenção de substâncias capazes de controlar ou inibir o desenvolvimento dos fitopatógenos (SILVA et al., 2009). Contudo, a pesquisa de compostos químicos de fontes naturais surge como alternativa na busca de novas moléculas antimicrobianas (SILVA; SOUZA, 2016).

Bactérias do grupo fluorescente de *Pseudomonas spp.* atuam na produção de fitormônios, como o ácido-indol-acético (AIA), ácido cianídrico (HCN), composto volátil que inibe o desenvolvimento de fitopatógenos no ambiente. As rizobactérias promotoras de crescimento atuam na produção de hormônios de crescimento, como auxinas (ASGHAR et al., 2002), a solubilização de fosfatos minerais (FREITAS et al., 1997), produção de b-1,3-glucanase (FRIDLENDER et al., 1993), antibióticos (RAAIJMAKERS et al., 1997), ácido cianídrico (OWEN; ZDOR, 2001) e sideróforos (PIDELLO, 2003). Estes compostos químicos produzidos por microrganismos são denominados metabólitos secundários (UTKHEDE et al., 2000).

A utilização de microrganismos como fonte de substâncias bioativas captaram a atenção da pesquisa (BERTRAND et al., 2014). Os micróbios têm um grande potencial para atividades biológicas e o uso de fermentação em grande escala podem reduzir os custos de produção de compostos derivados de micróbios. Os antagonistas estão entre os microrganismos com um grande potencial para produzir metabólitos bioativos que pode inibir, parcial ou totalmente, o crescimento de agentes patogênicos. Estes foram usados em sistemas de controle biológico com resultados excelentes (VAN EEDEN; KORSTEN, 2013).

Para a extração de metabólitos é necessário que entenda inteiramente a morfologia e fisiologia do microrganismo. Sabe-se que o esgotamento de nutrientes gera estresse respostas em micróbios, como motilidade, secreção de enzimas extracelulares, competências para transformação genética, produção de antibióticos ou outros compostos bioativos (GRANADA et al, 2014; THINES et al, 2014).

Segundo VILLA (2009), várias estirpes de *P. fluorescens* apresentaram efeitos antagonista contra o fungo *Sclerotium rolsii*, produzindo inibição do crescimento micelial 60-90%, por excreção de sideróforos e anti-metabolitos fúngicos. A utilização de extratos produzidos por *Pseudomonas spp.* apresenta uma alternativa interessante para resolver as limitações de biomassa celular na extração de metabolitos extracelulares produzidos durante o crescimento bacteriano e induzir resposta de defesa ou de produzir uma ação antifúngica (OYOQUE et al., 2011).

Em forma natural, os metabólitos extracelulares ocorrem na presença a ou ausência de vários nutrientes ou sob a influência de determinadas condições ambientais. Fatores abióticos como fonte de carbono, fonte de azoto, ferro presente no meio de cultura ou valores pH estão entre os mais importantes para a produção de compostos que inibem o crescimento de fungos fitopatogénicos (ALSTRÖM, 1987).

Estudos realizados por BATTU; REDDY (2009) cultivou *Pseudomonas fluorescens* em meio de cultura utilizando glicose como fonte de carbono e extratos brutos secos obtido com acetato de etilo, que resultou inibição de 89 e 90% para fungos fitopatogénicos *Pyricularia. oryzae* e *Rhizotonia solani*, respectivamente, em ensaios *in vitro*, confirmando que a fonte de carbono tem fundamental importância ao induzir a produção de metabólitos antifúngicos, tais como o floroglucinol. As fenazinas são metabólitos chave para controle biológico na natureza e cuja a produção é induzida pela presença de glicerol (ROMERO, 2014).

O pH do solo modifica a eficácia de compostos anti-fúngicos, aumentando eficácia biológica em pH menor que sete (BRISBANE et al., 1987). Um outro fator importante para o uso de metabólitos secundários é a densidade celular bacteriana para produção e floroglucinol e fenazina ser diretamente proporcional à densidade do meio de cultura (MAVRODI et al., 2012).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Microbiologia Agrícola (LMA) da Embrapa Arroz e Feijão, localizado em Santo Antônio de Goiás – GO, com latitude de 16.5067° S e longitude de 49°28'36'' W e altitude de 823 M. Os isolados bacterianos utilizados foram *Bacillus* sp. (BRM 32109 - 138.7), *Bacillus* sp. (BRM 32110 - 82R), *Pseudomonas fluorescens* (BRM 32111 - R55) e *Burkholderia pyrrocinia* (BRM 32113 - R46), (Figura 1), que são pertencentes a Coleção de Microrganismos da instituição, nos quais existem um histórico de estudos baseado no controle biológico de doenças e após o processo de seleção das bactérias nos ensaios seguintes foram utilizados somente a bactéria *P. fluorescens* nomeada R55 e registrada como BRM 32111.

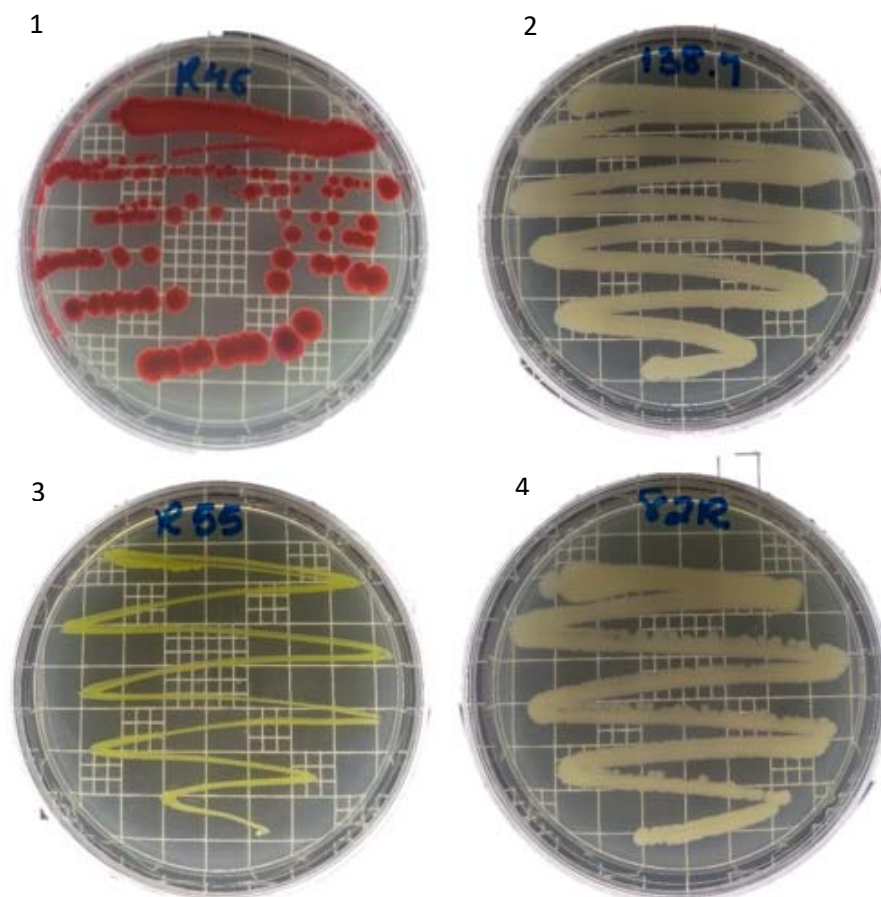


FIGURA 1 - Colônia das rizobactérias, (1) *Burkholderia pyrrocinia* (BRM 32113 - R46), (2) *Bacillus sp* (BRM 32109 - 138.7), (3) *Pseudomonas fluorescens* (BRM 32111 - R55) e (4) *Bacillus sp* (BRM 32110 - 82R).

3.1. CARACTERIZAÇÕES BIOQUÍMICAS

3.1.1. Produção de biofilme

Neste ensaio foi realizado a caracterização da produção de biofilme em ágar Congo Red (CRA). Para esse teste foram utilizados as bactérias *Bacillus sp* (BRM 32109 - 138.7), *Bacillus sp* (BRM 32110 - 82R), *P. fluorescens* (BRM 32111 - R55) e *B. pyrrocinia* (BRM 32113 - R46). Em primeira instância, as bactérias foram cultivadas em meio de cultura Ágar Nutriente e incubadas na BOD a 28° C por 4 dias. Em seguida, com o auxílio de uma alça de platina, as colônias foram transferidas do meio de cultura Ágar Nutriente para o meio de cultura CRA onde foram incubadas por 48h a 37°C. A detecção foi realizada de acordo com a coloração. Foram consideradas como amostras produtoras de biofilme aquelas com colônia de cor preta, escuro, opaca com aspecto seco. Amostras que apresentaram cores de vermelhas bordô foram

consideradas incapazes de produzir esse fator de colonização (MATHUR, 2006, FREEMAN et al., 1989).

