

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade



Dissertação

**INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NA PRODUÇÃO DE
COMPOSTOS ANTIMICROBIANOS E NO CONTROLE DA MANCHA-
PARDA DO ARROZ POR BACTÉRIAS BIOCONTROLADORAS**

Bruna Rohrig

Pelotas, 2019

Bruna Rohrig

**INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NA PRODUÇÃO DE
COMPOSTOS ANTIMICROBIANOS E NO CONTROLE DA MANCHA-
PARDA DO ARROZ POR BACTÉRIAS BIOCONTROLADORAS**

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

Orientadora: Dr^a. Andrea Bittencourt Moura
Coorientadora: Dr^a. Juliane Ludwig
Coorientadora: Dr^a. Renata Moccellini

Pelotas, 2019

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

R739i Rohrig, Bruna

Influência da temperatura na produção de compostos antimicrobianos e no controle da mancha-parda do arroz por bactérias biocontroladoras / Bruna Rohrig ; Andrea Bittencourt Moura, orientadora ; Juliane Ludwig, Renata Moccellin, coorientadoras. — Pelotas, 2019.

81 f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2019.

1. Controle biológico. 2. *Oryza sativa* L.. 3. Pulverização foliar. 4. *Bipolaris oryzae*. 5. Mudanças climáticas. I. Moura, Andrea Bittencourt, orient. II. Ludwig, Juliane, coorient. III. Moccellin, Renata, coorient. IV. Título.

CDD : 633.18

Elaborada por Gabriela Machado Lopes CRB: 10/1842

Banca Examinadora

Prof^a. Dra. Andrea Bittencourt Moura
(Orientadora)

Prof^a. Dra. Juliane Ludwig

Prof^a. Dra. Danielle Ribeiro de Barros

Dra. Márcia Soares Chaves

*Aos meus pais Afonso Silvestre Rohrig, Leonila Joana Schneider e meu irmão
Daniel Rohrig, dedico*

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida, saúde, sabedoria, força e tudo que tem me proporcionado até o momento, gratidão.

Aos meus pais, Afonso Silvestre Rohrig e Leonila Joana Schneider, meu irmão Daniel Rohrig, por todo amor, compreensão, incentivo e apoio incondicional, sem vocês essa etapa não seria possível de ser vencida, imensa gratidão.

Ao meu namorado Kaliton Prestes pela compreensão, presença, ânimo, carinho e principalmente paciência, muito obrigada.

A Prof^a Dr^a. Andréa Bittencourt Moura, pela orientação, conselhos, ensinamentos, pelo suporte, correções, incentivo, confiança e paciência durante esses dois anos.

A Dr^a Renata Moccellin, pela coorientação, amizade, conselhos e por todo apoio, obrigada.

Ao Dr. Ismail T. Sousa Júnior, que esteve presente durante todo este período, auxiliando nos experimentos, trocando experiências, agregando não apenas no âmbito profissional, mas também pessoal.

A Dr^a Juliane Ludwig, pelo estímulo para que desse início a esta jornada, pela coorientação e atenção.

Ao Professor Dr. Marcos Baccarin pela casa de vegetação e a Dr^a Cândida R. Jacobsen pela sala de incubação para a realização dos experimentos.

À técnica Rosana Serpa, muito mais que uma colega de trabalho, obrigada por ter me auxiliado na execução dos experimentos - gratidão, e a Rosária Helena Azambuja, sempre dispostas a ajudar e solucionar problemas.

Ao mestre Mauricio Sangiogo pela troca de experiências, apoio e auxílio nas análises estatísticas.

Às minhas amigas, colegas de profissão, grandes profissionais, Gisele Fabiana Zobot, Renata Moccellin e Vanessa Kwiatkowski pelo apoio, acompanhamento nas atividades desenvolvidas, incentivo e troca de experiências.

Aos amigos e colegas da Universidade Federal de Pelotas: Julia Pelegrineli Fasolin, Gisele Fabiana Zobot, Johan Bermudez, Viviana Gaviria, Vanessa Soares, Carolina Garcia Neves, Sílvia Letícia Santos da Paz Maiche e Wellington Rodrigues, que fizeram com que a universidade se tornasse um ambiente mais leve e familiar, obrigada por dividirem seus anseios, angústias e também vitórias, pelos inúmeros abraços e palavras de conforto. Saibam que levarei vocês todos comigo, com muito carinho.

Aos professores do programa de Pós Graduação em Fitossanidade, a Universidade Federal de Pelotas e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela oportunidade de realização do curso.

A todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho, minha gratidão.

RESUMO

ROHRIG, Bruna. **Influência da temperatura na produção de compostos antimicrobianos e no controle da mancha-parda do arroz por bactérias biocontroladoras.** 2019. 81f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Brasil.

A utilização de microrganismos para o controle biológico de doenças de plantas apresenta-se como uma alternativa ao uso de agrotóxicos, causando menor impacto ambiental e proporcionando maior equilíbrio aos ecossistemas. Neste contexto, o objetivo do trabalho foi avaliar a capacidade de produção *in vitro* de compostos e o biocontrole *in vivo* por bactérias pré-selecionadas como biocontroladoras de mancha-parda do arroz (*Bipolaris oryzae*). Para tanto, os isolados DFs416 e DFs418 de *Bacillus* e, DFs185 e DFs223 de *Pseudomonas* foram estudados *in vitro*, avaliando seu crescimento, motilidade tipo *swarming*, produção de enzimas hidrolíticas (caseinases e lecitinases) e de compostos antimicrobianos voláteis e hidrossolúveis sob cinco temperaturas (17, 22, 27, 32 e 37 °C). O controle *in vivo* foi inicialmente avaliado em folhas destacadas (estádio V9/R1) a 27 °C (pulverização 48 e 24 horas antes e 24 e 48 horas depois da inoculação do patógeno) e posteriormente, *in planta* em estágio V3/V4 (pulverização foliar 48 e 24 horas antes da inoculação do patógeno a 17, 22, 27, 32 e 37 °C). Observou-se que a produção de compostos relacionados ao biocontrole foi influenciada pelas diferentes temperaturas, ocorrendo aumento, redução e até a ausência da produção dos compostos quando o crescimento se deu fora da faixa ótima, especialmente abaixo dela para os isolados de *Bacillus* e acima, para *Pseudomonas*. Também se observou, para alguns compostos, comportamento diferenciado entre isolados do mesmo gênero quando comparados entre si em cada temperatura. A pulverização preventiva das folhas destacadas (estádio V9/R1) com DFs416, DFs418, DFs185 e DFs223 reduziu a incidência e o tamanho das lesões da mancha parda em pulverizações preventivas. A pulverização curativa (24 horas) apresentou efeito pontual (DFs418 reduziu incidência e DFs185, incidência e severidade da doença). Todos os isolados avaliados *in planta* (plantas em estágio V3-V4) por pulverização preventiva diminuíram significativamente a área abaixo da curva de progresso da severidade da mancha parda, sendo o período mais eficiente de 48 horas. Embora a produção de compostos relacionados ao biocontrole tenha sido influenciada pela temperatura, tanto os isolados de *Bacillus*, quanto os de *Pseudomonas* mantêm o biocontrole da doença em todas as temperaturas estudadas.

Palavras-chave: Controle biológico, *Oryza sativa* L., pulverização foliar, *Bipolaris oryzae*, estresse ambiental, mudanças climáticas.

ABSTRACT

ROHRIG, Bruna. **Influence of temperature on the production of antimicrobial compounds and on the control of rice brown spot by biocontrol bacteria. 2019. 81f.** Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Brasil.

The use of microorganisms for the biological control of diseases represents an alternative to the use of pesticides for disease control, with less environmental impact and greater ecosystem balance. In this context, this study objective was to evaluate the *in vitro* production of compounds related to the biocontrol and the *in vivo* biocontrol of pre-selected bacteria as rice brown spot biocontrollers (*Bipolaris oryzae*). Therefore, the *Bacillus* isolates DFs416 and DFs418 and DFs185 and DFS223 *Pseudomonas* isolates were studied *in vitro*, evaluating their growth, swarm motility, production of hydrolytic enzymes (caseinases and lecithinases) and of volatile and soluble antimicrobial compounds in five temperatures (17, 22, 27, 32 and 37°C). *In vivo* control was evaluated first on leaves (V9 / R1 stage) at 27°C (leaf spray 48 and 24 hours before and 24 hours after inoculation of the pathogen) and after, *in planta* at V3/V4 stage (leaf spray 48 and 24 hours before inoculation pathogenic at 17, 22, 27, 32 and 37°C). It was observed that the production of compounds related to the biocontrol was influenced by the different temperatures, occurring increase, decrease and even absence of the production of the compounds when the growth occurred outside the optimal temperature range, especially below it for the *Bacillus* isolates and above it for *Pseudomonas*. We also observed, for some compounds, different behaviors among isolates of the same genus when compared to each other at each temperature. Preventive spraying of the detached leaves (stage V9 / R1) with DFs416, DFs418, DFs185 and DFs223 reduced the incidence and size of the brown spot in preventive sprays. The curative spraying (24 hours) showed specific effects (DFs418 reduced the incidence and DFs185, incidence and severity of the disease). All isolates evaluated *in planta* (plants at the V3-V4 stage) in preventive spraying of the leaf reduced the area under the severity progress curve of rice brown spot, being 48 hours the most efficient period. Although the production of compounds related to the biocontrol was influenced by temperature, the isolates of *Bacillus* and *Pseudomonas* maintained the biocontrol of the disease in all temperatures studied.

Key words: Biological control, *Oryza sativa* L., leaf spraying, *Bipolaris oryzae*, environmental stress, climate change.

Lista de Figuras

Figura 1- Curva de crescimento dos isolados biocontroladores medido por meio da absorbância (540nm) após 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 37, 30, 33, 36, 48 e 52 horas de incubação em meio Caldo Nutriente sob agitação contínua (100 rpm) em diferentes temperaturas (17, 22, 27, 32 e 37°C). DFs416- *Bacillus* sp.; DFs418- *Bacillus* sp.30

Figura 2- Motilidade do tipo swarming dos isolados biocontroladores após 48 horas de incubação em meio Luria-Bertani (0,6% de ágar) sob diferentes temperaturas (17, 22, 27, 32 e 37°C). (A) DFs416- *Bacillus* sp.; (B) DFs418- *Bacillus* sp; (C) comparação entre tratamentos em diferentes temperaturas. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). .31

Figura 3- Produção de caseinases de isolados biocontroladores em diferentes temperaturas de incubação em meio de cultura Leite-Ágar. (A) DFs416- *Bacillus* sp.; (B) DFs418- *Bacillus* sp.; (C) comparação entre tratamentos nas diferentes temperaturas após 48 horas de incubação. Para cálculo do diâmetro relativo do halo ($\emptyset RH$), foi utilizada a seguinte fórmula: $\emptyset RH = (\emptyset H - \emptyset C) / \emptyset C$, onde $\emptyset C$ = diâmetro das colônias, $\emptyset H$ = diâmetro dos halos formados, em dois sentidos diametralmente opostos. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).....33

Figura 4- Produção de lecitinases de isolados biocontroladores em diferentes temperaturas de incubação em meio de lecitina (4%). (A) DFs416- *Bacillus* sp.; (B) comparação entre tratamentos em diferentes temperaturas após 48 horas de incubação. Para cálculo do diâmetro relativo do halo ($\emptyset RH$), foi utilizada a seguinte fórmula: $\emptyset RH = (\emptyset H - \emptyset C) / \emptyset C$, onde $\emptyset C$ = diâmetro das colônias, $\emptyset H$ = diâmetro dos halos formados, em dois sentidos diametralmente opostos. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). .34

Figura 5- Crescimento micelial de *Bipolaris oryzae* pelos isolados biocontroladores por meio de compostos voláteis após 5 dias de incubação em placas de Petri contendo BDA ½ dextrose sob diferentes temperaturas. (A) DFs416- *Bacillus* sp.; (B) DFs418- *Bacillus* sp; (C)- comparação entre tratamentos em diferentes temperaturas. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).36

Figura 6- Crescimento micelial de *Bipolaris oryzae* em pareamento com isolados biocontroladores em meio BDA ½ dextrose após 6 dias de incubação sob diferentes temperaturas. (A) DFs416- *Bacillus* sp.; (B) DFs418- *Bacillus* sp; (C) comparação entre tratamentos em diferentes temperaturas. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).....37

Figura 7- Severidade da mancha-parda representada pela área abaixo da curva de progresso da severidade (AACPS) em plantas de arroz em estágio V3-V4, pulverizadas com biocontroladores em diferentes períodos (48 e 24 horas antes da inoculação de *Bipolaris oryzae*) e submetidas a diferentes temperaturas (17, 22, 27,

32 e 37°C) por 48 horas. Avaliações realizadas 3, 6, 9, 12 e 15 dias após a inoculação do patógeno e posteriormente mantidas a 25°C. (A) comparação entre períodos de aplicação; (B) comparação entre tratamentos nas diferentes temperaturas; (C) efeito da temperatura no isolado DFs416- *Bacillus* sp.; DFs418- *Bacillus* sp. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).....40

Figura 8- Curva de crescimento dos isolados biocontroladores medido por meio da absorbância (540nm) após 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 37, 30, 33, 36, 48 e 52 horas de incubação em meio Caldo Nutriente sob agitação contínua (100 rpm) em diferentes temperaturas (17, 22, 27, 32 e 37°C). DFs185- *Pseudomonas synxantha*; DFs223- *Pseudomonas fluorescens*. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 9- - Motilidade do tipo swarming dos isolados biocontroladores após 48 horas de incubação em meio Luria-Bertani (0,6% de ágar) sob diferentes temperaturas (17, 22, 27, 32 e 37°C). (A) DFs185- *Pseudomonas synxantha*; (B) DFs223- *Pseudomonas fluorescens*; (C) comparação entre tratamentos em diferentes temperaturas. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).....55

Figura 10- Produção de caseinases de isolados biocontroladores em diferentes temperaturas de incubação em meio de cultura Leite-Ágar. (A) DFs185- *Pseudomonas synxantha*; (B) DFs223- *Pseudomonas fluorescens*; (C) comparação entre tratamentos em diferentes temperaturas após 48 horas de incubação. Para cálculo do diâmetro relativo do halo ($\emptyset RH$), foi utilizada a seguinte fórmula: $\emptyset RH = (\emptyset H - \emptyset C) / \emptyset C$, onde $\emptyset C$ = diâmetro das colônias, $\emptyset H$ = diâmetro dos halos formados, em dois sentidos diametralmente opostos. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).....56