3.1.2. Solubilização de fosfato

No teste de solubilização de fosfato, foram utilizadas as bactérias do ensaio do item 3.2.1. Para avaliar a capacidade das rizobactérias em solubilizar fosfato inorgânico, utilizou-se o método da National Botanical Research Institute's phosphate growth medium (NBRIP), por NAUTIYAL (1999), que se baseia na adição de fosfato insolúvel ao meio. O meio de cultura utilizado foi preparado conforme Tabela 1 e o pH do meio foi ajustado para 7,0. Após o ajuste do pH o meio de cultura NBRIP foi autoclavado por 20 minutos e vertido em placa de Petri estéril. As bactérias utilizadas estavam conservadas em solução salina a 0,85% em temperatura ambiente. Para controle negativo foi utilizado cepa da bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv *phaseoli* (xap) pertencente a coleção de Microrganismos Multifuncionais do Laboratório de Microbiologia Agrícola, como agente não solubilizador de fosforo. As bactérias foram aliquotados com auxílio de uma pipeta, com um volume final de 10 µl distribuídos em cinco pontos distintos na placa de Petri meio de cultura NBRIP. Incubou-se em BOD a 28°C, por dois dias. Após esse período, foram realizadas as avaliações. Os organismos capazes de solubilizar fosfato formam um halo claro em torno de suas colônias.

TABELA 1: Composição do meio de cultura NBRIP.

Fórmula química	Quantidade
Ca ₃ (PO ₄) ₂	5g
MgCl ₂ 6H ₂ O	5g
Glucose	10g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,25g
KCl	0,2g
Ágar	15g
(NH ₄)SO ₄	0,1g
H ₂ O deionizada	1000 ml

3.2. RIZOBACTÉRIA *Pseudomonas fluorescens* (BRM 32111)

Devido aos resultados obtidos nos ensaios anteriores, foi selecionado a bactéria *P. fluorescens* (BRM 32111) para a realização dos próximos ensaios (Figura 2). Sua ação de

biocontrole foi comprovada em trabalhos anteriores com eficácia significativa e comprovada contra o patógeno *M. oryzae* (Py 461 – Py 10900) na cultura do arroz (FILIPPI et al., 2011).

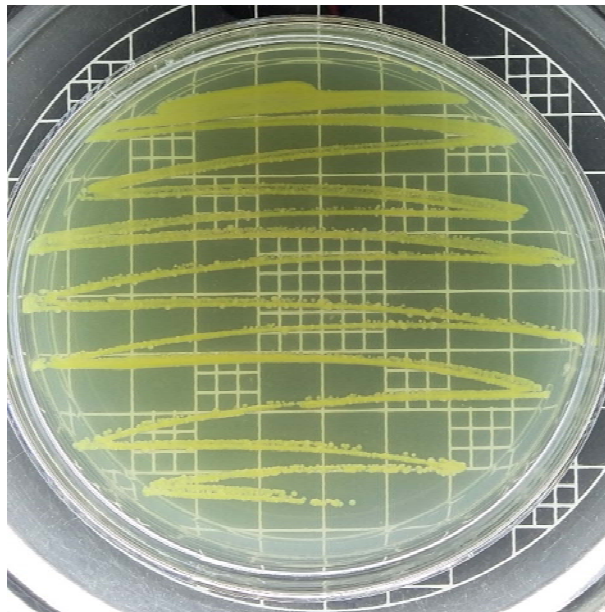


FIGURA 2 - Colônia de *Pseudomonas fluorescens* (BRM 32111).

3.3. CURVA DE CRESCIMENTO DE *Pseudomonas fluorescens*

Em Erlenmeyer de 500 mL contendo 200 mL de caldo nutriente foi adicionado 20 μ l da bactéria *P. fluorescens* (BRM 32111) conservada a solução salina de 0,85%. A partir deste, o material foi agitado em shaker horizontal a 150rpm, a temperatura de 28°C por 6, 16, 24, 48, 72 e 96 horas; respectivamente. Cada suspensão foi devidamente interrompida o crescimento no horário estabelecido. A partir deste processo, esses materiais foram transferidos para a cubeta e realizado a leitura por espectrofotômetro anteriormente calibrado com água estéril e ajustado em comprimento de onda único a $\lambda = 540$ nm com intuito de relacionar a taxa de crescimento da bactéria por período de tempo com a produção de metabólitos em cada tratamento.

3.4. ANTAGONISMO *in natura* ENTRE *Pseudomonas fluorescens* E *Magnaporthe oryzae*.

Para teste de pareamento, em Erlenmeyer de 500 mL foram adicionados 250 mL meio caldo nutriente, na qual foram aliquotados 20 µl da bactéria *P. fluorescens* conservada a solução salina de 0,85%. O material foi agitado em shaker horizontal a 150 rpm, sob condição de 28°C incubado a 96 horas. Posteriormente o material foi ajustado a absorvância em espectrofotômetro Hach Pr 2800 conforme o item 3.3., calculando a quantidade de adição de água estéril até atingir a densidade óptica de 0,500abs. Para o ensaio foram realizadas quatro repetições em placa de Petri contendo meio BDA, onde foram adicionados discos de 5mm do patógeno *M. oryzae* no centro da placa. Posteriormente foi realizado cultivo da bactéria com auxílio da alça de platina distanciada a 3 cm do patógeno em forma quadrangular, linha. As placas foram incubadas sob luz branca constante a temperatura de 28 a 32°C e a avaliação foi realizada após sete dias de incubação, até o tratamento controle, contendo somente o patógeno, atingir as extremidades da placa. Foram avaliados a aparição de halos de antagonismo e a área total patógeno submetido ao pareamento com a rizobactéria. Foram realizadas quatro repetições do tratamento e quatro repetições do controle.

Para avaliação antagonica por meio de produção de voláteis bacterianos, a bactéria *P. fluorescens* já ajustada a concentração conforme citado acima, foi riscada com auxílio de uma alça de platina em placa de Petri contendo meio de cultura BDA. Em outra placa também contendo o meio de cultura BDA, foi adicionado um disco de 5mm do patógeno *M. oryzae* (PY 10.900- PY461) no centro da placa. Posteriormente as placas foram sobrepostas, vedadas por plástico filme e incubadas sob condições de luz branca, temperatura e umidade controlada. Foram realizadas quatro repetições. A avaliação foi realizada após sete dias de incubação até o patógeno controle atingir as extremidades da placa de Petri medindo a área da colônia, ou seja, a área da circunferência sendo que a *M. oryzae* se multiplica em formato circular.

Estes testes foram realizados para assegurar a eficiência da rizobactéria *P. fluorescens* contra o patógeno *M. oryzae* com a utilização da bactéria *in natura*.

3.5. EXTRAÇÃO DE METABÓLITOS DE *Pseudomonas fluorescens* E METODOLOGIAS DE CARACTERIZAÇÃO COMO ANTAGONISTA

Em Erlenmeyer de 500 mL foram adicionados 250 mL de meio de cultivo caldo nutriente e aliquoteado 20 µl da bactéria *P. fluorescens* preservada em solução salina a 0,85%, agitada em shaker horizontal a 150rpm, a temperatura de 28°C por 6, 16, 24, 48, 72 e 96 horas; respectivamente. Cada suspensão foi devidamente interrompida o crescimento das mesmas rigorosamente no horário estabelecido. Os materiais foram transferidos para tubo falcon de 50 mL e centrifugado por 120 minutos a temperatura de 20°C a 5000 rpm. Posteriormente a centrifugação o sobrenadante foi transferido para outro tubo falcon estéril e filtrado em filtros de celulose com malha de 22 e 45nm acoplados numa seringa também estéril para a retirada das células, buscando somente a extração dos metabólitos em sua pureza. A caracterização do antagonismo do metabólito foi realizado em duas metodologias de pareamento (Figura 3), realizadas em quatro repetições e seis concentrações de filtrados: 0, 20, 50, 100, 150 e 200 µl, onde 0 foi o tratamento controle. A avaliação foi realizada através da medição da área da colônia do patógeno.

Na metodologia 1, para testar a eficiência dos voláteis na redução da colônia de *M. oryzae*, foram aliquoteados diferentes volumes de metabólito, com o auxílio de uma pipeta. Posteriormente foi realizado o esfregão dos metabólitos com a alça de Drigalski na placa de Petri contendo meio de cultura BDA, até o momento de total incorporação ao meio de cultura. Em outra placa, contendo o mesmo meio de cultura foi transferido um disco de 5mm do patógeno para o centro da placa de Petri. As placas contendo o metabólito e o patógeno foram sobrepostas e vedadas com plástico filme. Foram submetidas a condições ideais de crescimento e avaliado após sete dias.

Na metodologia 2, em meio de cultivo BDA vertido em placa de Petri, foram realizados quatro “cavidades” de 5mm equidistantes entre si, com auxílio de um molde redondo e estéril. Nessas cavidades, foram depositadas alíquotas dos metabólitos com diferentes concentrações divididos igualmente em cada pocinho totalizando volume final de 0, 20, 50, 100 e 200 µl em cada tratamento. Para o centro da mesma placa foi transferido o disco do patógeno *M. oryzae*. Os tratamentos foram incubados em condições favoráveis e avaliados após sete dias.

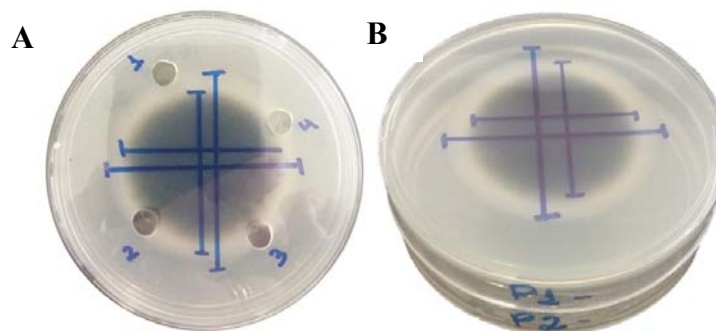


FIGURA 3 - Na figura A, observa-se a metodologia 1, denominada “cavidades” e na figura B , a metodologia 2 do teste de voláteis sendo que P1” adicionamos o patógeno *Magnaporthe oryzae* e P2” adicionamos as diferentes dosagens de metabólitos de *Pseudomonas fluorescens*.

3.6. AVALIAÇÃO DO ANTAGONISMO DA *Pseudomonas fluorescens* CONTRA *Bipolares oryzae* E *Rhizoctônia solani* PATÓGENOS DA CULTURA DO ARROZ

Para avaliação da supressão das doenças Queima da bainha (*Rhizoctonia solani* – BRM 45111) e Mancha parda (*Bipolares oryzae* – BRM 45114) foram realizados testes com os patógenos, a *P. fluorescens in natura* e com os metabólitos de 6, 16, 24, 48, 72 e 96 horas conforme o item 3.5. Inicialmente para a validação do teste foi realizado o pareamento antagônico da rizobactéria *P. fluorescens in natura* sob os patógenos avaliando a capacidade da bactéria em condicionar antagonismo sob eles formando halo ou barreira quando estes se aproximaram da bactéria.

Para a realização dos pareamentos foram realizadas três repetições. No primeiro teste, em placa de Petri contendo meio BDA, foram adicionados discos de 5mm dos patógeno *B. oryzae* e *R. solani* no centro da placa e posteriormente o cultivo da bactéria *in natura*, conforme o item 3.4, com auxílio da alça de platina em forma quadrangular distanciada a 3 cm do patógeno. No segundo teste, foram realizadas o cultivo dos metabólitos nos diferentes momentos de extração utilizando a mesma metodologia citada acima. Para ambos os testes as placas foram incubadas sob luz branca constante a temperatura de 28 a 32°C e a avaliação foi realizada após nove dias de incubação. Para *B. oryzae* avaliou-se a formação de halo e redução de colônia e para *R. solani* avaliando a redução da colônia e a formação de escleródios em relação ao controle.

3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os ensaios foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizados e os resultados foram analisados por teste T e ANOVA pelo programa SPPS (versão 22) e as médias foram comparadas pelo teste de Duncan ($P < 0,05$).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. CARACTERIZAÇÕES BIOQUÍMICAS

4.1.1. Produção de biofilme

Nas amostras, observou-se a formação e detecção de biofilme somente pela rizobactéria *P. fluorescens* (BRM 32111 - R55) indicado pelo escurecimento do meio de cultura juntamente com as colônias apresentando a cor preta opaca conforme padrões de estudos anteriores (Figura 4). Portanto, essas rizobactérias possuem a característica de formação de biofilme na qual estabelece relação com a planta de forma mais eficiente.



FIGURA 4 - Formação de biofilme por rizobactérias *Pseudomonas fluorescens* (R55), *Burkholderia pirrocinia* (R46), *Bacillus* sp.(138.7) e *Bacillus* sp. (82R).

Segundo Nikolaev; Plakunov (2007), as bactérias que se associam pela formação de biofilme possuem vantagens nutricionais, proteção e facilidade de comunicação na interação entre elas e o hospedeiro. As bactérias possuem capacidade de parasitismo que leva a uma inibição do crescimento do fungo fitopatogênico e pode abranger desde a simples fixação de células às hifas, até a sua completa quebra e degradação devido a produção de biofilme (WHIPPS, 2001; ZUCCHI; MELO, 2009). Para Recouvreux (2004), essa estrutura constitui uma forma de proteção que permite ao microrganismo sobreviver em ambientes adversos que favorece a manutenção de uma densidade populacional para que se iniciem interações benéficas ou deletérias entre a planta e a bactéria.

Os biofilmes de ordem bacteriana são constituídos por agregados multicelulares aderidos a um substrato biótico ou abiótico de matrizes poliméricas que em sua maioria são associadas a mecanismos diversos que permitem o acúmulo de autoindutores (DANHORN; FUQUA, 2007). Resultados semelhantes foram observados por Rêgo et al. (2014), que trabalhou com as bactérias *P. fluorescens* e *B. pirrocinia* na qual somente a rizobactéria *P. fluorescens* apresentou a formação de biofilme, na qual ajudam as bactérias a se fixarem às raízes das plantas de arroz promovendo assim barreira de proteção contra fatores adversos.

Segundo Dias (2011), ao testar 189 isolados bacterianos proveniente de sistema de produção orgânico, para seleção de bactérias promotoras de crescimento em couve, sua maioria se encaixou nas características bioquímicas do grupo *P. fluorescens* onde em experimentação *in vitro* quantificaram que 100% dos isolados formaram biofilme, 71% sintetizaram sideróforos, 31% produziram acil-lactonas homoserinas (AHLs), 95% produziram AIA e 74% solubilizaram Fósforo (P). Contrariando os resultados aqui obtidos, outras bactérias do gênero *Bacillus* também apresentaram respostas significativa realizadas em testes *in vitro* da cepa *B. subtilis* que reduziu o crescimento micelial de *Fusarium solani* (50%) e *Pythium* sp. (47%) em soja (*Glycine max*) em relação às testemunhas e apresentaram biofilme espesso e estável que, juntamente com o liberação de moléculas de proteínas antifúngicas promovendo vantagem na competição existente na microbiota do solo.

4.1.2. Solubilização de fosfato

Neste ensaio, as colônias bacterianas formaram halo de transparência expressando sua capacidade de solubilizar fosfato. Foi observado na Figura 5 que nas rizobactérias *P. fluorescens* (R55) e *B. pirrocinia* (R46) a formação do halo foi mais intensa atuando na maior eficiência na solubilidade de fósforo inorgânico demonstrando assim sua habilidade em disponibilizar fósforo assimilável, contribuindo para a nutrição das plantas.

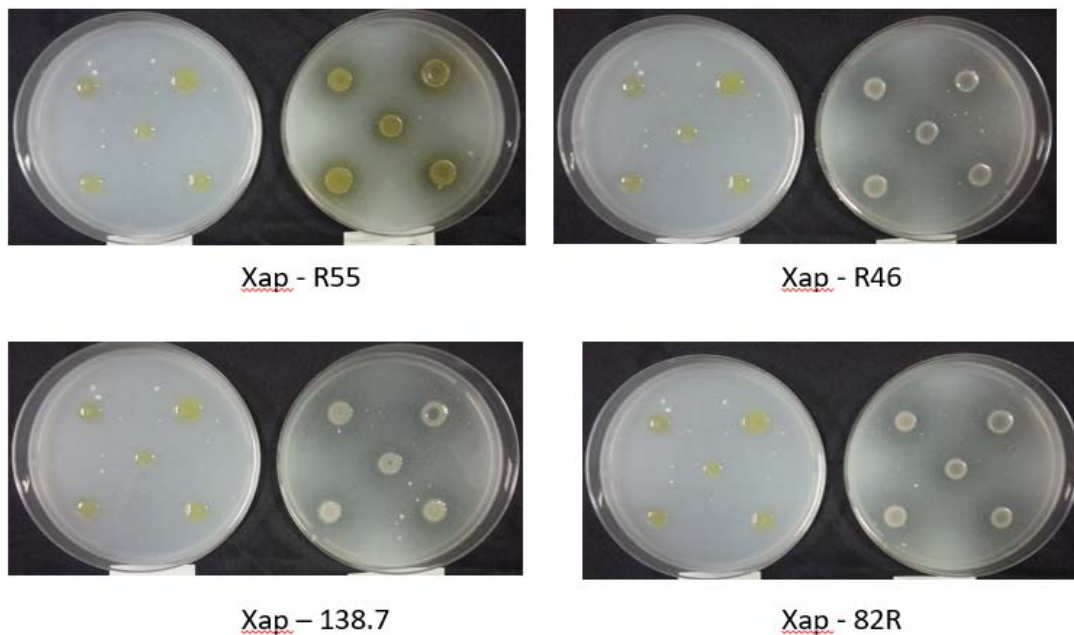


FIGURA 5 - Solubilização de fósforo inorgânico por rizobactérias *Pseudomonas fluorescens* (R55), *Burkholderia pirrocinia* (R46), *Bacillus* sp.(138.7) e *Bacillus* sp. (82R).

A utilização de microrganismos na solubilização de fosforo inorgânico auxilia na fixação deste pela planta transformando e tornando disponível, caracterizando uma relação simbiote entre o microrganismo e o sistema radicular que é comprovado por Souchie et al., (2005; 2006); Barroso; Nahas, (2008), em seus estudos anteriores que afirmam a atuação de diversos microrganismos do solo, incluindo bactérias e fungos, possuem a capacidade de solubilizar fosfatos por meio de diferentes mecanismos, especialmente pela produção de ácidos orgânicos.