Figura 11- Produção de lecitinases de isolados biocontroladores em diferentes temperaturas de incubação em meio de lecitina (4%). (A) DFs185- *Pseudomonas synxantha*; (B) DFs223- *Pseudomonas fluorescens*; (C) comparação entre tratamentos em diferentes temperaturas, após 48 horas de incubação. Para cálculo do diâmetro relativo do halo ($\emptyset RH$), foi utilizada a seguinte fórmula: $\emptyset RH = (\emptyset H - \emptyset C) / \emptyset C$, onde $\emptyset C$ = diâmetro das colônias, $\emptyset H$ = diâmetro dos halos formados, em dois sentidos diametralmente opostos. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).....58

Figura 12- Crescimento micelial de *Bipolaris oryzae* pelos isolados biocontroladores por meio de compostos voláteis após 5 dias de incubação em placas de Petri contendo BDA ½ dextrose sob diferentes temperaturas. (A) DFs185- *Pseudomonas synxantha*; (B) DFs223- *Pseudomonas fluorescens*; (C) comparação entre tratamentos em diferentes temperaturas. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).59

Figura 13- Crescimento micelial de *Bipolaris oryzae* em pareamento com os isolados biocontroladores em meio BDA ½ dextrose após 6 dias de incubação sob diferentes temperaturas. (A) DFs185- *Pseudomonas synxantha*; (B) DFs223- *Pseudomonas*

fluorescens; (C) comparação entre tratamentos em diferentes temperaturas. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).....60

Figura 14- Severidade da mancha-parda representada pela área abaixo da curva de progresso da severidade (AACPS) em plantas de arroz em estágio V3-V4, pulverizadas com biocontroladores em diferentes períodos (48 e 24 horas antes da inoculação de *Bipolaris oryzae*) e submetidas a diferentes temperaturas (17, 22, 27, 32 e 37°C) por 48 horas. Avaliações realizadas 3, 6, 9, 12 e 15 dias após a inoculação do patógeno e posteriormente mantidas a 25°C. (A) comparação entre tratamentos nas diferentes temperaturas; (B) comparação entre períodos de aplicação. DFs185- *Pseudomonas synxantha*; DFs223- *Pseudomonas fluorescens*. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).63

Lista de tabelas

Tabela 1- Biocontrole <i>in vivo</i> da mancha-parda (<i>Bipolaris oryzae</i>) representada pela medição do tamanho das lesões a partir do software ImageJ em folhas destacadas de arroz em estágio V9 pulverizadas com isolados biocontroladores 24 e 48 horas antes da inoculação do patógeno (B.O). DFs416- <i>Bacillus</i> sp.; DFs418- <i>Bacillus</i> sp.....	38
Tabela 2- Biocontrole <i>in vivo</i> da mancha-parda (<i>Bipolaris oryzae</i>) representada pela medição do tamanho das lesões a partir do software ImageJ em folhas destacadas de arroz em estágio V9 pulverizadas com isolados biocontroladores 24 e 48 horas depois da inoculação do patógeno (B.O). DFs416- <i>Bacillus</i> sp.; DFs418- <i>Bacillus</i> sp.....	39
Tabela 3- Biocontrole <i>in vivo</i> da mancha-parda (<i>Bipolaris oryzae</i>) representada pela medição do tamanho das lesões a partir do software ImageJ em folhas destacadas de arroz em estágio V9 pulverizadas com isolados biocontroladores 24 e 48 horas antes da inoculação do patógeno (B.O). DFs185- <i>Pseudomonas synxantha</i> ; DFs223- <i>Pseudomonas fluorescens</i>	61
Tabela 4- Biocontrole <i>in vivo</i> da mancha-parda (<i>Bipolaris oryzae</i>) representada pela medição do tamanho das lesões a partir do software ImageJ em folhas destacadas de arroz em estágio V9 pulverizadas com isolados biocontroladores 24 e 48 horas depois da inoculação do patógeno (B.O). DFs185- <i>Pseudomonas synxantha</i> ; DFs223 <i>Pseudomonas fluorescens</i>	62

SUMÁRIO

1. Introdução Geral	16
2. Título I: Influência da temperatura na produção de compostos antimicrobianos e no controle da mancha-parda do arroz por bactérias biocontroladoras do gênero <i>Bacillus</i>.	20
2.1 Material e Métodos	23
2.1.1 Isolados bacterianos e condições de cultivo	23
2.1.2 Avaliação do crescimento em diferentes temperaturas	23
2.1.3 Avaliação da motilidade em diferentes temperaturas	24
2.1.4 Avaliação da produção de compostos relacionados ao biocontrole em diferentes temperaturas	24
2.1.4.1 Enzimas hidrolíticas: proteinases e lipases	25
2.1.4.2 Compostos antimicrobianos: voláteis e hidrossolúveis	25
2.1.4.3 Compostos voláteis.....	25
2.1.4.4 Compostos hidrossolúveis	26
2.1.5 Biocontrole <i>in vivo</i> da mancha-parda.....	26
2.1.5.1 Folhas destacadas de arroz em estágio V9/R1	26
2.1.5.2 Plantas de arroz em estágio V3 em diferentes temperaturas	27
2.1.6 Procedimentos Estatísticos.....	29
2.2 Resultados.....	30
2.2.1 Curvas de crescimento quantitativo	30
2.2.2 Motilidade	30
2.2.3 Enzimas hidrolíticas: proteinases e lipase	32
2.2.4 Compostos antimicrobianos: voláteis e hidrossolúveis	34
2.2.5 Biocontrole <i>in vivo</i> da mancha-parda.....	38
2.2.5.1 Folhas destacadas de arroz em estágio V9/R1	38
2.2.5.2 Plantas de arroz em estágio V3 em diferentes temperaturas	39
2.3 Discussão	41
3. Título II: Influência da temperatura na produção de compostos antimicrobianos e no controle da mancha-parda do arroz por bactérias biocontroladoras do gênero <i>Pseudomonas</i>.	48
3.1 Material e Métodos	52
3.2 Resultados.....	53
3.2.1 Curva de crescimento quantitativo.....	53
3.2.2 Motilidade	54

3.2.3 Enzimas hidrolíticas: proteinases e lipases	55
3.2.4 Compostos antimicrobianos: voláteis e hidrossolúveis	58
3.2.5 Biocontrole <i>in vivo</i> da mancha-parda	61
3.2.5.1 Folhas destacadas de arroz em estágio V9/R1	61
3.2.5.2 Plantas de arroz em estágio V3 em diferentes temperaturas	62
3.3 Discussão	64
4. Considerações Finais	70
5. Conclusões Gerais	71
Referências	72

1. Introdução Geral

O arroz (*Oryza sativa* L.) é um dos principais alimentos consumidos no Brasil e no mundo, independentemente da classe social. Possui elevada importância econômico-social mundial, relacionada à geração de empregos e renda para os países produtores (FAO, 2016).

Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2018) na safra 2017/18, a produção total do país foi de aproximadamente 11,6 milhões de toneladas em uma área de 1,94 milhões de hectares. Apesar do grande volume produzido, existem diversos fatores que contribuem para a redução da produtividade e qualidade do produto colhido, fatores estes de ordem abiótica, influenciados pelas condições ambientais e principalmente fatores bióticos, como a incidência de doenças (MACLEAN et al., 2013).

Dentre as doenças fúngicas que incidem sobre a cultura, destacam-se aquelas da parte aérea, como a mancha-parda [*Bipolaris oryzae* (Breda de Haan) Shoem - teleomorfo: *Cochliobolus miyabeanus* (Ito & Kuribayashi)], brusone [*Pyricularia grisea* (Cooke) - teleomorfo: *Magnaphorte grisea* (T.T. Herbert) Yaegashi & Udagawa], escaldadura [*Gerlachia oryzae* (Hashioka & Yokogi) W. Gams - teleomorfo: *Monographella albescens* (Thümen) Parkinson, Sivanesan e C. Booth] e a queima-das-bainhas [*Rhizoctonia solani* Kuhn - teleomorfo: *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk], capazes de reduzir a produtividade da cultura em até 50% (BEDENDO; PRABHU, 2016).

A mancha-parda encontra-se amplamente distribuída nas regiões de produção de arroz pelo mundo, principalmente em zonas de clima tropical (FARR; ROSSMAN, 2018). A severidade da doença varia de acordo com as condições ambientais, cultivares utilizadas, estágio vegetativo da planta, sendo os estágios iniciais e finais os mais suscetíveis (BARNWAL, et al., 2013). Os sintomas podem ser encontrados em toda planta, concentrando-se em folhas e grãos em forma de manchas de cor marrom escuro ou marrom avermelhado, arredondadas ou ovaladas, apresentando centro cinza (BEDENDO; PRABHU, 2016).

Diante da grande importância econômico-social da cultura do arroz, buscam-se alternativas para o controle de suas doenças, a fim de obter maior produção aliada à qualidade dos grãos. Além disso, uma vez que o arroz é cultivado principalmente sob sistema irrigado, há uma preocupação crescente com os

problemas ambientais causados pelas atividades agrícolas desenvolvidas, manejo e principalmente pela utilização indiscriminada de agrotóxicos no controle de pragas (GUPTA, 2016).

Dentre os métodos de controle recomendados para a mancha parda, encontram-se o controle genético – que consiste no emprego de cultivares resistentes, entretanto a resistência por parte das cultivares pode ser facilmente quebrada pelo surgimento de novas raças do patógeno; o controle cultural - envolvendo preparo antecipado do solo, utilização de sementes saudáveis, adubação recomendada para a cultura (AGRIOS, 2005); o controle químico - através do uso de fungicidas, principalmente dos grupos químicos dos triazóis, estrobilurinas e ditiocarbamatos (AGROFIT, 2018), aplicadas em sementes ou pulverizações durante o desenvolvimento da cultura, que podem causar contaminação do ambiente; e o controle biológico, o qual consiste na introdução de microrganismos biocontroladores, capazes de inibir o desenvolvimento de fitopatógenos através de uma série de mecanismos (BEDENDO, MASSOLA, AMORIM, 2011).

A utilização de microrganismos para o controle biológico de doenças de plantas apresenta-se como uma alternativa ao uso de agrotóxicos no controle de doenças, causando menor impacto ambiental, proporcionando maior equilíbrio aos ecossistemas (BEDENDO, MASSOLA, AMORIM, 2011; WU et al., 2014).

A utilização de microrganismos que atuam por diferentes mecanismos de ação, englobando antagonismo pela produção de antibióticos; parasitismo pela produção de enzimas hidrolíticas capazes de degradar a parede celular dos fungos fitopatogênicos; competição por espaço e nutrientes no ambiente em que estão inseridas; e indução de resistência tem se mostrado eficientes, tanto por fungos como por bactérias (BURKEOTOVÁ et al., 2015; SINGH et al., 2019).

Microrganismos com potencial para o controle biológico de doenças devem apresentar concomitantemente uma série de características desejáveis: capacidade de sobrevivência, persistência e multiplicação no ambiente em que estão inseridos; atuação por diferentes mecanismos de controle; não ser patogênico ao homem, aos animais e as plantas cultivadas; ser de fácil adaptação no ambiente; ser compatível com agrotóxicos utilizados na cultura (manejo integrado); ter baixa frequência de mutações; ser de fácil cultivo, multiplicação e formulação; ter ação contra diversos fitopatógenos; atuar em diferentes plantas hospedeiras e ser resistente a baixas e altas temperaturas (BEDENDO, MASSOLA, AMORIM, 2011). A combinação dessas

características é importante e determinante para o sucesso do biocontrole de doenças.

Têm crescido os debates e pesquisas ligados a questões ambientais, como o efeito das mudanças climáticas sobre os ecossistemas e o impacto das atividades agrícolas sobre o ambiente. Sendo assim, para aumentar a produção agrícola de maneira sustentável, buscam-se alternativas que proporcionem maior resiliência aos cultivos agrícolas, possibilitando a oferta de alimentos utilizando menos recursos, e gerando menor impacto negativo ao ambiente (RINGLER et al., 2014).

Os efeitos das mudanças climáticas sobre o ambiente englobam o aumento da temperatura média da superfície do planeta (0,2°C a cada década), o aumento da concentração de dióxido de carbono (CO₂) atingindo níveis superiores aos relatados nos últimos 800 anos; aumento do nível do mar pelo descongelamento das geleiras polares, ressecamento acelerado da superfície do solo pela diminuição de períodos chuvosos, aliado a temperaturas mais elevadas; e destruição da camada de ozônio, desencadeada principalmente pelo aumento da emissão de gases de efeito estufa, resultando em maior radiação ultravioleta-B (UV-B) sobre a superfície do planeta (LETCHER, 2016).

Sabe-se que o ambiente influencia a suscetibilidade da planta hospedeira, em todas as etapas da interação planta-patógeno-biocontroladores. Por outro lado, as variáveis: umidade relativa do ar, temperatura, radiação UV, vento, afetam diretamente o desenvolvimento, multiplicação, sobrevivência e atividades dos microrganismos (BEDENDO, MASSOLA, AMORIM, 2011).

As variações ambientais podem interferir no metabolismo dos microrganismos biocontroladores de modo a diminuir ou aumentar a produção, ou degradação de compostos envolvidos no biocontrole, da mesma forma afeta organismos saprófitos e endofíticos que interagem com as plantas (patógenos e agentes de biocontrole), interferindo na ocorrência e desenvolvimento das doenças de plantas (BEDENDO, MASSOLA, AMORIM, 2011). No entanto, são poucas as informações sobre os efeitos das mudanças climáticas em relação ao controle biológico de doenças de plantas.

Embora os microrganismos tenham sido capazes de colonizar grande parte da biosfera terrestre com sucesso, alguns grupos são adaptados a crescer e produzir compostos em baixas temperaturas, respondendo de forma eficiente em temperaturas amenas (MEENA et al., 2015). Em contrapartida, outros grupos

apresentam adaptação à temperaturas elevadas, sendo eficientes em condições específicas de temperatura (CHANG, YANG, 2009).

Existem relatos do emprego de bactérias aplicadas via microbiolização de sementes (SABATÉ et al., 2017; GOWTHAM et al., 2018) pulverização foliar (AGRIOS, 2005; MENG et al., 2015; TOKPAH et al., 2016; YANG, ZHANG, XIAO, 2017; LIU et al., 2018) ou solo (ROY et al., 2018) em arroz (VIDHYASEKARAN et al., 1997; VIDHYASEKARAN, MUTHAMILAN, 2010; CHANDLER, et al., 2015; MENG et al., 2015) e em diferentes culturas (KHEDHER et al., 2015; SARWAR et al., 2018; YANG et al., 2018), buscando controlar doenças fúngicas e bacterianas, sendo estas aplicadas separadamente sobre as culturas, ou em misturas, até mesmo utilizando moléculas químicas, trazendo níveis de controle satisfatórios. Entretanto, informações acerca do efeito da pulverização foliar sob estresses ambientais de agentes de biocontrole sobre plantas são restritas na cultura do arroz, especialmente para controle da mancha parda.