Em estudos sobre os solos amazônicos, Chagas Junior et al., (2010) quantificaram que os rizóbios isolados de solos da Amazônia avaliados, 56% apresentaram capacidade para solubilização de fosfatos em meio de cultura, predominando baixos índices de solubilização. Dez isolados proporcionaram maiores teores de P na parte aérea, resultando em melhor eficiência na utilização de fósforo (P) e eficiência simbiótica pelas plantas. Fernández, et al.,

(2007), avaliando o crescimento da soja (*Glycine max*) observou que as bactérias solubilizadoras de fosfatos como *Burkholderia* sp., *Enterobacter* sp. e *Bradyrhizobium* sp. favoreceram o crescimento da planta porém não aumentaram o conteúdo de fósforo nas plantas.

Em estudos com milho na utilização de bactérias *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Serratia* sp. e *Enterobacter* sp. observou-se que não houve contribuição da parte aérea da planta porém refletiu nos dados de produção de grãos e acúmulo de fósforo e nitrogênio em 96 dias após emergência (HAMEEDA et al., 2008). Para Stamford et al. (2002), os microrganismos podem permitir uma maior disponibilidade de fosfato através da produção de ácido sulfúrico, podendo reduzir o pH do solo.

Diáz (2018), comprovou que o isolado 290 (*Bacillus subtilis*) solubilizou a maior quantidade de fósforo e aumentou a taxa fotossintética da planta comparada aos demais isolados do gênero *Bacillus*. Portanto a inoculação de microrganismos solubilizadores de fosfatos tem sido sugerida como alternativa para se substituir ou se diminuir o uso de fertilizantes fosfatados solúveis, mediante melhor aproveitamento do nutriente e como consequência disponibilizar novas fontes de nitrogênio a planta demonstrando maior crescimento e disponibilidade do sistema fotossintetizante (IGUAL et al., 2001; VESSEY, 2003).

4.2. CURVA DE CRESCIMENTO DE *Pseudomonas fluorescens*

Na Figura 6, no estágio de 6 horas, observou-se que na fase inicial de crescimento da bactéria quando ela começa a se adaptar e multiplicar, inicia-se o estágio log/exponencial, apresentando intensa atividade metabólica. No intervalo de 16 e 24 horas a bactéria encontra-se na fase exponencial na qual neste período, a reprodução celular encontra-se extremamente ativa e com maior atividade metabólica (ROMEIRO, 1995). Nos estudos realizados observou-se que em 72 e 96 horas o crescimento entra no platô de crescimento celular, ou fase estacionária, que expressa o crescimento máximo de células seguindo para o estágio de decadência ou morte. Portanto, observou-se que em relação a crescimento podemos afirmar que a taxa de crescimento em 24 horas muito se assemelha as de 72 e 96 horas sendo vantajoso manipular a rizobactéria *in natura* num intervalo de 24 horas de crescimento contendo a mesma segurança.

Cada microrganismo atua de forma diferente no meio de cultura e suas fases de crescimento são determinadas pelas fontes de carbono na qual se dispõe incluindo também todo o complexo nutritivo. Dentre estas fases, a bactéria tende a produzir diferentes metabólitos e em diferentes quantidades. Ao passar certo período de tempo, estes metabólitos são utilizados

pelas próprias bactérias ou são perdidos em processos metabólicos ou externos diversos como volatilização.

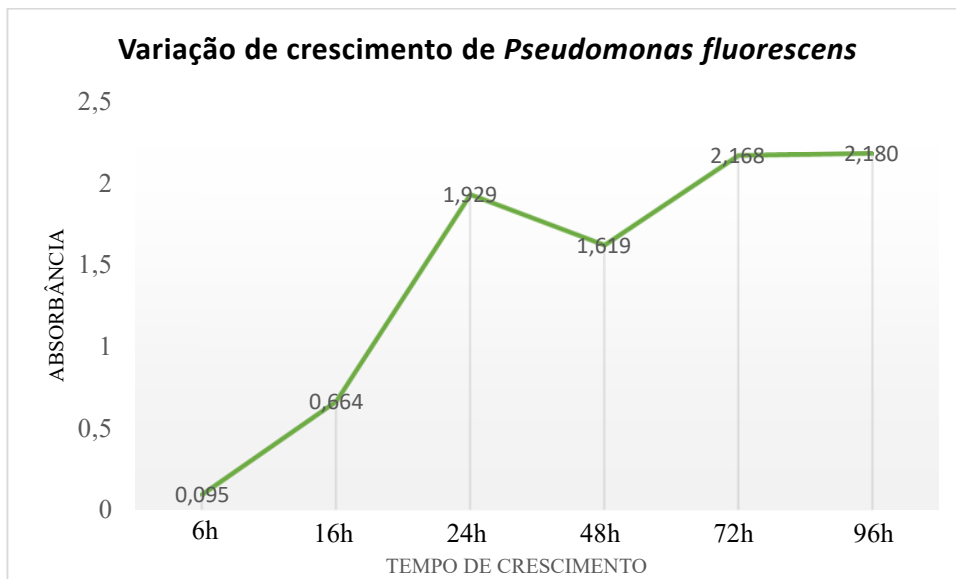


FIGURA 6 - Variação de crescimento de *Pseudomonas fluorescens* quantificado durante 96 horas.

4.3 ANTAGONISMO *in natura* ENTRE *Pseudomonas fluorescens* E *Magnaporthe oryzae*.

Na Tabela 2, observou-se que o teste de quadrangular e linha apresentaram diferença estatística em relação ao controle na redução da área da colônia de *M. oryzae*. No ensaio utilizando-se a metodologia de voláteis não apresentou diferença estatística devido a heterogeneidade dos dados. Neste ensaio, o pareamento comprova a eficiência do antagonismo da *P. fluorescens* (R55) contra *M. oryzae* em antagonismo direto inibiram evidentemente o crescimento do patógeno em relação ao controle (Figura 7), conforme estudos anteriores obtidos por Fillipi et al., (2011).

TABELA 2 – Teste T ($P < 0,05$) da área da colônia de *Magnaporthe oryzae* durante o antagonismo com *Pseudomonas fluorescens in natura*.

Tratamento	Quadrangular (cm ²)	Linha (cm ²)	Voláteis (cm ²)
1*	14,29b	14,29b	12,57a
2	3,57a	7,07a	4,94a
Sig	0,000	0,001	0,142

*O tratamento 1 expressa o controle, o tratamento 2 são os testes de pareamento. Redução é a porcentagem em que a antibiose exerceu contra o patógeno.

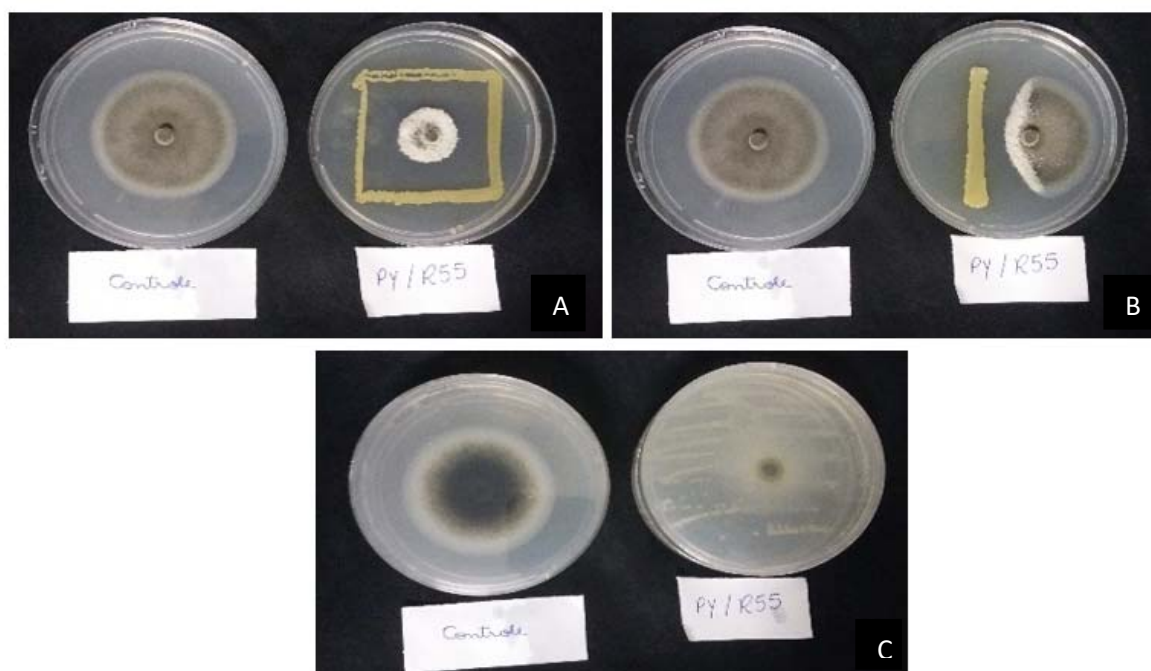


FIGURA 7 – Antagonismo entre *Pseudomonas fluorescens* e *Magnaporthe oryzae*. A figura A representa a metodologia quadrangular, figura B representa a metodologia de linha e a figura C representa o teste de voláteis.

4.4. EXTRAÇÃO DE METABÓLITOS DE *Pseudomonas fluorescens* E METODOLOGIAS DE CARACTERIZAÇÃO COMO ANTAGONISTA

Na metodologia 1, citada no item 3.5., as doses que apresentaram diferença estatisticamente do controle com maior eficiência na supressão do crescimento micelial de *M. oryzae*, foram os metabólitos extraídos após 16 horas de crescimento inicial da rizobactéria *P. fluorescens*, seguido pelos tratamentos de 48, 24 e 6 horas (Tabela 3), respectivamente. A concentração que teve melhor desempenho foi a de 150 μ na maioria dos tratamentos, exceto na extração de 48 horas onde a concentração de 200 μ apresentou menor média, suprimindo melhor o desenvolvimento do patógeno. Analisando a interação entre as doses e os horários de extração, observou-se que nos horários iniciais obtiveram melhores resultados comparados a extrações de 72 e 96 horas. Estes resultados comprovam que o melhor horário para extrair metabólitos da rizobactéria *P. fluorescens* é num intervalo de 16 a 48 horas, sendo que as 16 horas obtiveram melhores resultados comprovados estatisticamente, comparando as médias em relação ao controle e a partir destes, conclui-se que ao passar das horas ocorre decréscimo da eficiência do metabólito.

TABELA 3 - Área da colônia de *Magnaporthe oryzae* sob diferentes concentrações de metabólito de *Pseudomonas fluorescens*, utilizando a metodologia 1.

Concentração (μ l/placa)	Área da colônia de <i>Magnaporthe oryzae</i>					
	6h	16h	24h	48h	72h	96h
0	13,57bA	13,57cA	13,57bA	13,57cA	15,04aB	15,04Ab
20	10,61aA	12,59bcA	11,87abA	10,05abA	14,70aB	16,28Ab
50	9,90aA	10,49abcA	11,50abA	11,65bcA	17,36aB	16,49Ab
100	10,77aA	10,32abA	10,61abA	10,21abA	16,55aB	16,46Ab
150	10,04aA	7,55aA	10,32aA	9,51abA	16,09aB	15,20Ab
200	9,91aA	10,62abcA	9,62aA	7,82Aa	16,84aB	15,77Ab
F	2,329*	4,711*	2,268*	3,981*	1,376 ^{ns}	0,648 ^{ns}
C.V.(%)	19,35	23,75	18,30	24,06	11,42	9,57

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade. ^{ns} Não significativo ao nível de 5% de probabilidade. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si de acordo com o teste de Duncan ($p < 0,05$). Entre colunas as comparações se referem entre as concentrações (letras minúsculas) e as comparações se referem aos horários das extrações (letras maiúsculas).

Na metodologia 2, citada no item 3.5, no teste de voláteis, o tratamento de 72 acompanhado por de 48 e 16 horas (Tabela 4), apresentou melhor resultado na redução da área da colônia de *M. oryzae* em relação ao controle ao comparar as médias. Na maioria dos tratamentos a concentração de 150 μ apresentaram menores médias em relação ao tratamento controle sendo que nos metabólitos extraídos as 6 e 16 horas a maior concentração intitulada 200 μ , demonstrou menor média. Em relação a interação entre os horários das extrações, os tratamentos de 16 e 48 horas, apresentaram menores médias evidenciando melhor eficiência antagonica por voláteis. Os demais tratamentos não demonstraram diferença estatística significativa comparada ao controle não apresentando eficiência na supressão do patógeno *M. oryzae*.

TABELA 4 - Área da colônia de *Magnaporthe oryzae* sob diferentes concentrações de metabólito de *Pseudomonas fluorescens*, utilizando a metodologia 2.

Concentração (μ l/placa)	Área da colônia de <i>Magnaporthe oryzae</i>					
	6h	16h	24h	48h	72h	96h
0	21,87Bd	12,88bA	12,88aAB	12,88cA	15,20bC	15,20bB
20	20,88Bd	11,34abA	10,59aAB	11,79bcA	16,29bC	10,31aB
50	21,85Bd	11,49abA	11,94aAB	10,49abA	17,55bC	14,02abB
100	12,69Ad	11,80abA	11,06aAB	10,33aA	17,57bC	14,43abB
150	22,06Bd	8,99aA	10,04aAB	9,49aA	7,26aC	10,52abB
200	11,80Ad	8,86aA	11,94aAB	9,91aA	13,63bC	11,94abB
F	6,863*	2,577*	1,076 ^{ns}	1,417*	1,237*	1,075*
C.V.(%)	25,60	23,14	24,89	13,12	30,02	27,64

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade. ^{ns} Não significativo ao nível de 5% de probabilidade. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si de acordo com o teste de Duncan ($p < 0,05$). Entre colunas as comparações se referem entre as concentrações (letras minúsculas) e as comparações se referem aos horários das extrações (letras maiúsculas).

Os dados comparam as técnicas utilizadas em trabalhos semelhantes que obtiveram resultados expressivos quanto ao uso de bactérias benéficas na supressão de doenças e pragas em diversas culturas. Uma delas, foi realizado por Furlani et al., (2007), com a utilização de filtrado de cultura bacteriana a partir de isolados de *Bacillus* spp., foi altamente eficiente para inibir o crescimento micelial do fungo *C. acutatum*. Trabalho realizado por Yoshida et al. (2001) com filtrado de *B. amyloliquefaciens* no controle de *Colletotrichum dematium*, verificou a inibição dos sintomas de antracnose em folhas de amoreira tratadas com diferentes concentrações do filtrado antes e simultaneamente à inoculação do agente causal.

No controle de fitopatógenos pressupondo o controle biológico de pragas e doenças, Andaló et al., (2007), testou o efeito de filtrados entomobacterianos sobre juvenis de *Meloidogyne* spp. onde os filtrados obtidos de bactérias associadas a *Steinernema riobrave*, *S. carpocapsae*, *Heterorhabditis* sp. e *Heterorhabditis* sp. foram colocados em contato com juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita* por 48 h e avaliado a ação deste em função do tempo no qual os filtrados bacterianos testados foram letais para *M. incognita*, atingindo índices de mortalidade acima de 80 % . Num período de incubação de 24 horas os metabólitos bacterianos, apresentaram efeitos semelhante aos nematicidas do mercado. Portanto, as rizobactérias apresentam grande viabilidade na supressão de várias moléstias que hoje são descritas, comprovando a grandeza de eficácia do controle biológico.

4.5. AVALIAÇÃO DO ANTAGONISMO DA *Pseudomonas fluorescens* CONTRA *Bipolares oryzae* E *Rhizoctônia solani* PATÓGENOS DA CULTURA DO ARROZ

Esta avaliação permitiu verificar a eficiência da rizobactéria *P. fluorescens* contra as principais doenças que atingem a cultura do arroz. No teste de pareamento com o patógeno *B. oryzae* (Mancha parda), verificou-se que a *P. fluorescens in natura* apresentou ação antagonônica pela formação do halo em volta da colônia do patógeno reduzindo a área da colônia do patógeno. Para a *R. solani* (Queima da bainha) observou-se que o patógeno consegue romper a barreira feita pela rizobactéria *P. fluorescens* verificando que não houve ação antagonônica não reduzindo a área a colônia do patógeno (Figura 8). Na quantificação de escleródios, observou-se que no tratamento com a rizobactéria *in natura* não houve a formação desta estrutura de sobrevivência (Tabela 5).

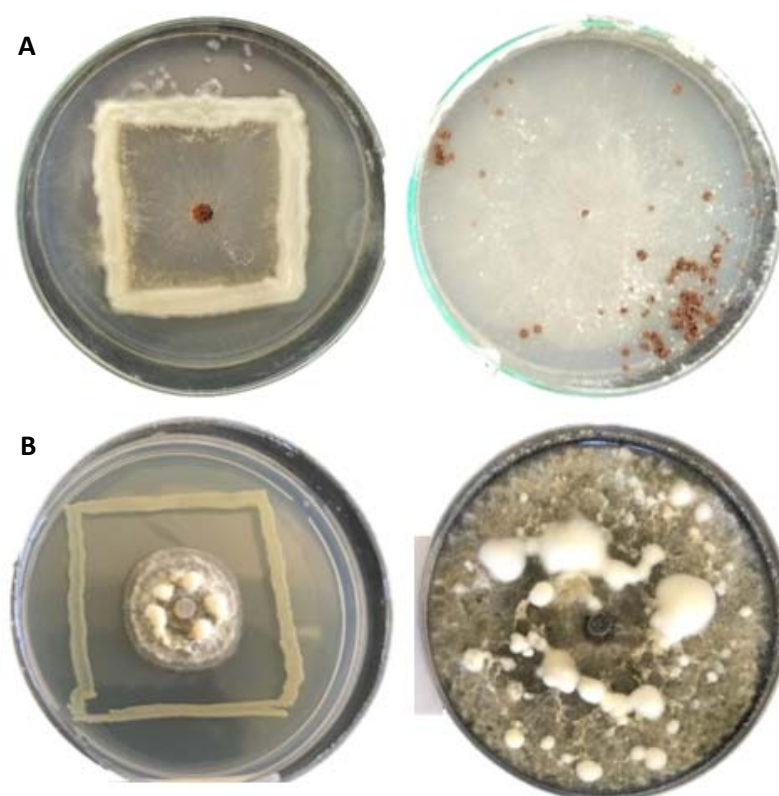


FIGURA 8 - Antagonismo *in natura* entre *Pseudomonas fluorescens* e os patógenos *Rhizoctonia solani* (A) e *Bipolares oryzae* (B). As imagens do lado direito compreendem o tratamento controle e as imagens do lado esquerdo são os tratamentos.