Nesse contexto, o grupo de pesquisa do Programa de Pós Graduação em Fitossanidade da Universidade Federal de Pelotas, intitulado “Bactérias Biocontroladoras de Doenças de Plantas e Promotoras de Crescimento Vegetal”, selecionou, após vários anos de pesquisa, as bactérias biocontroladoras DFs416, DFs418, DFs185 e DFs223 com potencial para o controle de doenças da cultura do arroz (LUDWIG et al., 2009; SOUZA JÚNIOR et al., 2010; MOURA et al., 2014; SOUZA JÚNIOR et al., 2017) assim como controle de fitonematóides (SOUZA JÚNIOR et al., 2010; LUDWIG, MOURA, GOMES, 2013), quando utilizadas individualmente ou em combinação para a microbiolização de sementes. Entretanto, o comportamento destas bactérias biocontroladoras é conhecido apenas quando aplicadas via tratamento de sementes, sendo necessário explorar seu efeito quando aplicado via pulverização foliar, bem como em quais períodos de aplicação sua eficiência é maximizada.

Diante disso, este estudo teve como objetivo avaliar o crescimento e a capacidade de produção de compostos relacionados ao biocontrole *in vitro*, e o biocontrole *in vivo*, de bactérias pré-selecionadas como biocontroladoras de mancha-parda da cultura do arroz, sob condições de estresses de temperatura.

2. Título I: Influência da temperatura na produção de compostos antimicrobianos e no controle da mancha-parda do arroz por bactérias biocontroladoras do gênero *Bacillus*.

A produtividade de arroz está relacionada ao seu potencial genético, condições climáticas favoráveis e principalmente a presença de fitopatógenos capazes de diminuir a área fotossintetizante ativa das plantas, causando sua senescência precoce. Várias são as doenças responsáveis por essa redução, tendo destaque a brusone (*Magnaphorte grise*), escaudadura (*Monographella albescens*), queima-das-bainhas (*Thanatephorus cucumeris*) e a mancha-parda, causada pelo fungo *Bipolaris oryzae* (teleomorfo: *Cochiobolus miyabeanus*) (BEDENDO, PRABHU, 2016).

Os sintomas da mancha-parda consistem em lesões que variam de coloração castanho-avermelhado para marrom escuro, centro cinza e margem escura, de halo amarelo brilhante. A severidade dos sintomas é afetada diretamente pelas condições ambientais, uma vez que é favorecida em temperaturas que variam de 20 à 30°C, além disso, a suscetibilidade ao patógeno é acentuada nos primeiros estádios vegetativos (até V4), e aumenta a partir da fase de emborrachamento, diminuindo número de plântulas e grãos, peso de panículas, além de estar presente em todas as áreas orízicolas do mundo (DALLAGNOL; RODRIGUES; DAMATTA, 2011; BARNWAL et al., 2013; BEDENDO, PRABHU, 2016).

O controle da mancha-parda é realizado basicamente por fungicidas, que podem contaminar o meio ambiente, além de ocasionar o surgimento de populações de fitopatógenos resistentes pelo uso excessivo, e diminuir a população de microrganismos benéficos presentes no ambiente (CHEEKE; COLEMAN; WALL, 2012; GNANAMANGAI, PONMURUNGAN, 2012; GUPTA, 2016).

Deste modo, o controle biológico realizado através do emprego de microrganismos biocontroladores se apresenta como alternativa para controle da mancha-parda na cultura do arroz. Diversos estudos demonstram a efetividade do uso de bactérias biocontroladoras de doenças do arroz, especialmente bactérias do

gênero *Bacillus* (CHANDLER, et al., 2015), através da microbiolização de sementes (LUDWIG et al., 2009), pulverização foliar (MENG et al., 2015), combinadas com fungicidas (LIU et al., 2018), assim como em diferentes culturas (KHEDLER et al., 2015; SARWAR et al., 2018; YANG et al., 2018) proporcionando controles semelhantes ou superiores aos obtidos pelo controle químico em casa de vegetação e a campo.

Bactérias do gênero *Bacillus* são microrganismos Gram-positivos, em forma de bastonetes, apresentam metabolismo anaeróbico facultativo, e tem como temperatura ideal de crescimento de 25 à 35°C. Uma das principais características do gênero é a produção de endósporos, estruturas de resistência no ambiente, que permitem permanecer viáveis e sobreviver sob condições extremas de estresse durante anos (SHAFI; TIAN; JI, 2017). Habitam nichos ecológicos distintos, capazes de se estabelecer no ar, água, solo, superfície ou internamente à plantas e animais (ONGENA et al., 2005; CONNOR et al., 2010).

Estas bactérias são conhecidas pela produção de diversos compostos relacionados ao biocontrole de doenças de plantas, envolvendo diferentes modos de ação sobre os fitopatógenos, como a antibiose, pela produção de lipopeptídeos e compostos antimicrobianos, dentre bacteriocinas, iturinas, fengicinas, surfactinas, plipastatina, bacilomicina e difucidina (SHARMA, SINGH, VERMA, 2018; YANG et al., 2018). São ótimas competidoras por espaço e nutrientes, como o ferro, podendo produzir sideróforos, sendo capazes de colonizar rapidamente os ambientes em que estão inseridas (SHAFI; TIAN; JI, 2017). Podem atuar diretamente e indiretamente como promotoras de crescimento vegetal, a partir da síntese de fitohormônios, como ácido indol-3-acético e o ácido giberélico (SHAFI; TIAN; JI, 2017). Além disso, induzem resistência sistêmica contra fitopatógenos (CHOWDAPPA et al., 2013).

Adicionalmente, contribuem para a superação de estresses abióticos, como estresse salino (LASTOCHKINA et al., 2017), tolerância à temperaturas elevadas e deficiência hídrica (SUKKASEM et al., 2018), e são eficientes nos processos de mobilização e imobilização de metais pesados presentes no solo (SINGH et al., 2018).

O gênero *Bacillus* forma endósporos, estrutura que confere resistência a altas temperaturas e ao ressecamento, o que facilita o processo de sua produção em

grande escala e aumenta o tempo de prateleira da formulação produzida. Conhecer melhor seus mecanismos de ação e a influência dos estresses ambientais no seu desempenho se torna importante do ponto de vista científico e comercial.

Diante disso, utilizar espécies de *Bacillus* se mostra uma alternativa sustentável, capaz de conferir benefícios para superação de estresses bióticos e abióticos. Compreender a interação entre estas bactérias e plantas, e buscar soluções para a produção agrícola sob mudanças climáticas se torna importante, visto que a temperatura influencia diretamente na regulação e metabolismo tanto das plantas como dos microrganismos (KUMAR; VERMA, 2018).

Bactérias do gênero *Bacillus* são sabidamente eficientes no controle de diversas doenças da cultura do arroz, especialmente a mancha parda. Os isolados DFs416 e DFs418 são conhecidos por controlar *B. oryzae* via tratamento de sementes, entretanto pouco se sabe sobre o efeito desses microrganismos sob condições de estresses ambientais, especialmente temperatura, assim como seu comportamento quando aplicadas via pulverização foliar. Portanto, o objetivo do trabalho foi avaliar *in vitro* o crescimento e a produção de compostos relacionados ao biocontrole, e o biocontrole *in vivo* sob condições de estresses de temperatura, utilizando bactérias do gênero *Bacillus* pré-selecionadas como biocontroladoras da mancha-parda na cultura do arroz.

2.1 Material e Métodos

2.1.1 Isolados bacterianos e condições de cultivo

Os isolados utilizados pertencem à coleção do Laboratório de Bacteriologia Vegetal da Universidade Federal de Pelotas, identificados como DFs416 (*Bacillus* sp. Cohn) e DFs418 (*Bacillus* sp.), ambos contaminantes indicadores de antibiose, isolados de placas cultivadas de *B. oryzae*. Em trabalhos anteriores foi comprovado que esses isolados são capazes de exercer o biocontrole de diferentes doenças do arroz (SOUZA JÚNIOR et al., 2017; MOURA et al., 2014; LUDWIG, MOURA, GOMES, 2013; SOUZA JÚNIOR et al, 2010; LUDWIG et al., 2009).

O meio básico utilizado para os ensaios *in vitro* foi nutriente-àgar (NA) (Difco™). Para realização dos ensaios *in vitro*, os isolados bacterianos foram cultivados previamente em NA, incubados à 27°C durante 24 horas e destas placas foram retirados discos de 5 mm para posterior distribuição em placas contendo meios específicos para cada avaliação de produção de compostos antimicrobianos. Quando foi necessário o cultivo em meio líquido, utilizou-se caldo nutriente (CN). Cada avaliação de produção de compostos antimicrobianos foi realizada em duplicata (duas épocas distintas), sendo as bactérias incubadas em diferentes temperaturas, a saber: 17°C, 22°C, 27°C, 32°C e 37°C ($\pm 2^\circ\text{C}$), em incubadoras tipo BOD (meios sólidos) ou em agitadores orbitais a 100 rpm (caldo nutriente).

2.1.2 Avaliação do crescimento em diferentes temperaturas

A avaliação do crescimento nas diferentes temperaturas foi realizada a partir de crescimento em meio CN de onde se retiraram alíquotas de 1 mL, que foram centrifugadas a 14000 g durante 3 minutos para lavagem das células. O sobrenadante resultante foi descartado e as bactérias suspensas adicionando-se 1 mL de solução salina 0,85%, sendo novamente centrifugadas e ressuspensas. Cada suspensão foi calibrada em espectrofotômetro para $A_{540}=0,1$. Alíquotas de 100 μL foram repicadas para 30 mL de meio CN. As bactérias foram então incubadas nas diferentes temperaturas sob agitação constante. As avaliações foram

realizadas em espectrofotômetro, medindo-se a absorbância (A_{540}) 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 48, 54 horas de incubação.

2.1.3 Avaliação da motilidade em diferentes temperaturas

A avaliação da motilidade tipo swarming foi realizada em meio de cultura Lúria-Bertani (LB) a 0,6% de ágar (HUBER et al., 2003). Os isolados bacterianos foram previamente cultivados durante 48 horas em meio CN e preparados conforme descrito em 2.1.2. A concentração de cada suspensão foi ajustada para $A_{540}=0,2$. Da suspensão resultante, 5 μ L foram dispostos no centro das placas que foram incubadas nas diferentes temperaturas em BOD por 48 horas. A avaliação foi feita pela medição das colônias formadas, com paquímetro digital em dois sentidos diametralmente opostos após 48 horas de incubação.

2.1.4 Avaliação da produção de compostos relacionados ao biocontrole em diferentes temperaturas

Para a avaliação da capacidade das bactérias biocontroladoras produzirem enzimas hidrolíticas e compostos antimicrobianos foram utilizados meios específicos, vertidos 24 horas antes da utilização e mantidos em BOD, sob temperatura de 27°C para redução da umidade superficial.

Discos da cultura bacteriana, obtidos conforme descrito em 2.1.1 foram semeados em placas de Petri contendo os meios específicos, e essas incubadas sob as diferentes temperaturas. Foram utilizadas bactérias sabidamente positivas e negativas para a produção de cada composto como forma de controle para os testes realizados.

As avaliações foram quantitativas utilizando paquímetro digital, medindo-se os diâmetros das colônias ($\emptyset C$) e dos halos formados ($\emptyset H$), em dois sentidos diametralmente opostos, calculando-se o diâmetro relativo do halo. Para cálculo do diâmetro relativo de halo ($\emptyset RH$), foi utilizada a seguinte fórmula $\emptyset RH = (\emptyset H - \emptyset C) / \emptyset C$. Para todos os ensaios *in vitro*, o delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado (DIC), com quatro repetições, cuja unidade experimental foi

composta por uma placa de Petri. Todos os ensaios foram realizados em dois experimentos independentes.

2.1.4.1 Enzimas hidrolíticas: proteinases e lipases

Para avaliação da capacidade proteolítica, utilizou-se caseína como substrato, em meio de cultura Leite-Ágar (MARIANO; SILVEIRA, 2005), e para capacidade lipolítica, meio NA acrescido de solução comercial de gema de ovo a 4% (SCHAAD; JONES; CHUN, 2001). As avaliações foram realizadas após 48 horas de incubação, quando foram medidos os halos de degradação ao redor das colônias (halos translúcidos).

2.1.4.2 Compostos antimicrobianos: voláteis e hidrossolúveis

Para ambos os ensaios, a multiplicação prévia de *B. oryzae* foi realizada em meio de cultura BDA crescido a $22^{\circ}\text{C}\pm 2$ durante 15 dias.

As bactérias foram cultivadas conforme item 2.2.1 em meio líquido para avaliação de compostos voláteis, e meio sólido, para compostos hidrossolúveis. A avaliação foi realizada quando o tratamento testemunha atingiu o bordo da placa medindo-se o crescimento fúngico em dois sentidos diametralmente opostos para compostos voláteis (após 5 dias de incubação), e o raio para os hidrossolúveis (após 6 dias de incubação). Os resultados foram expressos em crescimento micelial (mm). Como tratamento testemunha, o fungo foi cultivado na ausência das bactérias biocontroladoras.

2.1.4.3 Compostos voláteis

Para produção de compostos antimicrobianos voláteis alíquotas de 100 μL de crescimento bacteriano em CN foram semeadas por espalhamento com alça de Drigalski na face inferior da placa (fundo). Na face superior da placa (tampa) um disco de micélio de *B. oryzae* de 5 mm foi depositado no centro da placa. As placas

foram vedadas com fita adesiva e ensacadas uma a uma em sacos zip, mantidas em BOD nas diferentes temperaturas.

2.1.4.4 Compostos hidrossolúveis

A produção de compostos antimicrobianos hidrossolúveis foi avaliada por pareamento de culturas (DENNIS; WEBSTER, 1971). Para tanto, discos de crescimento bacteriano foram depositados no bordo de cada placa e do lado oposto, um disco de micélio de *B. oryzae*.

2.1.5 Biocontrole *in vivo* da mancha-parda

Foi avaliada a eficiência de bactérias pré-selecionadas para tratamento de sementes quando aplicadas nas folhas para o controle da mancha-parda do arroz. Para tanto, foram utilizadas plantas de arroz (cultivar IRGA 420, suscetível a *B. oryzae*) conduzidas em solo não autoclavado e crescidas em casa de vegetação até o estágio V3/V4 ou V9/R1, que representam aquele em que ocorrem maiores danos decorrentes da mancha parda.

Para a produção de esporos de *B. oryzae*, discos de micélio de 5 mm foram depositados no centro de placas de Petri contendo meio de cultura ágar-água (2%) e pedaços de tifa (*Typha angustifolia*) estéreis, cultivados durante 15 dias, sob temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 horas.

Para eliminar outras causas de variação foi realizado o monitoramento da presença do patógeno com plantas não inoculadas.