TABELA 5 - Teste T ($P < 0,05$) da redução da área da colônia de *Bipolares oryzae* e *Rhizoctonia solani* e a formação de escleródios por *R. solani* submetidas a pareamento com *Pseudomonas fluorescens*.

Área da colônia dos patógenos			
Tratamento	<i>B. oryzae</i>	<i>R. solani</i>	Escleródios <i>R. solani</i>
C1	56,74b	56,74a	52,5b
C2	7,08a	56,74a	0,0 a
Sig	0,000	ns	0,000

C1: Expressa o tratamento controle sem a adição da rizobactéria *Pseudomonas fluorescens*;
 C2: tratamento de antagonismo da *P. fluorescens* contra os patógenos.

Nos testes com os metabólitos filtrados, o patógeno *Bipolares oryzae*, não apresentou diferença estatística, porém visualmente, verificou-se mudanças na sua forma física, apresentando pontos com hifas mais cotonosa e de forma mais isoladas no pareamento com o metabólito de extração de 16 horas após o crescimento inicial (Figura 9). Para a *R. solani* observou-se que o patógeno diminuiu a produção de escleródios submetido ao pareamento com o metabólito extraído a 16 horas (Tabela 6). Portanto, estes resultados compreendem a gama de estudos que podem ser realizados com a *P. fluorescens* contra patógenos tanto na orizicultura quanto em outras culturas de importância agronômica.

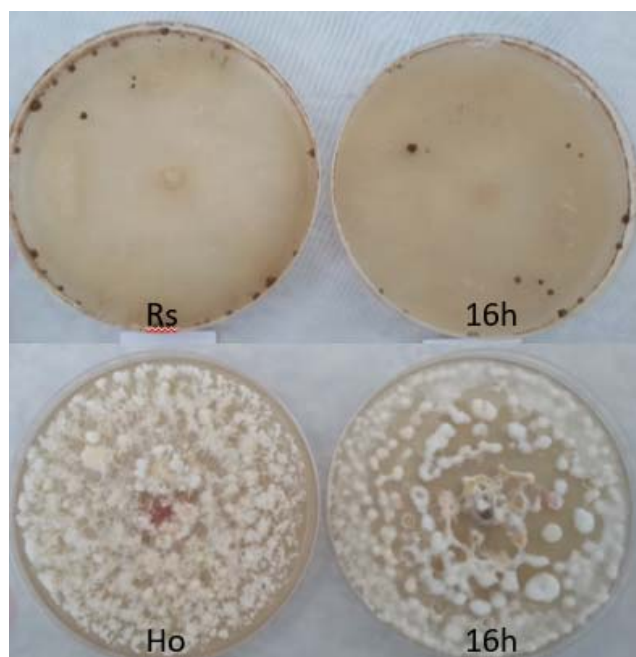


FIGURA 9 - Antagonismo entre o metabólito de *Pseudomonas fluorescens* extraído em 16 horas após crescimento inicial, contra *Rhizoctonia solani* (Rs) e *Bipolares oryzae* (Ho)

TABELA 6 - Redução da área da colônia de *Bipolares oryzae* e *Rhizoctonia solani* e a formação de escleródios por *R. solani* submetidas a pareamento com os metabólitos de *Pseudomonas fluorescens* extraídos em diferentes horários.

Área da colônia dos patógenos			
Tratamento	<i>H. oryzae</i>	<i>R.solani</i>	Escleródios <i>R.solani</i>
C	56,74a	56,74a	22,33abc
6h	56,74a	56,74a	21,66abc
16h	56,74a	56,74a	15,00a
24h	56,74a	56,74a	17,66ab
48h	56,74a	56,74a	19,00ab
72h	56,74a	56,74a	36,00c
96h	56,74a	56,74a	31,66c
F	ns	ns	2,522*
C.V (%)			43,33%

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade. ^{ns} Não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si de acordo com o teste de Duncan ($p < 0,05$).

5. CONCLUSÃO

- Somente a *Pseudomonas fluorescens* (BRM 32111 - R55) formou biofilme.
- As rizobactérias *P. fluorescens* e *B. pirrocinia* formaram o halo mais destacado demonstrando assim sua habilidade em disponibilizar fósforo assimilável às plantas.
- Em relação ao crescimento da *P. fluorescens* afirmar-se que a taxa de crescimento em 24 horas muito se assemelha as de 72 e 96 horas sendo que pode-se manipular a rizobactéria *in natura* num intervalo de 16 e 24 horas de crescimento contendo a mesma segurança.
- A *P. fluorescens* (BRM 32111) apresenta antagonismo direto que inibiram evidentemente o crescimento do patógeno *M. oryzae*.
- O melhor horário para extrair metabólitos da rizobactéria *P. fluorescens* é num intervalo de 16 a 48 horas, comprovado pela redução da colônia de *M. oryzae*, sendo que, observou-se decréscimo de sua eficiência nas extrações de 72 e 96 horas.
- No teste de voláteis com os metabólitos bacteriano, o tratamento de 48 horas apresentou melhor eficiência na supressão do patógeno *M. oryza* em relação ao controle.
- A *P. fluorescens* atua na supressão de outros patógenos do arroz como Queima da bainha (*Rhizoctônia solani*) e Mancha parda (*Bipolares oryzae*).
- O uso da *P. fluorescens* pode se tornar uma opção importante para o controle biológico no MID do arroz.

6 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

AHEMAD, M.; KIBRET M. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. **Journal of King Saud University – Science** 26, 1–20, 2014.

ALSTRÖM S. Factores asociados efectos perjudiciales de rizobacterias Con sobre planta crecimiento. **Planta y del suelo**. 102: 3-9, 1987.

ÁLVAREZI, S.P.; ARBELO, O.C.; PÉREZ, M.E.; QUEZADA, G.A. *Pseudomonas fluorescens* Migula, ¿control biológico o patógeno? **Rev. Protección Veg.** Vol. 30 No. 3 (sep.-dic. 2015): 225-234 ISSN: 2224-4697

ANDALÓ, V., C.; MAXIMINIANO, V.P.; CAMPOS, A.; MOINO JR. **Efeito de filtrados entomobacterianos sobre juvenis de *Meloidogyne* spp.** Universidade Federal de Lavras, Departamento de Entomologia. Vol. 31(3), 2007.

ASGHAR, H.N.; ZAHIR, Z.A.; ARSHAD, M & KHALIQ, A. Relationship between in vitro production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in *Brassica juncea* L. **Biol. Fert. Soils**, 35:231-237, 2002.

BARROSO, C. B.; NAHAS, E. The status of soil phosphate fractions and the ability of fungi to dissolve hardly soluble phosphates. **Applied Soil Ecology**, v. 29, n. 1, p. 73-83, 2005.

BATTU, P.R. y REDDY, M.S. **Aislamiento de metabolitos secundarios de *Pseudomonas fluorescens* y su caracterización.** (En inglés) 2 (1): 26-29, 2009

BERND L.P; SOUZA, T.M.; OLIVEIRA, M.A. ; ONO, E.Y.S. ;ZUCARELI, C.; ELISA Y. HIROOKA, E.Y. ;Inoculação de *Pseudomonas fluorescens* e adubação NPK na composição química e contaminação fungo-fumonisina de milho **Rev. bras. eng. agríc. ambient.** vol.18 no.12 Campina Grande Dec. 2014

BERTRAND, S., N. BOHNI, S. SCHNEE, O. SCHUMPP, K. GINDRO, AND J.L. WOLFENDER. Metabolite induction via microorganism co-culture: a potential way to enhance chemical diversity for drug discovery. **Biotechnol. Adv.** 32, 1180-1204. Doi: 10.1016/j.biotechadv.2014.03.001, 2014.

BETTIOL, W.; GHINI, R. Controle Biológico. In: BERGAMIN, A. F.; KIMATI, H.; AMORIN, L. **Manual de Fitopatologia. Princípios e Conceitos.** 3.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. p.717-728.

BETTIOL, W.; GHINI, R. Proteção de plantas em sistemas agrícolas alternativos. In: Campanhola, C. & Bettiol, W (Eds.) **Metodos alternativos de controle fitossanitário.** Jaguariúna. Embrapa Meio Ambiente. 2003. Pp 79-95

BIRD, G.W.; EDENS, T.; DRUMMOND, F. & GRODEN, E. Design of pest management systems for sustainable agriculture. In: Francis, C.A.; Flora, C.B & King, L.D. (Eds.) **Sustainable Agriculture in Temperature Zones.** New York. John Willey. pp 55-100, 1990.

BRESEGHELLO, FLÁVIO: **Tecnologia para arroz de terras altas – Doenças do arroz e seus controles.** Embrapa, 1998 p.139

CHAGAS JUNIOR, A.F.; OLIVEIRA, L. A.; OLIVEIRA, A. N.; WILLERDING, A. L.; Capacidade de solubilização de fosfatos e eficiência simbiótica de rizóbios isolados de solos da Amazônia. **Acta Scientiarum**. Agronomy Maringá, v. 32, n. 2, p. 359-366, 2010.