2.1.5.1 Folhas destacadas de arroz em estágio V9/R1

Esta avaliação foi realizada com folhas destacadas (metodologia adaptada de KUMAR et al., 2011) utilizando segmentos de folhas do terço mediano coletadas previamente e mantidas em água da torneira a 25°C por 24 horas. Posteriormente, as folhas foram acomodadas em caixas gerbox (4 segmentos/gerbox) onde foram

depositadas previamente duas folhas de papel mata borrão umedecidas com água destilada autoclavada. Cinco tiras de papel toalha (2 cm x 9 cm) foram acomodadas sobre o papel mata borrão e outro tanto acima dos segmentos de folhas, de modo que as folhas não tocassem o papel mata borrão e não se enrolassem.

Para preparo da suspensão bacteriana, as bactérias biocontroladoras foram crescidas em meio de cultura NA por 48 horas a 27°C, suspendidas em solução salina, cujas concentrações foram ajustadas em espectrofotômetro ($A_{540}=0,5$). Para pulverização das suspensões bacterianas, utilizaram-se borrifadores manuais. As folhas foram pulverizadas até o ponto de escorrimento em diferentes períodos, 48 e 24 horas antes (pulverização preventiva) e 24 e 48 horas depois da inoculação do patógeno (pulverização curativa). O tratamento testemunha foi pulverizado com solução salina.

A suspensão de esporos do patógeno foi preparada com solução de gelatina (1%), ajustada a concentração em 10^4 esporos mL^{-1} . A inoculação foi feita pela deposição equidistantes de três gotas da suspensão (10 μL) de na face adaxial de cada segmento. Após a primeira pulverização das bactérias biocontroladoras (48 horas antes da inoculação do patógeno), todas as caixas gerbox (pulverizadas ou não) foram incubadas em câmara de crescimento, sob temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 horas.

O experimento foi realizado em duplicata (épocas diferentes). A severidade da mancha parda foi avaliada por programa de imagem (ImageJ). O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial 4 x 3 (4 períodos de pulverização foliar x 2 isolados bacterianos + testemunha), com quatro repetições cuja parcela experimental foi uma caixa gerbox

2.1.5.2 Plantas de arroz em estágio V3 em diferentes temperaturas

Para esta avaliação foi utilizada somente pulverizações preventivas (24 e 48 horas antes da inoculação) com suspensões bacterianas preparadas e pulverizadas conforme descrito no item 2.1.5.1. Após as pulverizações as plantas foram mantidas durante 48 horas em BOD, nas diferentes temperaturas, sob fotoperíodo de 12 horas.

Para a inoculação do patógeno as plantas foram pulverizadas uniformemente com suspensão de esporos preparada conforme descrito em 2.1.5.1, e mantidas em câmara úmida durante 48 horas. Posteriormente as plantas foram transferidas para câmara de crescimento e mantidas a 25°C durante 15 dias.

Para avaliar a severidade da mancha parda, contou-se o número de lesões na terceira folha, em intervalos de três dias. Calculou-se a área abaixo da curva de progresso da severidade (AACPS), de acordo com a equação de CAMPBELL e MADDEN (1990).

O experimento foi realizado em delineamento blocos ao acaso (DBC), em esquema fatorial 5 X 3 (5 temperaturas x 2 isolados bacterianos + testemunha) com quatro repetições de parcelas experimentais constituídas de uma planta.

2.1.6 Procedimentos Estatísticos

Os procedimentos estatísticos foram realizados pelo programa R 3.5.1 (R Core Team, 2018). Quando a variância entre os experimentos foi homogênea (teste F para duas variâncias), foi feita a análise conjunta dos experimentos (PIMENTEL-GOMES, 2009). Para os ensaios *in vitro* e com plantas em estádio V3, foi realizada análise de variância (ANOVA), e quando a interação foi significativa foi feito o desdobramento da interação, realizando comparações de médias pelo teste de Tukey, comparando os tratamentos dentro de cada nível de temperatura e ajustando regressão para o efeito de temperaturas dentro de cada nível de tratamento. Foi considerado como significativo um valor-p menor ou igual a 0,05.

Para a avaliação em folhas destacadas em estádio V9/R1, cujos dados não atenderam aos pressupostos da ANOVA (normalidade e homocedasticidade dos resíduos), foram realizadas análises não-paramétricas, conforme recomendações de Wobbrock et al. (2011). Havendo interação significativa entre os fatores, foi feito o desdobramento da interação por meio da realização do teste de Kruskal-Wallis e teste de comparação múltipla de Dunn. Foi considerado como significativo um valor-p menor ou igual a 0,05.

2.2 Resultados

2.2.1 Curvas de crescimento quantitativo

As curvas de crescimento dos isolados de *Bacillus* DFs416 e DFs418 (Fig.1), em meio líquido sob agitação, foram semelhantes para cada temperatura testada. A fase lag para todas as temperaturas, exceto em 17°C, se deu até as 6 horas de incubação. Para a temperatura de 17°C a fase log se iniciou a partir das 18 horas de incubação. Nas demais temperaturas, a fase log teve início entre 3 e 6 horas de incubação. O comportamento de ambos os isolados também foi semelhante em relação ao início da fase estacionária, ocorrendo a partir das 18 horas para 37°C, 23 horas para 32°C, 20 horas para as temperaturas de 22 e 27°C e somente após as 36 horas de incubação para a temperatura de 17°C. Ambos os isolados apresentaram maior absorvância na temperatura de 37°C.

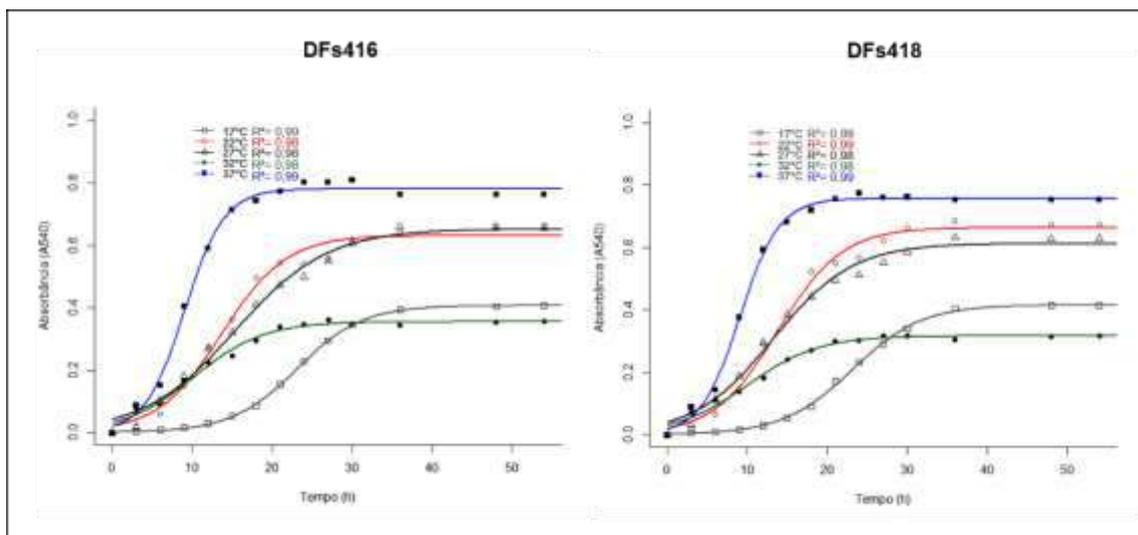


Figura 1- Curva de crescimento dos isolados biocontroladores medido por meio da absorvância (540nm) após 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 37, 30, 33, 36, 48 e 52 horas de incubação em meio Caldo Nutriente sob agitação contínua (100 rpm) em diferentes temperaturas (17, 22, 27, 32 e 37°C). DFs416- *Bacillus* sp.; DFs418- *Bacillus* sp.

2.2.2 Motilidade

Para motilidade do tipo swarming em meio Luria-Bertani (0,6% de ágar) após 48 horas de incubação, ocorreu interação significativa entre isolados e temperaturas. Para ambos os isolados, ajustou-se equações polinomiais de terceiro grau, correspondendo a $R^2=0,95$ e $R^2=0,96$ respectivamente.

Para DFs416 (Fig.2A) a maior motilidade foi observada nas temperaturas de 22, 32 e 37°C e para DFs418 (Fig.2B), na temperatura de 32°C. Ambos os isolados apresentaram menor motilidade quando crescidas a 17°C.

Quando comparados entre si (Fig.2C), DFs416 apresentou maiores diâmetros de colônia a 22, 27 e 32°C.

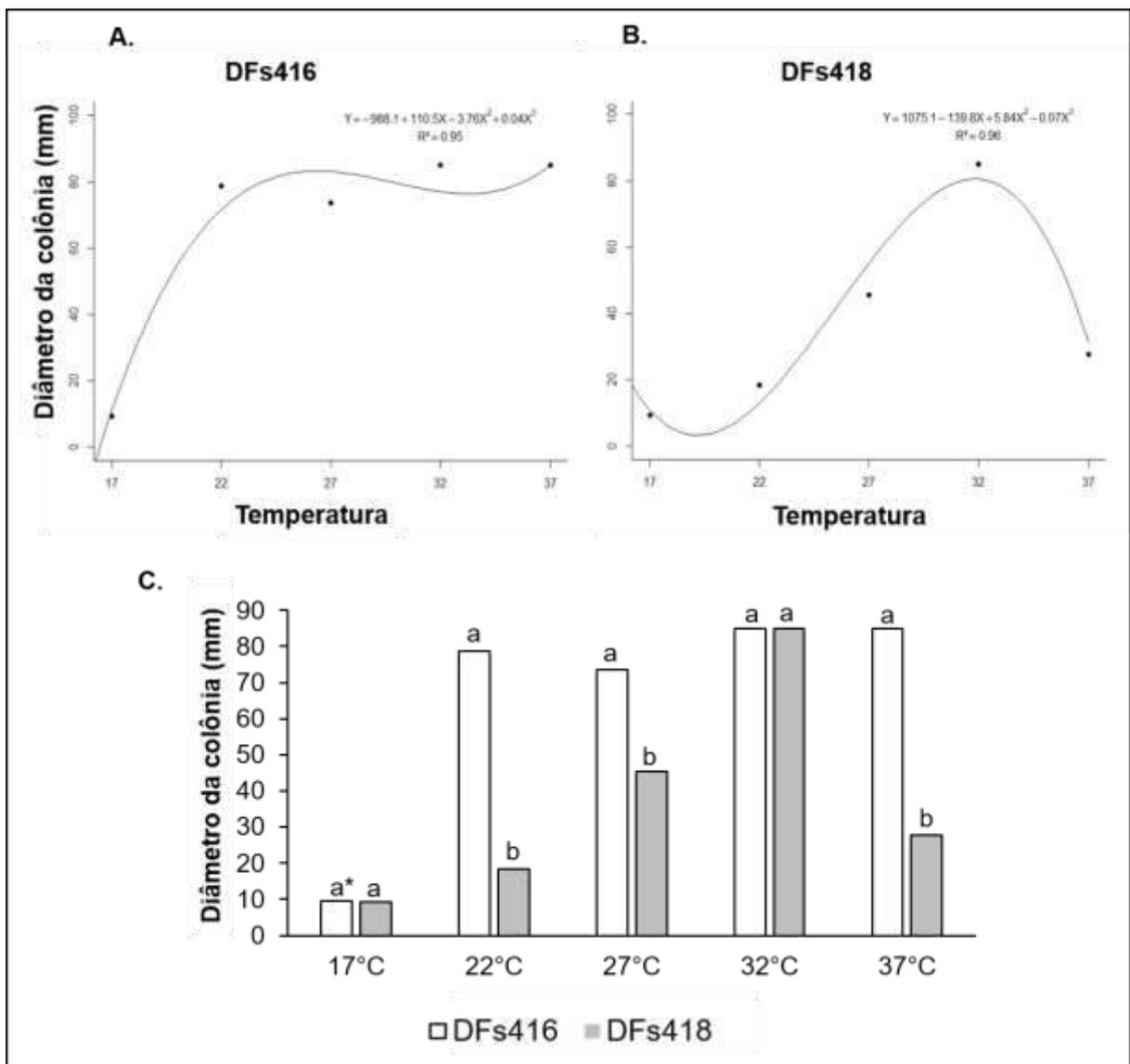


Figura 2- Motilidade do tipo swarming dos isolados biocontroladores após 48 horas de incubação em meio Luria-Bertani (0,6% de ágar) sob diferentes temperaturas (17, 22, 27, 32 e 37°C). (A) DFs416- *Bacillus* sp.; (B) DFs418- *Bacillus* sp; (C) comparação entre tratamentos em diferentes temperaturas. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

2.2.3 Enzimas hidrolíticas: proteinases e lipase

A avaliação da capacidade de hidrólise da proteína caseína (proteinase) ocorreu após 48 horas de incubação. Houve interação significativa entre isolados e temperaturas. Para DFs416 e DFs418, ajustou-se equações polinomiais de terceiro grau, correspondendo a $R^2=0,96$ e $R^2=0,98$ respectivamente. Ambas bactérias apresentaram comportamento semelhante em relação às diferentes temperaturas de incubação. Para DFs416 (Fig.3A) a temperatura de 22°C resultou em maior diâmetro relativo do halo, em contrapartida, as temperaturas mais elevadas (32 e 37°C), resultaram em diâmetros significativamente menores. DFs418 (Fig.3B) apresentou maior diâmetro relativo de halo nas temperaturas de 17 e 22°C, e o menor, nas temperaturas mais elevadas (32 e 37°C).

O isolado DFs416 apresentou maiores diâmetros relativos de halo quando comparada à DFs418 nas temperaturas de 22 e 27°C (Fig.3C). Nas demais temperaturas ambas não difeririam entre si.