CONAB - ACOMPANHAMENTO DA SAFRA BRASILEIRA DE GRÃOS – Disponível em:<http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_02_09_09_58_19_boletim_graos_fevereiro_2017.pdf> p. 73. Acesso em: 27/08/2017

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento Disponível em : <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_03_01_16_56_00_a_cultura_do_arroz_-_conab.pdf> Cultura do arroz - Doenças p.82

CONAB - Cultura do arroz – Disponível em:<http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_03_01_16_56_00_a_cultura_do_arroz_-_conab.pdf> p.13/18. Acesso: 28/08/2017

CONAB - Cultura do arroz – Disponível em:<http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_03_01_16_56_00_a_cultura_do_arroz_-_conab.pdf> p.14. Acesso: 26/08/2017

CORNELIS P. Pseudomonas : Genomics e molecular biologia. 1º eE. **Caister Academic Press**; 2008.

DANHORN, T.; FUQUA, C. Biofilm formation by plant-associated bacteria. **Annual Review of Microbiology**, v.61, p.401-422, 2007.

DIAS, A. **Caracterização e seleção de bactérias fluorescentes promotoras de crescimento de couve**. Tese (Doutorado em Fitotecnia). Seropédica - RJ, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro- UFRRJ, p155. 2011

DIAZ, PAOLA ANDREA ESCOBAR. **Bacillus spp. como promotores de crescimento na cultura do algodão**. -Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Jaboticabal, 2018.

DREYFUSS MM, CHAPELA IH. Potential of fungi in the discovery of novel, lowmolecular weight pharmaceuticals. In: Gullo VP. **The discovery of natural products with therapeutic potential**. Boston: Butterworth-Heinemann; 1994.

EMBRAPA, 2008 – EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – DISPONÍVEL EM: Arroz de terras altas – Disponível em: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/arroz/arvore/CONT000fesi63xi02wx5eo0y53mhyhtbts8a.html>> . Acesso: 29/08/2017

FERNÁNDEZ, L. A.; ZALBA,P., GÓMEZ, M.A.; SAGARDOY, M. A. Fosphate-solubilization activity of bacterial strains in soil and their effect on soybean growth under greenhouse conditions. **Biology Fertilly Soils**, Berlin, v.43, p.805-809, 2007.

FILIPPI, M.C.C.; SILVA, G.B.; SILVA-LOBO, V.L.; CORTES, M.M.C.B.; MORAES, A.J. G.; PRABHU, A.S. Leafblast (Magnaportheorhyzae) suppression and growth promotion by rhizobacteria on aerobic rice in Brazil. **Biological Control**, v. 58, p. 160-166, 2011

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – **FAO**. Food outlook: biannual report on global food markets. Rome, 2016. 139 p. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/bjft/v20/1981-6723-bjft-20-e2017006.pdf>> Acesso 27/08/2017

FREEMAN D.J., FALKINER F.R., KEANE C.T. New method for detecting slime production by coagulase negative *staphylococci*. **J Clin Pathol** ;42:872-4, 1989

FREITAS, J.R.; BANERJEE, M.R. & GERMIDA, J.J. Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus* L.). **Biol. Fert. Soils**, 24:358-364, 1997.

FRIDLENDER, M.; INBAR, J. & CHET, I. Biological control of soilborne plant pathogens by a b-1,3-glucanase-producing *Pseudomonas cepacia*. **Soil Biol. Biochem.**, 25:1211-1221,1993.

FURLANI, A.C.F.A.; CAMARGO M.; PANIZZI R.C.; PEREIRA, C.F. Atividade de células, filtrado e autoclavado de *Bacillus* spp. como bioagentes de controle de *Colletotrichum acutatum*. **Nota Científica**. Científica, Jaboticabal, v.35, n.2, p.196 - 200, 2007.

GANESHAN, G. & KUMAR, M.A. *Pseudomonas fluorescens*, a potential bacterial antagonist to control plant diseases. **Journal of Plant Interactions**, September 2005; 1(3): 123134. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/17429140600907043>> Acesso 27/08/2017.

GARCIA,T.V; KNAAK,N; FIUZA, L.M.: Bactérias endofíticas como agentes de controle biológico na orizicultura. **Arq. Inst. Biol.** vol.82 São Paulo 2015 Epub Jan 12, 2016.

GONÇALVES F.J.; ARAÚJO, L.G.; SILVA, G.B.; FILIPPI, M.C.C; Controle químico da brusone em arroz de terras altas: efeitos nos fungos não alvos do filoplano1. **Pesq. Agropec. Trop.**, Goiânia, v. 42, n. 1, p. 77-81, jan./mar. 2012 Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/pat/v42n1/11.pdf>>. Acesso 27/08/2017.

GRANADA G, S.D., A. RUEDA L., AND C.A. PELÁEZ. 2014. Antimicrobial activity of extracellular metabolites from antagonistic bacteria isolated from potato (*Solanum phureja*) crops. **Summa Phytophthol.** 40, 212-220. Doi: 10.1590/0100-5405, 1953.

HAMEEDA B, HARINI G, RUPELA OP, WANI SP, REDDY G. Growth promotion of maize by phosphate-solubilizing bacteria isolated from composts and macrofauna. **Microbiol. Res.** 163: 234-242, 2008.

HOFFLAND, E.; HAKULINEN, J.; PELT, J. A. VAN. Comparison of systemic resistance induced by avirulent and nonpathogenic *Pseudomonas* species. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 86, n. 7, p. 757-762, July 1996

IGUAL, J. M.; VALVERDE, A.; CERVANTES, E.; VELÁZQUEZ, E. Phosphate-solubilizing bacteria as inoculantes for agriculture: use of updated molecular techniques in their study. **Agronomie**, v. 21, n. 2, p. 561-568, 2001.

KATSURAYAMA, A. M.; TANIWAKI, M. H. Fungos e aflatoxinas no arroz: ocorrência e significado na saúde do consumidor. **Braz. J. Food Technol.** [online]. 2017, vol.20, e2017006. Epub May 22, 2017. ISSN 1981-6723. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/1981-6723.0617>>. Acesso: 29/08/2017

LEÃO, U. E.; SILVA J.C.; MEDEIROS, F.R.; MACEDO, G.S.S.R.; ADORIAN, G.C.; MARINGONI, A.C. Potencial *in vitro* de *Bacillus* spp. no controle de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em feijoeiro-comum. **Summa phytopathol.** vol.42 no.4 Botucatu Oct./Dec. 2016.

LEE KJ, OH BT, SERALATHAN KK. ED. MAHESHWARI, D.K. Advances in Plant Growth Promoting Rhizobacteria for biological control of plant diseases. In Bacteria in Agrobiolology: Disease Management: **Springer Berlin Heidelberg**. 2013;1- 13.

LOBO, V.L.S; FILIPPI, M.C.C., **Manual de Identificação de Doenças da Cultura do Arroz - Brusone**. Brasília, DF :Embrapa, 2017.PDF 45 p. : il. color. ISBN 978-85-7035-686-4, p.11. Acesso: 30/08/2017.

LUCON, C.M.M.; AKAMATSU, M.A.; HARAKAVA, R. Promoção de crescimento e controle de tombamento de plântulas de pepino por rizobactérias. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v.43, n.6, p.691-697, 2008.

MANIKANDAN R., D. SARAVANAKUMAR, RAJENDRAN L., T. Y M. SAMIYAPPAN RAGUCHANDER 2010. Estandarización de la formulación líquida de *Pseudomonas fluorescens* Pf1 para ITS eficacia contra *Fusarium marchita* de tomate. **Control biológico**. 54: 83-89.

MARTINAZZO, R.; SANTOS, D. R.; GATIBONI, L. C.; BRUNETTO, G.; KAMINSKI, J. Fósforo microbiano no solo sob sistema plantio direto em resposta à adição de fosfato solúvel. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 31, n. 3, p. 563-570, 2007.

MATHUR T., SINGHAL S., KHAN S., UPADHYAY DJ., FATMA T., RATTAN A. Detection of biofilm formation among the clinical isolates of staphylococci: An evaluation of three different screening methods. **Indian Journal of Medical Microbiology** v. 24, n 1, p .25-29, 2006.

MAVRODI OV, MAVRODI DV, PAREJKO JA, THOMASHOW WELLER LS Y DM 2012. MAYAK S, TIROSH T, GLICK BR. Plant growthpromoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. **Plant Physiol. Biochem.** 2004; 42:565-572

MCLEAN, J.; DAWE, D.; HARDY, B.; HETTEL, G. Rice almanac: source book for the most important economic activity on earth. Los Baños: IRRI, 2002. p. 298. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/bjft/v20/1981-6723-bjft-20-e2017006.pdf>.> Acesso 29/08/2017 **Microbiología Ambiental**. 78 (9): 3.214-3.220

MYOUNGSU, P.; CHUNGWOO, K.; JINCHUL, Y.; HYOUNGSEOK, L.; WANSIK, S.; SEUNGHWAN, K.; TONGMIN, S. Isolation and characterization of diazotrophic growth promoting bacteria from rhizosphere of agricultural crops of Korea. **Research in Microbiology**, v.160, p.127-133, 2005.