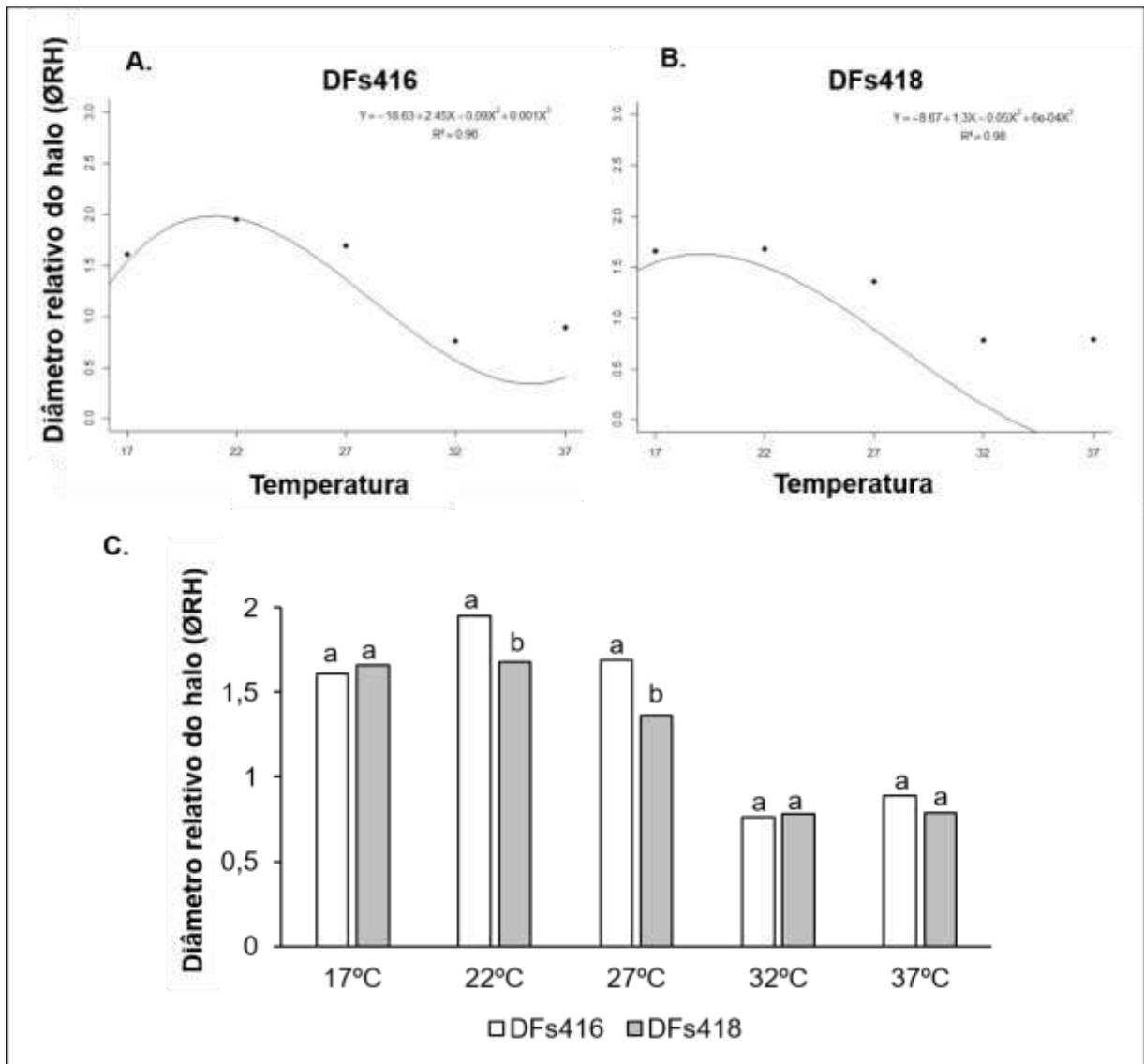


Figura 3- Produção de caseinase de isolados biocontroladores em diferentes temperaturas de incubação em meio de cultura Leite-Ágar. (A) DFs416- *Bacillus* sp.; (B) DFs418- *Bacillus* sp.; (C) comparação entre tratamentos nas diferentes temperaturas após 48 horas de incubação. Para cálculo do diâmetro relativo do halo (ØRH), foi utilizada a seguinte fórmula: $\text{ØRH} = (\text{ØH} - \text{ØC}) / \text{ØC}$, onde ØC = diâmetro das colônias, ØH = diâmetro dos halos formados, em dois sentidos diametralmente opostos. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Em relação à capacidade dos isolados hidrolisarem lecitina (lipídeo), avaliada após 48 horas de incubação, observou-se interação significativa entre isolados e temperaturas. Apenas o isolado DFs416 foi capaz de hidrolisar o lipídeo, sendo possível realizar o ajuste de uma regressão linear de primeiro grau, correspondendo a $R^2 = 0,84$. Observou-se ainda que DFs416 apresentou maiores diâmetros relativos de halo nas temperaturas mais elevadas (32 e 37°C) (Fig.4A), e que DFs418 (Fig.4B) não foi capaz de hidrolisar lecitina em nenhuma das temperaturas estudadas.

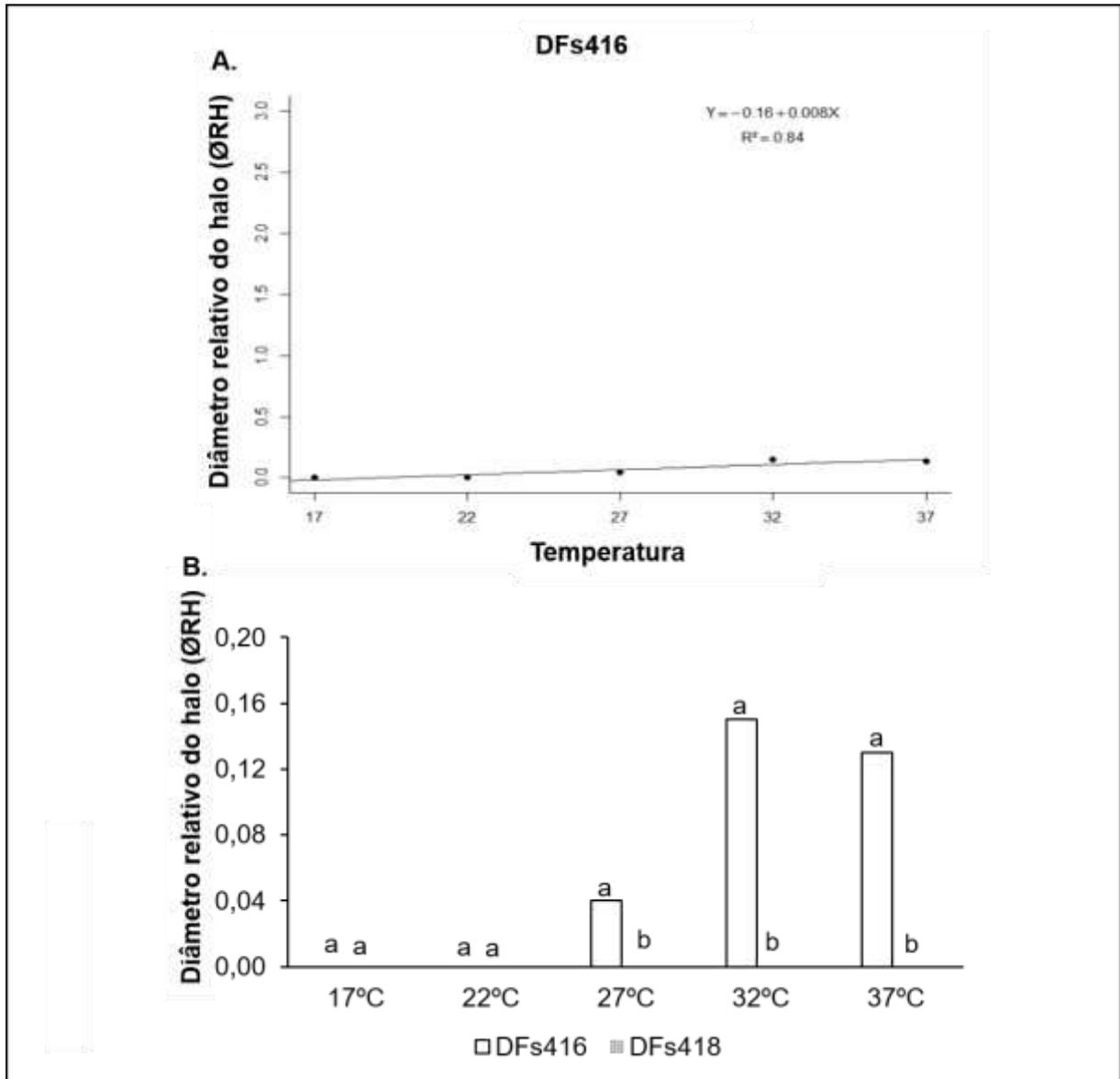


Figura 4- Produção de lecitinase de isolados biocontroladores em diferentes temperaturas de incubação em meio de lecitina (4%). (A) DFs416- *Bacillus* sp.; (B) comparação entre tratamentos em diferentes temperaturas após 48 horas de incubação. Para cálculo do diâmetro relativo do halo (ØRH), foi utilizada a seguinte fórmula: $\text{ØRH} = (\text{ØH} - \text{ØC}) / \text{ØC}$, onde ØC= diâmetro das colônias, ØH= diâmetro dos halos formados, em dois sentidos diametralmente opostos. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

2.2.4 Compostos antimicrobianos: voláteis e hidrossolúveis

A produção de compostos voláteis foi avaliada após cinco dias de incubação ea temperatura de 37°C não pôde ser estudada, pois não ocorreu crescimento do

patógeno nesta temperatura. Para as demais temperaturas observou-se interação significativa entre estas e os isolados bacterianos. Para ambos DFs416 e DFs418, ajustou-se equações do tipo polinomiais de segundo grau, correspondendo a $R^2=0,99$ e $R^2=0,70$ respectivamente.

B. oryzae apresentou menores crescimentos fúngicos na presença do isolado DFs416 (Fig.5A) nas temperaturas de 32°C e 17°C e 27°C, não havendo inibição de *B. oryzae* na temperatura de 22°C. Na temperatura de 32°C ocorreu o menor crescimento fúngico para o tratamento DFs418 (Fig.5B), seguido das temperaturas de 17 e 22°C. Na temperatura de 27°C, não houve inibição do crescimento fúngico para o isolado DFs418.

Quando comparados entre si, os isolados em relação à testemunha, o isolado DFs416 reduziu a intensidade do crescimento micelial de *B. oryzae* nas temperaturas de 27 e 32°C, diferindo significativamente da testemunha e de DFs418 (Fig.5C). DFs418 inibiu o crescimento fúngico na temperatura de 27°C, diferindo significativamente da testemunha e de DFs416. Por sua vez, o isolado DFs418 foi superior ao DFs416 quando a antibiose por compostos voláteis foi avaliada a 22°C.

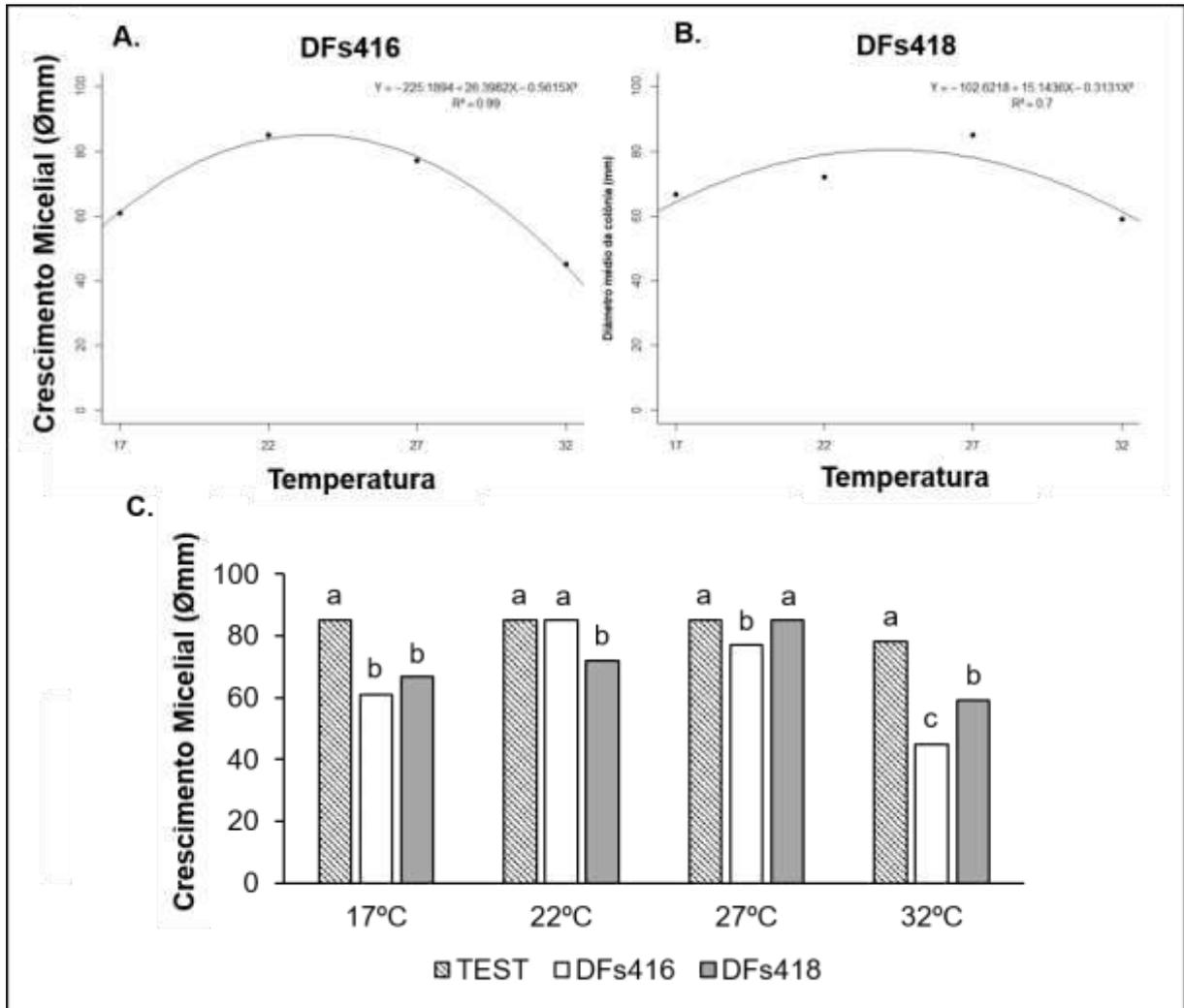


Figura 5- Crescimento micelial de *Bipolaris oryzae* pelos isolados biocontroladores por meio de compostos voláteis após 5 dias de incubação em placas de Petri contendo BDA ½ dextrose sob diferentes temperaturas. (A) DFs416- *Bacillus* sp.; (B) DFs418- *Bacillus* sp.; (C)- comparação entre tratamentos em diferentes temperaturas. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A avaliação de produção de compostos antimicrobianos hidrossolúveis se deu após seis dias de incubação. Houve interação significativa entre isolados e temperaturas. Para ambos os isolados DFs416 e DFs418, ajustou-se equações do tipo polinomiais de segundo grau, correspondendo a $R^2=1$ e $R^2=0,99$, respectivamente. O fungo *B. oryzae* apresentou menores raios médios de colônia (mm) nas temperaturas de 17 e 32°C para ambos os isolados (Fig.6A e 6B).

Quando os isolados e a testemunha foram comparados entre si nas diferentes temperaturas (Fig.6C), o isolado DFs418 foi mais eficiente que DFs416 a 22°C e 27°C. A 32°C ambos isolados foram efetivos em inibir o crescimento micelial, não

diferindo entre si. Na menor temperatura (17°C) não houve inibição do crescimento de *B. oryzae*.