NAUTIYAL.C. S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **Agricultural Microbiology Division, National Botanical Research Institute**, Rana Pratap Marg, P.B. No. 436, 1999.

NAVA E. P.; GARCÍA, C.G.; CAMACHO, J. B.; VÁZQUEZ, E. L. M.; Bioplaguicidas: una opción para el control biológico de plagas. **Ra Ximhai**. 2012; 8(3): 17-29.

NIKOLAEV, Y. A.; PLAKUNOV, V. Biofilm—“City of microbes” or an analogue of multicellular organisms? **Microbiology**, v. 76, n. 2, p. 125-138, 2007.

OWEN, A. & ZDOR, R. Effect of cyanogenic rhizobacteria on the growth of velvetleaf (*Abutilon theophrasti*) and corn (*Zea mays*) in autoclaved soil and the influence of supplemental glycine. **Soil Biol. Biochem.**, 33:801-809, 2001.

OYOQUE G., H. MENA, ANGOA V. E, OLALDE M.. A utilização de extractos de *Pseudomonas* sp (PB11) Controlo de mancha bacteriana em tomate (*Solanum lycopersicum*). **Tecnologia da Informação** 22 (6): 3-10, 2011.

PIDELLO, A. The effect of *Pseudomonas fluorescens* strains varying in pyoverdine production on the soil redox status. **Plant Soil**, 253:373-379, 2003.

PRABHU, A. S., M. C. FILIPPI & A. S. RIBEIRO. **Doenças e seu controle**, p. 561-632. In: A. B. Santos, L. F. Stone & N. R. Almeida (Eds), A cultura do arroz no Brasil. Santo Antonio de Goiás, Embrapa, 2006.

PRABHU, A. Sa. ; ARAUJO, L.G.; FAUSTINA, C.;BERNI, R. F. Estimativa de danos causados pela brusone na produtividade de arroz de terras altas. *Pesq. agropec. bras.* [online]. 2003, vol.38, n.9, pp.1045-1051. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/pab/v38n9/18281.pdf>>. Acesso 27/08/2017.

PRABHU, A.S. et al. Estimativa de danos causados pela brusone na produtividade de arroz de terras altas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.38, n. 9, p.1045-1051, 2003.

PRABHU, A.S.; FILIPPI, M.C.C.; Brusone em arroz: controle genético, progresso e perspectivas. **Embrapa**, 2006 p.323

RAAIJMAKERS, J.M.; WELLER, D.M. & THOMASHOW, L.S. Frequency of antibiotic-producing *Pseudomonas* spp. in natural environments. **Appl. Environ. Microbiol.**, 63:881-887, 1997.

RECOUVREUX, D. D. O. S. **Produção de celulose bacteriana: identificação do operon bcs e produção de biofilme celulósico por *Chromobacterium violaceum***. 2004. Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-graduação em Engenharia Química., 2004.

RÊGO, M. C. F.; ILKIU-BORGES, F.; FILIPPI, M. C. C.; GONÇALVES, L. A.; SILVA, G. B. Morphoanatomical and Biochemical Changes in the Roots of Rice Plants Induced by Plant Growth-Promoting Microorganisms. **Journal of Botany**, v. 2014, p. 10, 2014.

RHEINHEIMER, D. S.; MARTINAZZO, R.; GATIBONI, L. C.; KAMINSKI, J.; SILVA, L. S. Amplitude no fósforo microbiano em um Argissolo em pastagem nativa submetida à roçada e à introdução de espécies forrageiras com fertilização fosfatada em diferentes épocas. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 30, n. 4, p. 561-567, 2008.

RIVES, N.R.; BALDANI V.; HERNÁNDEZ, R. Producción de *Pseudomonas* spp. en la rizosfera de trigo. Aislamiento e identificación de bacterias diazotróficas asociadas al cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). **Revista Cubana del Arroz**. 2012; 14(2):19-25.

- ROMEIRO, R.S. **Bactérias fitopatogênicas**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 283p. 1995.
- ROMERO V. M.R. Produccion de metabolito secundários de *Pseudomonas fluorescens* y su uso en el control de hongos fitopatogénos. Instituto politécnico nacional. **México**, 2014.
- SARTI, G. C.; MIYAZAKI, S. S. Actividad antifúngica de extractos crudos de *Bacillus subtilis* contra fitopatogénos de soja (*Glycine max*) y efecto de su coinoculación con *Bradyrhizobium japonicum*. **Agrociencia**, v. 47, n. 4, p. 373-383, 2013.
- SHOWKAT S.; MURTAZA I.; LAILA O.; ALI A. Biological Control de *Fusarium oxysporum* e *Aspergillus* sp. por *Pseudomonas fluorescens* isolado do rizosfera de trigo do solo **Biol Pharm Kashmir.JSci** .; 1 (4): 24-32, 2012.
- SILVA, A.C et al. Efeito in vitro de compostos de plantas sobre o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. isolado do maracujazeiro. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, p. 1853 - 1860, 2009.
- SILVA, A.G.C.; SOUZA, T.D. Atividade antifúngica in vitro de metabólitos secundários produzidos por *Bacillus cereus*. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde, Três Corações**, v. 14, n. 2, p. 522-529, ago./dez. 2016.
- SMITH, F.W. The phosphate uptake mechanism. **Plant and Soil**, v. 245, n. 1, p. 105-114, 2002.
- SOSBAI - SOCIEDADE SUL-BRASILEIRA DE ARROZ IRRIGADO. **Importância do arroz**. In: REUNIÃO TÉCNICA DA CULTURA DE ARROZ IRRIGADO, 30., 2014, Bento Gonçalves. Anais... Santa Maria: SOSBAIp. 9-13, 2014. Disponível em: <<http://www.scielo.br/bjft/v20/1981-6723-bjft-20-e2017006.pdf>> Acesso 29/08/2017
- SOUCHIE, E. L.; ABOUD, A. C. S.; CAPRONI, A. L. Solubilizadores de fosfato in vitro por microrganismos rizosféricos de guandu. **Bioscience Journal**, v. 23, n. 2, p. 53-60, 2007.
- SOUCHIE, E. L.; AZCÓN, R.; BAREA, J. M.; SAGGIN-JUNIOR, O. J.; SILVA, E. M. R. Solubilização de fosfatos em meio sólido e líquido por bactérias e fungos do solo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 11, p. 1149-1152, 2005.
- SOUCHIE, E. L.; AZCÓN, R.; BAREA, J. M.; SAGGIN-JUNIOR, O. J.; SILVA, E. M. R. Phosphate solubilization and synergism between P-solubilizing and arbuscular mycorrhizal fungi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 9, p. 1405-1411, 2006.
- STAMFORD, N. P.; FREITAS, A. D. S.; FERRAZ, D. S.; SANTOS, C. E. R. S. Effect of sulphur inoculated with *Thiobacillus* on saline soils amendment and growth of cowpea and yam bean legumes. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 139, p. 275-281, 2002.
- TRIVEDI MK.; PATIL S.; SHETTIGAR H.; GANGWAR H.; JANA S.; 2015 Antimicrobial Sensibilidade do teste padrão de *Pseudomonas fluorescens* após Biofield Tratamento. **J Infect Dis Ther** 3: 222. doi: 10,4172 / 2332-0877.1000222
- UTKHEDE, R.S.; LÉVESQUE, C.A.; DINH D. *Pythium aphanidermatum* root rot in hydroponically grown lettuce and the effect of chemical and biological agents on its control. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v.22, p.138-144, 2000.
- VAN EEDEN, M.; L. KORSTEN. 2013. Factors determining use of biological disease control measures by the avocado industry in South Africa. **Crop Prot.** 51, 7-13. Doi: 10.1016/j.cropro.2013.

- VESSEY, J. K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and Soil**, v. 255, n. 2, p. 571-586, 2003.
- VILLA, P.; FRIAS, A.; GONZALEZ, G.. Avaliação de linhagens de *Pseudomonas* sp para controle de fungos fitopatogênicos que afetam culturas de interesse econômico. **Revista ICIDCA**. 39 (3): 40-44, 2009.
- WEBSTER, R.K.; GUNNELL, S.P. Compendium of Rice Diseases, **St. Paul: APS62p**. 1992.
- WHIPPS, J. M. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. **Journal of experimental Botany**, v. 52, n. 1, p. 487-511, 2001.
- WILSON, R.A.; TALBOT, N. J. Under pressure: investigating the biology of plant infection by *Magnaporthe oryzae*. **Nature Reviews Microbiology**, London, v.7, n. 3, p.185-195, mar. 2009.
- YAMASSAK F. T. **Moléculas bioativas das folhas de Persea americana**. Universidade Federal do Paraná. 2010.
- YOSHIDA, S.; HIRADATE, S.; TSUKAMOTO, K.; HATAKEDA, K.; SHIRATA, A. Antimicrobial activity of culture filtrate of *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2 isolated from mulberry leaves. **Phytopathology**, St Paul, v.91, n.2, p.181-187, 2001.
- ZUCCHI, T. B.; MELO, I. S. Controle biológico de fungos aflatoxigênicos. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. (Ed.). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Embrapa Meio Ambiente: Jaguariúna, 2009. p. 69-85.