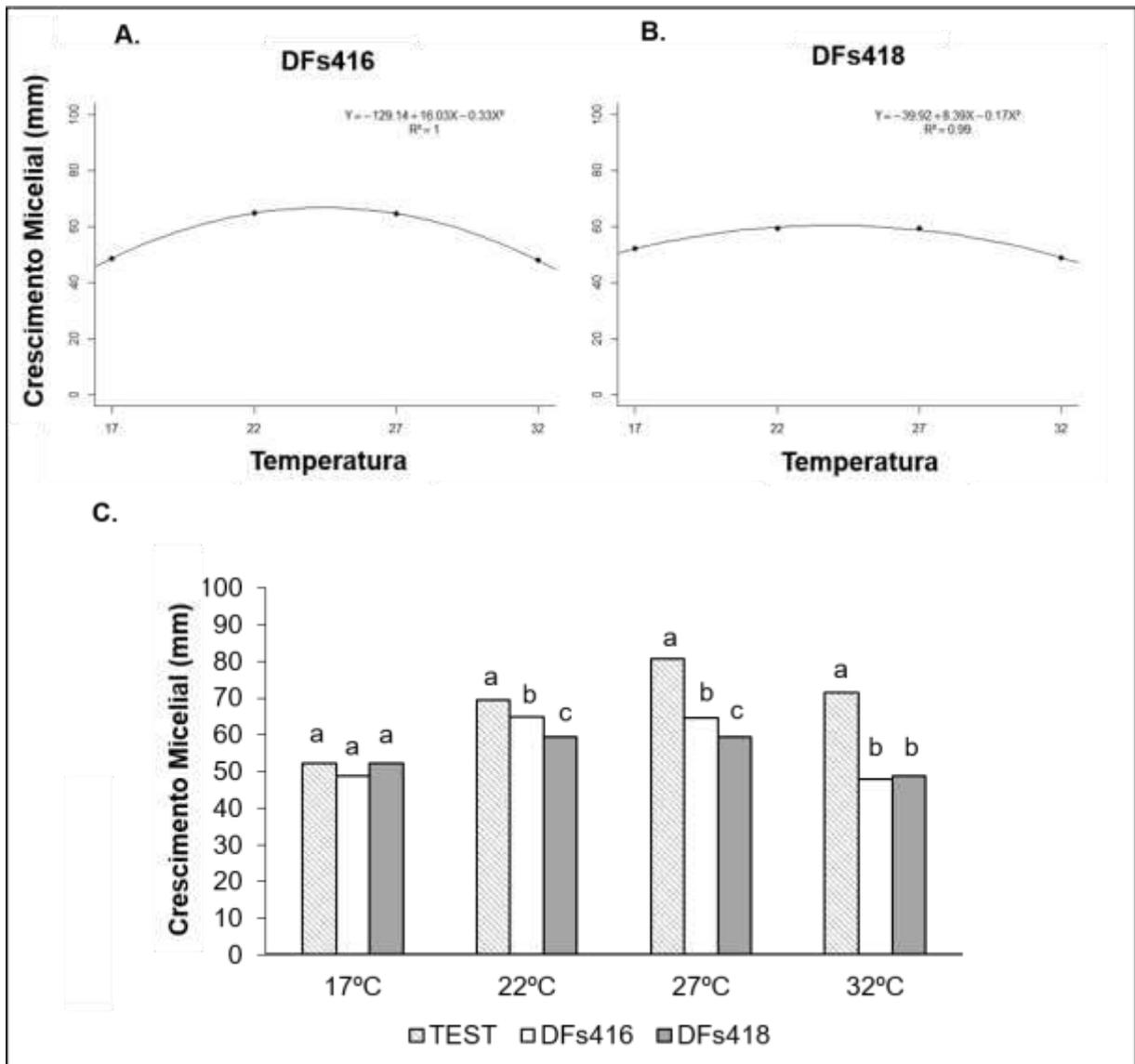


Figura 6- Crescimento micelial (mm) de *Bipolaris oryzae* em pareamento com isolados biocontroladores em meio BDA ½ dextrose após 6 dias de incubação sob diferentes temperaturas. (A) DFs416- *Bacillus* sp.; (B) DFs418- *Bacillus* sp; (C) comparação entre tratamentos em diferentes temperaturas. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

2.2.5 Biocontrole *in vivo* da mancha-parda

2.2.5.1 Folhas destacadas de arroz em estágio V9/R1

Na avaliação do efeito de pulverização preventiva em folhas destacadas de arroz no estágio V9/R1, houve interação entre os isolados bacterianos (DFs416 e DFs418) e os períodos de aplicação (48 e 24 horas), sendo realizado desdobramento para cada combinação de níveis de fatores. Os dois períodos preventivos diminuíram significativamente a incidência e severidade da doença para ambos os isolados em relação a testemunha. No entanto, o período de 48 horas foi significativamente superior para reduzir a severidade para os dois tratamentos bacterianos

Tabela 1- Biocontrole *in vivo* da mancha-parda (*Bipolaris oryzae*) representada pela medição do tamanho das lesões a partir do software ImageJ em folhas destacadas de arroz em estágio V9/R1 pulverizadas (preventivas) com isolados biocontroladores 24 e 48 horas antes da inoculação do patógeno. DFs416- *Bacillus* sp.; DFs418- *Bacillus* sp.

Incidência				
	24 horas		48 horas	
Test	77,08	a* A	75,00	a A
DFs416	29,17	b A	31,25	b A
DFs418	35,42	b A	33,33	b A
Média	47,22	A	46,53	A
Severidade				
	24 horas		48 horas	
Test	0,1552	a A	0,1673	a A
DFs416	0,0655	b A	0,0132	b B
DFs418	0,0655	b A	0,0298	b B
Média	0,0950	A	0,0700	A

*Médias seguidas pela mesma letra não diferiram significativamente entre si pelo teste de comparação múltipla de Dunn (alternativa não paramétrica para comparações múltiplas), maiúsculas na horizontal, minúsculas na linha. Foi considerado como significativo um valor-p menor ou igual a 0,05. Incidência final avaliada as 48 horas após a inoculação de *Bipolaris oryzae* pela porcentagem de folhas com sintomas. Severidade foi avaliada através da medição das lesões presentes nas folhas.

Quando a pulverização dos biocontroladores foi realizada de forma curativa no controle de *B. oryzae* (Tab.2), apenas o isolado DFs418, pulverizado 24 horas

após a inoculação foi capaz de diminuir a incidência do patógeno sobre as folhas de arroz. Por outro lado a severidade foi reduzida por ambos os isolados, sendo que o período curativo de 48 horas foi mais eficiente.

Tabela 2- Biocontrole *in vivo* da mancha-parda (*Bipolaris oryzae*) representada pela medição do tamanho das lesões a partir do software ImageJ em folhas destacadas de arroz em estágio V9 pulverizadas (curativas) com isolados biocontroladores 24 e 48 horas depois da inoculação do patógeno. DFs416- *Bacillus* sp.; DFs418- *Bacillus* sp.

	Incidência			
	24 horas		48 horas	
Test	81,25	a A	62,50	a A
DFs416	66,67	a A	62,50	a A
DFs418	43,75	b B	64,58	a A
Média	63,89	A	63,19	A
	Severidade			
	24 horas		48 horas	
Test	0,1642		0,1729	
DFs416	0,0964		0,1414	
DFs418	0,0964		0,1517	
Média	0,1190	A	0,1550	B

*Médias seguidas pela mesma letra não diferiram significativamente entre si pelo teste de comparação múltipla de Dunn (alternativa não paramétrica para comparações múltiplas), maiúsculas na horizontal, minúsculas na linha. Foi considerado como significativo um valor-p menor ou igual a 0,05. Incidência final avaliada as 48 horas após a inoculação de *Bipolaris oryzae* pela porcentagem de folhas com sintomas. Severidade foi avaliada através da medição das lesões presentes nas folhas.

2.2.5.2 Plantas de arroz em estágio V3 em diferentes temperaturas

Na avaliação da pulverização foliar dos isolados bacterianos DFs416 e DFs418 em relação aos períodos de pulverização, não houve interação significativa entre estes e os demais fatores analisados. Observa-se que o período de pulverização foliar preventiva de 48 horas antes da inoculação resultou em menores AACPS independentemente da temperatura e tratamento a que foram submetidos (Fig.7A).

Houve interação significativa para isolados e temperaturas, deste modo foi realizado desdobramento de cada um dos fatores analisados. Para o isolado DFs416, o menor controle se deu a 32°C e os maiores percentuais a 17 (DFs416 51% e DFs418 40%) e 27°C (DFs416 48% e DFs418 44%). DFs416 e DFs418 reduziram significativamente a severidade (AACPS) da mancha-parda em todas as temperaturas estudadas (Fig.7B). A única regressão que foi possível realizar o ajuste foi DFs416 (Fig.7C), apresentando regressão linear de primeiro grau e $R^2=0,49$.

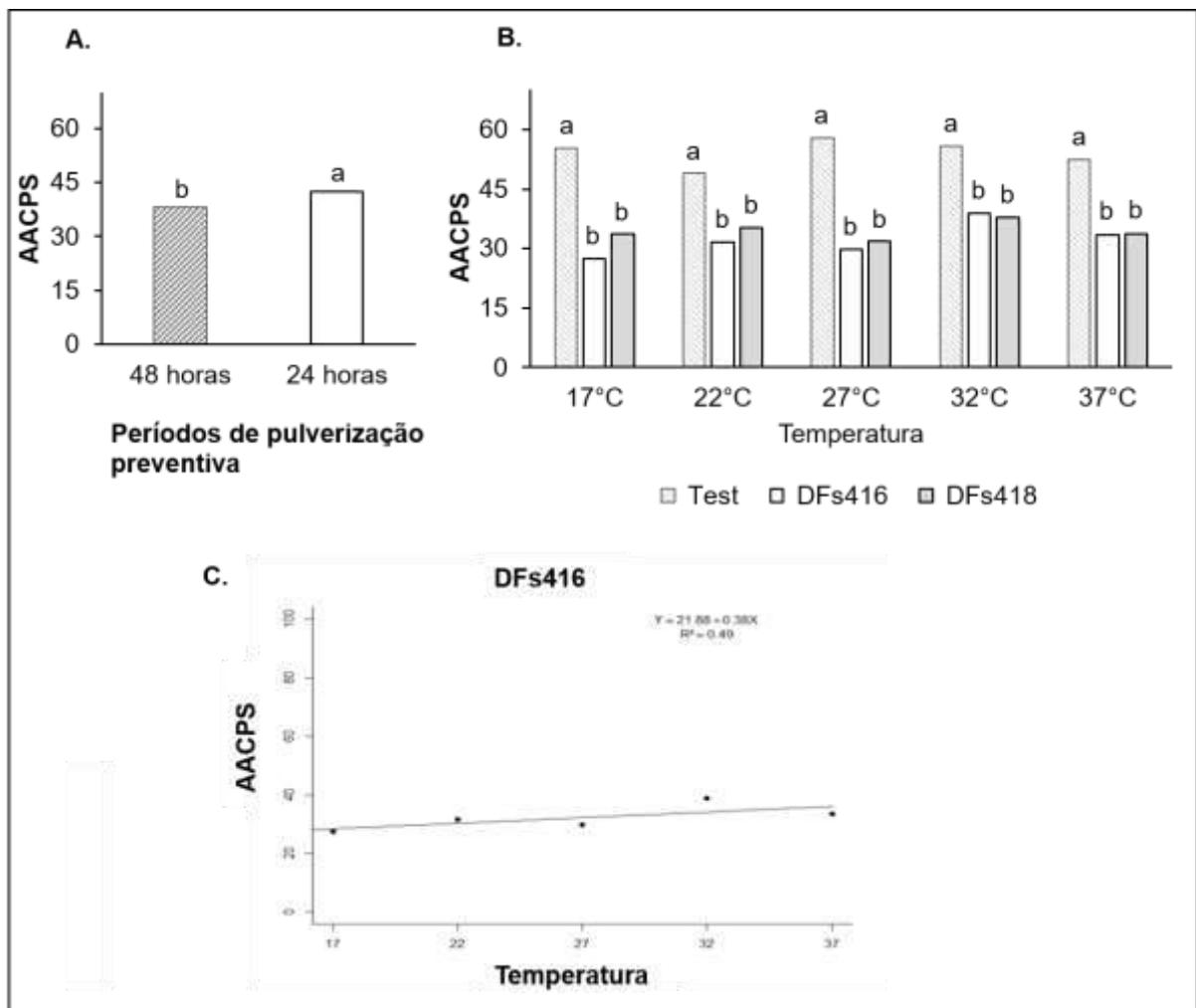


Figura 7- Severidade da mancha-parda representada pela área abaixo da curva de progresso da severidade (AACPS) em plantas de arroz em estágio V3-V4, pulverizadas com biocontroladores em diferentes períodos (48 e 24 horas antes da inoculação de *Bipolaris oryzae*) e submetidas a diferentes temperaturas (17, 22, 27, 32 e 37°C) por 48 horas. Avaliações realizadas 3, 6, 9, 12 e 15 dias após a inoculação do patógeno e posteriormente mantidas a 25°C. (A) comparação entre períodos de aplicação; (B) comparação entre tratamentos nas diferentes temperaturas; (C) efeito da temperatura no isolado DFs416- *Bacillus* sp.; DFs418- *Bacillus* sp. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

2.3 Discussão

A maioria dos microrganismos que vivem no solo são mesófilos, resistentes às flutuações de temperatura e adaptados à faixas que variam entre 20 à 45°C (PEPPER; GENTRY, 2014). As bactérias do gênero *Bacillus* são capazes de sobreviver em temperaturas elevadas, e possuem crescimento ótimo em temperaturas que variam de 25 à 35°C (SHAFI; TIAN; JI, 2017). Os resultados observados no presente estudo confirmam a capacidade deste gênero em crescer sob diferentes condições de temperatura, o que pode afetar a produção de diferentes compostos relacionados ao biocontrole de doenças e interferir na efetividade do controle biológico. DFs416 e DFs418 apresentaram menores absorvâncias na temperatura de 17°C, e atraso nas diferentes fases de crescimento em comparação as demais temperaturas, com duração da fase lag de aproximadamente 15 horas, atingindo a fase estacionária após 36 horas de incubação.

Da mesma maneira, Hwang e Huang (2019) estudaram a dinâmica do crescimento de *B. cereus* e observaram a influência de diferentes temperaturas no crescimento deste isolado, determinando suas temperaturas mínimas, ótimas e máximas de 8,2, 37,6 e 46,8°C respectivamente, corroborando com os resultados encontrados no presente estudo, onde a temperatura de 37°C resultou em maiores absorvâncias para os dois isolados, menor fase lag (cerca de três horas), menor tempo de geração (fase log com maior inclinação), atingindo a fase estacionária a partir das 15 horas de incubação.

Os mecanismos de adaptação dos microrganismos às diferentes temperaturas incluem o desenvolvimento de características estruturais específicas, manutenção do equilíbrio entre a estabilidade molecular e flexibilidade estrutural (SIDDIQUIE; CAVICCHIOLI, 2006). Outro mecanismo de adaptação às temperaturas é a produção de proteínas termoestáveis, como as chaperonas, especializadas em auxiliar a redobrar e restaurar outras proteínas após a desnaturação térmica. Adaptações específicas como aumento do número de pontes de dissulfeto, aumento da interação dos peptídeos aromáticos e aumento das ligações de hidrogênio entre

peptídeos também explicam a adaptação de microrganismos no ambiente, especialmente à condições extremas de temperatura (PEPPER; GENTRY, 2014).

A transferência de elétrons extracelular também foi relatada como uma forma de adaptação das bactérias do gênero *Bacillus* ao ambiente, através da comunicação de elétrons entre *B. subtilis* bactéria não acidofílica e não termofílica, e o ambiente, sendo capaz de manter a sua viabilidade em temperaturas de 100°C por até oito horas, e em ambientes ácidos (pH = 1,50) por mais de 2 anos, envolvendo o cofator nicotinamida adenina dinucleotideo (NAD) como essencial na viabilidade das células, responsável por neutralizar os efeitos adversos em ambientes agressivos (CHEN et al., 2019).

De forma geral, as maiores absorbâncias observadas proporcionaram os maiores diâmetros de colônia (mm) para motilidade do tipo swarming para ambos os isolados bacterianos, apresentando comportamento decrescente na medida em que as temperaturas diminuíram. O isolado DFs418 apresentou maior sensibilidade às diferentes condições de temperatura, apresentando maior motilidade quando incubada à 32°C, o que pode ser atribuído à capacidade específica do isolado em se adaptar a esta temperatura, corroborando com outros estudos, onde *Bacillus amyloliquefaciens* apresentou maior motilidade na maior temperatura avaliada (35°C), com redução significativa da sua capacidade de locomoção à medida que as temperaturas diminuíram (PAPUOLO et al., 2013).

A capacidade de locomoção dos microrganismos através da motilidade tipo swarming é uma característica importante do ponto de vista do controle biológico, possibilitando a sobrevivência e colonização em diversos ambientes, além de conferir vantagens competitivas (McCARTER; MORABE, 2019). Gao e colaboradores (2016) relacionaram a colonização de raízes de tomate por *B. subtilis* com a sua motilidade, demonstrando inclusive maior eficiência na colonização e sobrevivência destes microrganismos do que o fenômeno da quimiotaxia, sugerindo que mais de 99% da colonização das raízes requer a presença de flagelos. Além disso, bactérias do gênero *Bacillus* podem manter sua motilidade mesmo após eventos de congelamento e descongelamento, demonstrando potencial deste gênero em suportar condições adversas de temperaturas (ASADISAD et al., 2014).

Bactérias biocontroladoras do gênero *Bacillus* também podem atuar produzindo compostos antimicrobianos como enzimas, capazes de hidrolisar os constituintes da parede celular dos fungos fitopatogênicos, oomicetos e até mesmo nematóides (ALI et al., 2019). Neste sentido, Jangir e colaboradores (2018) estudando os mecanismos de biocontrole de *Bacillus* sp. isolados da rizosfera de tomate para controle de *Fusarium oxysporum*, relacionaram a capacidade de controle do patógeno com a produção de diferentes enzimas líticas, como protease, quitinase e β -1,3-glucanase pelos isolados estudados, ressaltando o papel essencial da lise da parede celular fúngica na digestão das hifas, que uma vez hidrolisadas são utilizadas como fonte de carbono pelas bactérias. Além disso, a degradação de constituintes da parede celular pela ação de enzimas pode facilitar a entrada de antibióticos e metabólitos antifúngicos nos tecidos do patógeno. Yu et al., (2017) selecionaram agentes de biocontrole e associaram maior eficácia de enzimas líticas como protease, quitinase, celulase e glucanase por isolados de *B. altitudinis*, *B. cereus*, *B. pumilus* e *B. subtilis* com a concomitante atividade antagônica observada por pareamento direto e no biocontrole de *Rhizoctonia solani* em arroz.

Ambos os isolados estudados produziram caseinases em todas as temperaturas estudadas, entretanto, diferente dos resultados de crescimento e motilidade, ambos produziram maiores diâmetros relativos de halo em menores temperaturas. Comportamento diferente foi observado para a produção de lecitinases, onde o isolado DFs416 respondeu positivamente as maiores temperaturas. Embora existam diversos relatos de bactérias do gênero *Bacillus* produzindo uma gama de enzimas hidrolíticas, poucas são as informações a respeito da interferência da temperatura na produção destas enzimas, o que limita o entendimento de como estes microrganismos atuam sob estresses ambientais. No entanto, estudos indicam que a produção de enzimas por *Trichoderma* sp. por exemplo, sofrem alterações em função da temperatura e do pH dos ambientes que crescem (SARAVANAKUMAR et al., 2016), em concordância com o observado no presente estudo.

Outra forma dos microrganismos atuarem frente aos fitopatógenos é pela produção de compostos antimicrobianos voláteis, difundidos principalmente nos poros do solo, e que podem facilmente alcançar longas distâncias (TYC et al., 2017). Diversos estudos relatam o efeito antagonista de bactérias do gênero *Bacillus* contra

uma gama de fitopatógenos, incluindo fungos (GAO et al., 2017) e oomicetos a partir da produção de compostos voláteis como pirazinas, cetonas e sulfóxidos (MENDÉZ-BRAVO et al., 2018). Guevara-Avenida e colaboradores (2019) investigaram a atividade antifúngica a partir de compostos voláteis produzidos por bactérias do gênero *Bacillus* para o controle de *Fusarium solani*, *Colletotrichum gloeosporioides* e *Phytophthora cinnamomi*, identificando a presença de cetonas, pirazinas e compostos contendo enxofre responsáveis por inibições superiores à 20% do crescimento micelial dos fungos estudados. Os mesmos autores também observaram alterações morfológicas induzidas nas hifas fúngicas e relacionaram à produção de diferentes compostos voláteis emitidos pelos isolados bacterianos. No presente estudo, pode-se observar influência das diferentes temperaturas na inibição do crescimento micelial de *B. oryzae*. Para os isolados DFs416 e DFs418, as temperaturas de 32°C e 17°C respectivamente, resultaram em maior inibição do crescimento micelial.

Além da atividade antagônica contra diversos fitopatógenos, bactérias do gênero *Bacillus* foram relatadas produzindo compostos voláteis capazes de atuar como moduladores de crescimento de plantas, acetoina e 2,3-butanodiol foram identificados sendo produzidos por *B. mojavensis* responsáveis pela promoção significativa do crescimento de plântulas de *Arabidopsis thaliana* (RATH; MITCHELL; OURO; 2018).

A produção de compostos antimicrobianos hidrossolúveis também vem sendo investigada como mecanismo de ação de bactérias do gênero *Bacillus*, dentre bacteriocinas, iturinas, surfactinas, bacilomicina e fengicinas (SUN et al., 2006; SHARMA, SINGH, VERMA, 2018; YANG et al., 2018). Estes compostos afetam as células-alvo ao nível de membrana, causando deformações nas hifas fúngicas, resultando em vacuolização, vazamento de protoplasto e fenda micelial, provocando a morte das células (FIRA et al., 2018).

O controle de *R. solani*, *F. oxysporum*, *Pythium irregulare*, *Botrytis cinerea* foi atribuído ao lipopeptídeo Iturina A, produzido por espécies do gênero *Bacillus* (ZHAO et al., 2014), enquanto pumilacidina, produzido por *B. pumilus* foi relacionado ao controle de *R. solani*, *P. aphanidermatum* e *Sclerotium rolfsii* (MELO et al., 2009). *B. licheniformis* e *B. amyloliquefaciens* produzem surfactina e fengicina, capazes de atuar no controle de *Penicillium italicum*, *F. culmorum*, *B. cinerea*, *Magnaporthe*

grisea e *Erysiphe graminis* (SUN et al., 2006; TENDULKAR et al., 2007; MNIF; GHRIBI, 2015), demonstrando potencial do gênero *Bacillus* em produzir uma gama de compostos antimicrobianos, que atuam em diferentes espécies de patógenos. O efeito antagônico dos isolados bacterianos DFs416 e DFs418 *in vitro* frente a *B. oryzae* foi observado nas temperaturas de 22, 27 e 32°C, com diminuição significativa do crescimento micelial do fungo em até 33%, podendo ser atribuído à produção de diferentes compostos antimicrobianos hidrossolúveis.

Folhas destacadas para avaliação do controle biológico de doenças da cultura do arroz já vem sendo utilizadas por diversos autores (KUMAR et al., 2011). Shabanamol e colaboradores (2018) avaliaram o efeito de bactérias diazotróficas no controle de *R. solani* em arroz, observando diminuição significativa do tamanho das lesões em folhas destacadas, demonstrando a eficiência do método nesse tipo de abordagem. Nos ensaios *in vivo* a partir da pulverização das biocontroladoras em folhas destacadas de arroz, os isolados DFs416 e DFs418 foram eficientes no controle da mancha-parda, diminuindo significativamente as lesões causadas por *B. oryzae*, especialmente nos tratamentos preventivos. Bactérias do gênero *Bacillus* foram relatadas intensificando a expressão de genes, induzindo mecanismos de resistência envolvidos nas vias do ácido salicílico, ácido jasmônico e etileno, sugerindo reações de defesa após interação com *B. amyloliquefaciens* FZB42. Além disso, foram observados aumentos de fitoalexinas entre 24 e 48 horas após interação da planta com o biocontrolador (XIE et al., 2017). Neste sentido é possível explicar a efetividade dos tratamentos preventivos no presente estudo pela indução de resistência.

Resultados similares aos encontrados para folhas destacadas para controle de *B. oryzae* foram observados nos ensaios *in planta* de pulverização preventiva de DFs416 e DFs418, 48 e 24 horas antes da inoculação do patógeno, sob influência das diferentes temperaturas. Ambos os isolados apresentaram resultados semelhantes reduzindo significativamente a AACPS em todas as temperaturas estudadas. O período preventivo de 48 horas foi mais efetivo, o que poderia ser atribuído a capacidade das bactérias do gênero *Bacillus* em induzir resistência sistêmica (ISR), como observado por Chandler e colaboradores (2015), que relacionaram o potencial de *B. subtilis* BBG111 em desencadear ISR em arroz contra *R. solani*, a partir do reconhecimento da interação microrganismo/planta e

indução de sinalizadores, aumentando conseqüentemente as respostas de defesa da planta.

Chithrashree e colaboradores (2011) atribuíram o aumento das enzimas fenilalanina amônia liase, peroxidase e polifenol oxidase em mudas de arroz tratadas com *B. subtilis* e *B. pumilus* com a supressão direta e indireta do desenvolvimento de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, proporcionando ainda maior germinação e vigor das plantas quando realizado o tratamento de sementes com as bactérias biocontroladoras, atestando o potencial deste gênero na indução de resistência contra doenças de origem bacteriana, assim como na promoção de crescimento vegetal.

Já existem formulações a base de *Bacillus*, demonstrando a efetividade destes microrganismos no controle de doenças do arroz a partir da pulverização foliar. Meng e colaboradores (2015), buscando avaliar formulações em pó da estirpe T429 de *B. subtilis* aplicadas por pulverização foliar para controle de *Magnaporthe grisea*, demonstraram a efetividade e viabilidade das formulações atingindo controles de até 78%, similares ao controle químico usualmente utilizado. Observaram também a biocompatibilidade com moléculas químicas, agentes dispersantes e adesivos misturados às formulações, além de revelar longa vida útil (mais de 12 meses sem perder a viabilidade). Liu et al., (2018) também observaram efeitos sinérgicos da aplicação combinada de *B. subtilis* H158 e estrobilurinas no controle da queima das bainhas do arroz e sobrevivência de H158 nas folhas de arroz após 10 dias de aplicação em campo.

Os dados obtidos apontam estabilidade dos isolados biocontroladores nas diferentes temperaturas, característica desejável no controle biológico de doenças. Entretanto, apesar de diversos autores comprovarem a efetividade do controle biológico de doenças a partir da pulverização e ou microbiolização de bactérias do gênero *Bacillus*, estudos referentes ao efeito da temperatura no controle de doenças por estes microrganismos são restritos. No presente estudo foi possível observar que as bactérias do gênero *Bacillus* atuam por diferentes mecanismos de ação do controle biológico (parasitismo, antibiose, competição e indução de resistência) e que sua efetividade se dá principalmente pela capacidade de produzir uma diversidade de compostos que respondem de forma distinta às flutuações de temperatura, sem no entanto, reduzir sua capacidade de controle *in planta* o que

permite pensar que serão eficientes em condições de campo (onde há flutuações diárias da temperatura), ou mesmo sob condições de estresse de temperatura.

3. Título II: Influência da temperatura na produção de compostos antimicrobianos e no controle da mancha-parda do arroz por bactérias biocontroladoras do gênero *Pseudomonas*.

O arroz (*Oryza sativa* L.) é amplamente cultivado no mundo e no Brasil, principalmente na região sul. Segundo a FAO, em 2016 foram produzidas mais de 10 milhões de toneladas do grão no Brasil, e o consumo foi de 45 Kg por habitante. Apesar do grande volume produzido, existem fatores limitantes para sua produtividade, de origem abiótica, principalmente temperatura e precipitação, e fatores bióticos como a incidência de doenças (MACLEAN et al., 2013).

Dentre as inúmeras doenças que incidem sobre a cultura, destacam-se aquelas da parte aérea, como brusone, escaudadura, queima-das-bainhas e a mancha-parda, capazes de reduzir a produtividade da cultura em até 50% (BEDENDO; PRABHU, 2016). A mancha-parda, causada por *Bipolaris oryzae*, é uma das doenças mais importantes da cultura do arroz, distribuída nas regiões orízicolas do Brasil e do mundo, principalmente em zonas de clima tropical (FARR; ROSSMAN, 2018). Os sintomas podem ser encontrados em toda planta, especialmente em folhas e grãos, em forma de manchas marrons, em tonalidades escuras avermelhadas, arredondadas ou ovaladas, com centro de coloração cinza (BEDENDO; PRABHU, 2016). Além disso, os estádios iniciais e finais de desenvolvimento da planta são os mais suscetíveis para ocorrência da mancha-parda (PADMANABHAN; GANGULY; 1954).

Diante da importância da cultura do arroz, buscam-se métodos de controle de doenças capazes de proporcionar maior produção e qualidade dos grãos. No Brasil, existem 72 produtos registrados para o controle da mancha-parda, 28 destes extremamente tóxicos, 8 altamente tóxicos e 36 mediamente tóxicos, principalmente dos grupos químicos dos triazóis, estrobilurinas e ditiocarbamatos. Da totalidade, 51 são classificados como muito perigosos ao meio ambiente (classificação ambiental II) (AGROFIT, 2019).

Em razão da preocupação crescente com os problemas ambientais causados pelas atividades agrícolas e principalmente pelo uso indiscriminado de agrotóxicos no controle de doenças (GUPTA, 2016), buscam-se alternativas de controle que causem menor impacto ambiental e proporcionem maior equilíbrio aos ecossistemas (CHEEKE, COLEMAN, WALL, 2013; MOORE, DE RUITER, 2013).

Assim, o controle biológico de doenças na cultura do arroz surge como alternativa, utilizando microrganismos benéficos (BERENDSEN et al., 2012), capazes de alcançar controles próximos ou superiores aos proporcionados pelo controle químico (VIDHYASEKARAN et al., 1997; COMMARE et al., 2002; JOSHI et al., 2007; LUDWIG et al., 2009; VIDHYASEKARAN, MUTHAMILAN, 2010; SOUZA JÚNIOR et al., 2010; LUDWIG, MOURA, GOMES, 2013; MOURA et al., 2014; SOUZA JÚNIOR et al., 2017).

Dentre os microrganismos relatados no controle de doenças da cultura do arroz, destacam-se as bactérias do gênero *Pseudomonas*. Estes microrganismos são aeróbios, Gram-negativos, em forma de bastonetes, possuem múltiplos flagelos, adaptados para colonizar a rizosfera das plantas cultivadas em diferentes condições edafoclimáticas, podendo ser encontrados em diversos ambientes (PRASAD; KUMAR; VARMA, 2015; DAVID, CHANDRASEHAR, SELVAN, 2018). Possuem rápido crescimento *in vitro*, podendo ser facilmente produzidos em massa.

Espécies desse gênero são conhecidas pela capacidade de produzir uma ampla diversidade de metabólitos como antibióticos como 2,4-diacetilflorogucinol, pirrolnitrina, pirocianina; compostos voláteis, além de substâncias promotoras de crescimento como ácido indol-acético, citocininas, giberlinas e inibidores da produção de etileno (PRASAD et al., 2015; DAVID; CHANDRASEHAR, SELVAN, 2018), o que as capacita como potenciais biocontroladoras de doenças de plantas e promotoras de crescimento vegetal.

Bactérias do gênero *Pseudomonas* também podem atuar pelo parasitismo por produzirem diversas enzimas hidrolíticas capazes de degradar a parede celular dos fitopatógenos, composta principalmente por quitina e glucano (POTGIETER, ALEXANDER, 1996). Também atuam por indução de resistência sistêmica contra uma ampla gama de patógenos fúngicos, bacterianos e virais, além de insetos e

nematoides (NAGARAJKUMAR; BHASKARAN; VELAZHAHAN, 2004; NAGARAJKUMAR et al., 2005; DAVID, CHANDRASEHAR, SELVAN, 2018).

Seus mecanismos de ação contra fitopatógenos também incluem a competição por nutrientes e espaço no ambiente, tornando nutrientes que são essenciais para o crescimento e desenvolvimento dos patógenos restritos, como o ferro, pela produção de sideróforos (PIERSON, THOMASHOW, 1992; DAVID; CHANDRASEHAR, SELVAN, 2018).

Adicionalmente, bactérias do gênero *Pseudomonas* podem conferir tolerância a estresses provocados por aleloquímicos produzidos por outras plantas (REGO et al., 2018), tolerar o estresse hídrico, a partir do estímulo da expressão gênica, principalmente no estágio reprodutivo da planta (SAAKRE et al., 2017), auxiliar na absorção de nutrientes como fósforo, potássio e nitrogênio (SINGH; SINGH; SHUKLA, 2005; LAVAKUSH et al., 2014; ETESAMI, ALIKHNI, 2016).

Pseudomonas sp. tem faixa ideal de crescimento em temperaturas que variam de 25 à 30°C. Em temperaturas abaixo e acima da faixa ideal, são relatadas algumas alterações em relação à produção de enzimas, e assim o seu crescimento e desempenho quanto a produção de compostos relacionados ao controle biológico podem ser prejudicados (DAVID, CHANDRASEHAR, SELVAN, 2018).

Formulações de produtos à base de bactérias do gênero *Pseudomonas* já vem sendo estudadas e testadas na cultura do arroz para controle de doenças fúngicas, como *Rhizoctonia solani* (COMMARE et al., 2002; VIDHYASEKARAN, MUTHAMILAN, 2010) e *Pyricularia oryzae* em aplicações foliares e tratamento de sementes, demonstrando efetividade no controle e incremento da produção (VIDHYASEKARAN et al., 1997). Porém, estudos utilizando pulverização foliar para controle de *B. oryzae* não são relatados na literatura, assim como o efeito da temperatura no controle de doenças do arroz.

Os isolados de *Pseudomonas* DFs185 e DFs223 são conhecidos por controlar *B. oryzae* quando aplicados via microbiolização de sementes. No entanto, não se conhece seu efeito quando pulverizados nas folhas e nem seu comportamento em temperaturas fora da faixa ideal. Diante do exposto, o objetivo do estudo foi avaliar a capacidade de bactérias pré-selecionadas como biocontroladoras de doenças de plantas do gênero *Pseudomonas*, DFs185 e DFs223, por meio de estudos *in vitro*

quanto ao seu crescimento e produção de compostos relacionados ao biocontrole, bem como o biocontrole da mancha-parda em arroz sob condições de estresses ambientais.

3.1 Material e Métodos

Todos os ensaios executados no Título II foram realizados conforme os descritos no item 2.1 do Título I: Influência da temperatura na produção de compostos antimicrobianos e no controle da mancha-parda do arroz por bactérias biocontroladoras *Bacillus* sp., e as bactérias biocontroladoras estudadas foram DFs185- *Pseudomonas synxantha* e DFs223- *Pseudomonas fluorescens*.

3.2 Resultados

3.2.1 Curva de crescimento quantitativo

Na avaliação do crescimento dos isolados de *Pseudomonas* DFs185 e DFs223, em meio líquido, sob agitação contínua, observa-se que ambos os isolados bacterianos apresentaram curvas de crescimento muito similares nas diferentes temperaturas (exceto a 37°C). Os maiores valores de absorbância ocorreram nas temperaturas de 22 e 27°C; e os menores, nas temperaturas de 37°C e 32°C, demonstrando melhor crescimento em temperaturas intermediárias.

Em relação às diferentes fases de crescimento, a fase lag para ambos os isolados, foi prolongada nas temperaturas onde o crescimento foi menor (17, 32 e 37°C). A fase estacionária foi iniciada em menor tempo de incubação nas temperaturas de 22 e 27 °C, onde se observaram as maiores absorbâncias. Observou-se um atraso do início da fase estacionária nas temperaturas de menor crescimento, culminando com DFs223 a 37 °C, onde mesmo após 54 horas ainda ocorria crescimento exponencial. (Fig.8).

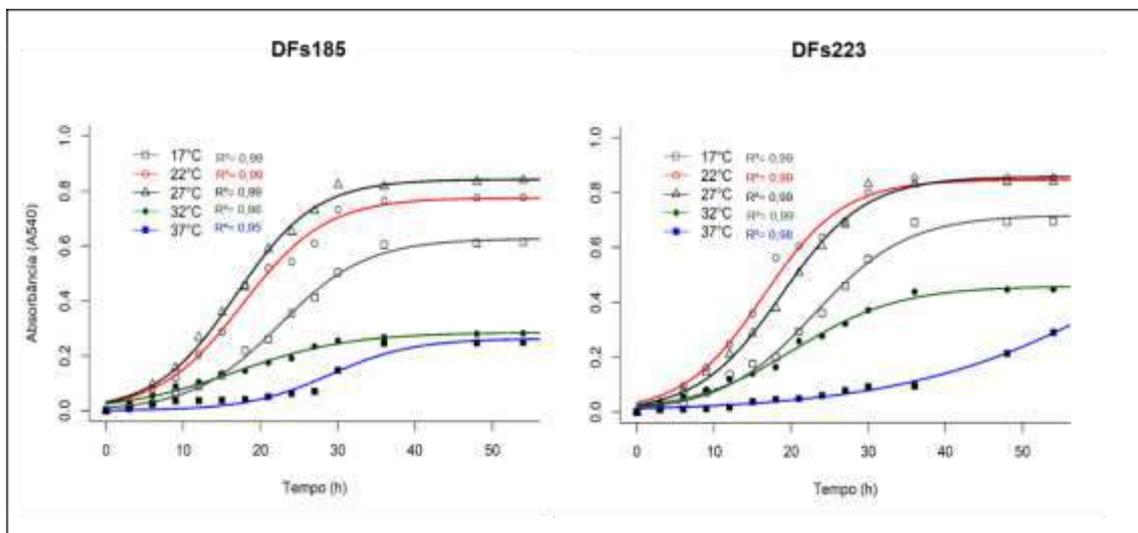


Figura 8- Curva de crescimento dos isolados biocontroladores medido por meio da absorbância (540nm) após 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 37, 30, 33, 36, 48 e 52 horas de incubação em meio Caldo Nutriente sob agitação contínua (100 rpm) em diferentes temperaturas (17, 22, 27, 32 e 37°C). DFs185- *Pseudomonas synxantha*; DFs223- *Pseudomonas fluorescens*.

3.2.2 Motilidade

A motilidade do tipo swarming, em meio Luria-Bertani (0,6% de ágar) avaliada após 48 horas de incubação para o isolado DFs185 foi reduzida e não se observou efeito das diferentes temperaturas (Fig.9A). Em contrapartida, para DFs223, houve interação significativa entre isolado e temperaturas, o ajuste da regressão polinomial foi de terceiro grau e $R^2=0,81$. A maior motilidade observada para DFs223 foi a 22°C (Fig.9B) e menor nas temperaturas de 27, 32 e 37°C.

A motilidade do isolado DFs223 quando comparados com o isolado DFs185 foi significativamente maior nas temperaturas de 17 e 22°C, nas demais temperaturas não houve diferença significativa (Fig.9C).

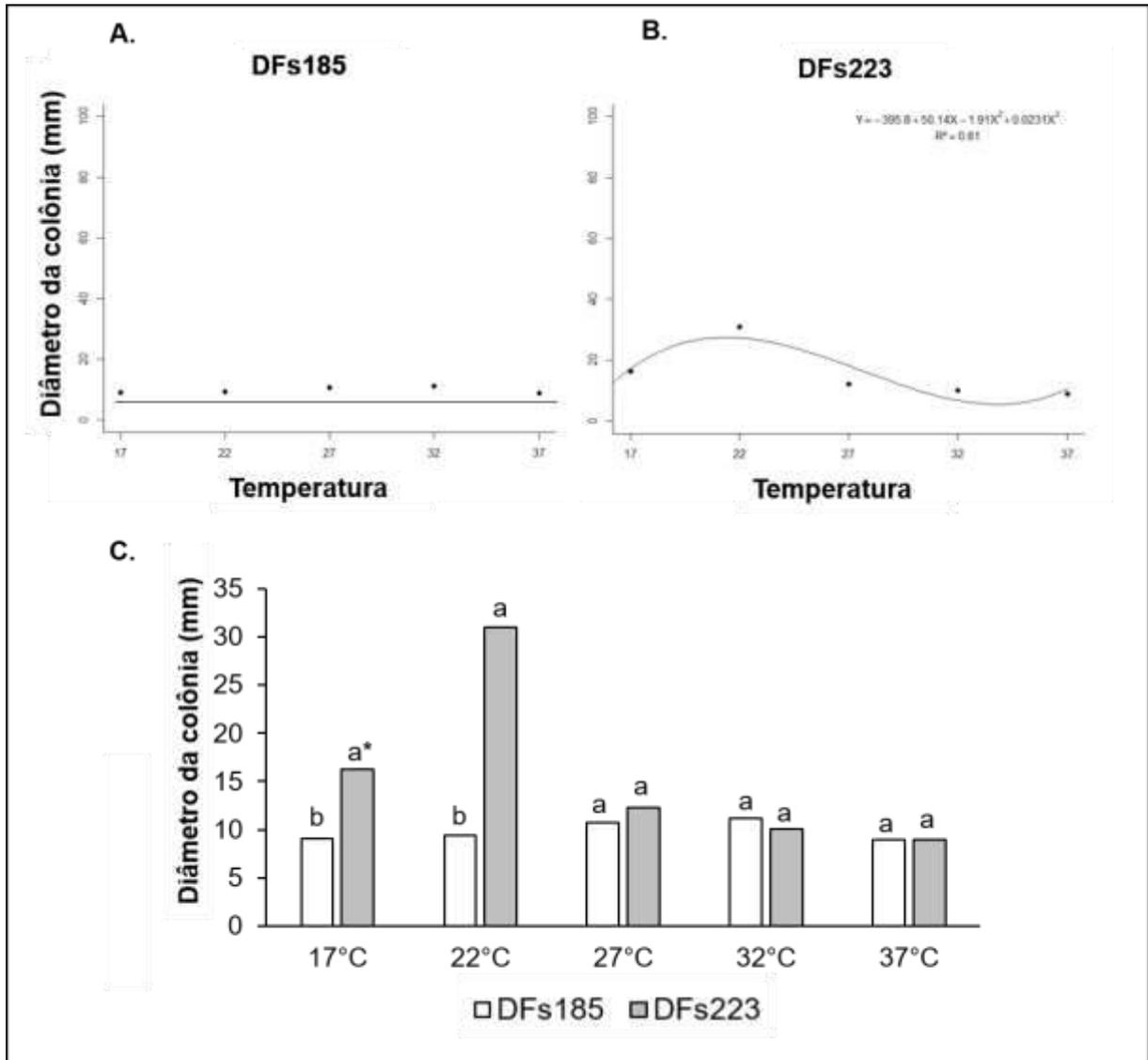


Figura 9- - Motilidade do tipo swarming dos isolados biocontroladores após 48 horas de incubação em meio Luria-Bertani (0,6% de ágar) sob diferentes temperaturas (17, 22, 27, 32 e 37°C). (A) DFs185- *Pseudomonas synxantha*; (B) DFs223- *Pseudomonas fluorescens*; (C) comparação entre tratamentos em diferentes temperaturas. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

3.2.3 Enzimas hidrolíticas: proteinases e lipases

A avaliação da capacidade de hidrólise de proteinases (caseína) ocorreu após 48 horas de incubação, ocorrendo interação significativa entre isolados e temperaturas. Para ambos isolados, ajustaram-se equações do tipo polinomiais de segundo grau, correspondendo a $R^2=0,91$ e $R^2=0,97$ respectivamente. Os isolados bacterianos (Fig.10A e Fig.10B) apresentaram, de forma geral, comportamento

semelhante, com menor diâmetro relativo do halo nas temperaturas mais elevadas. Nas temperaturas de 32 e 37°C, DFs223 não foi capaz de hidrolisar caseína.

Comparando os isolados em cada temperatura, verifica-se que o isolado DFs185 apresentou maiores diâmetros relativos de halo em todas as temperaturas estudadas (Fig.10C).

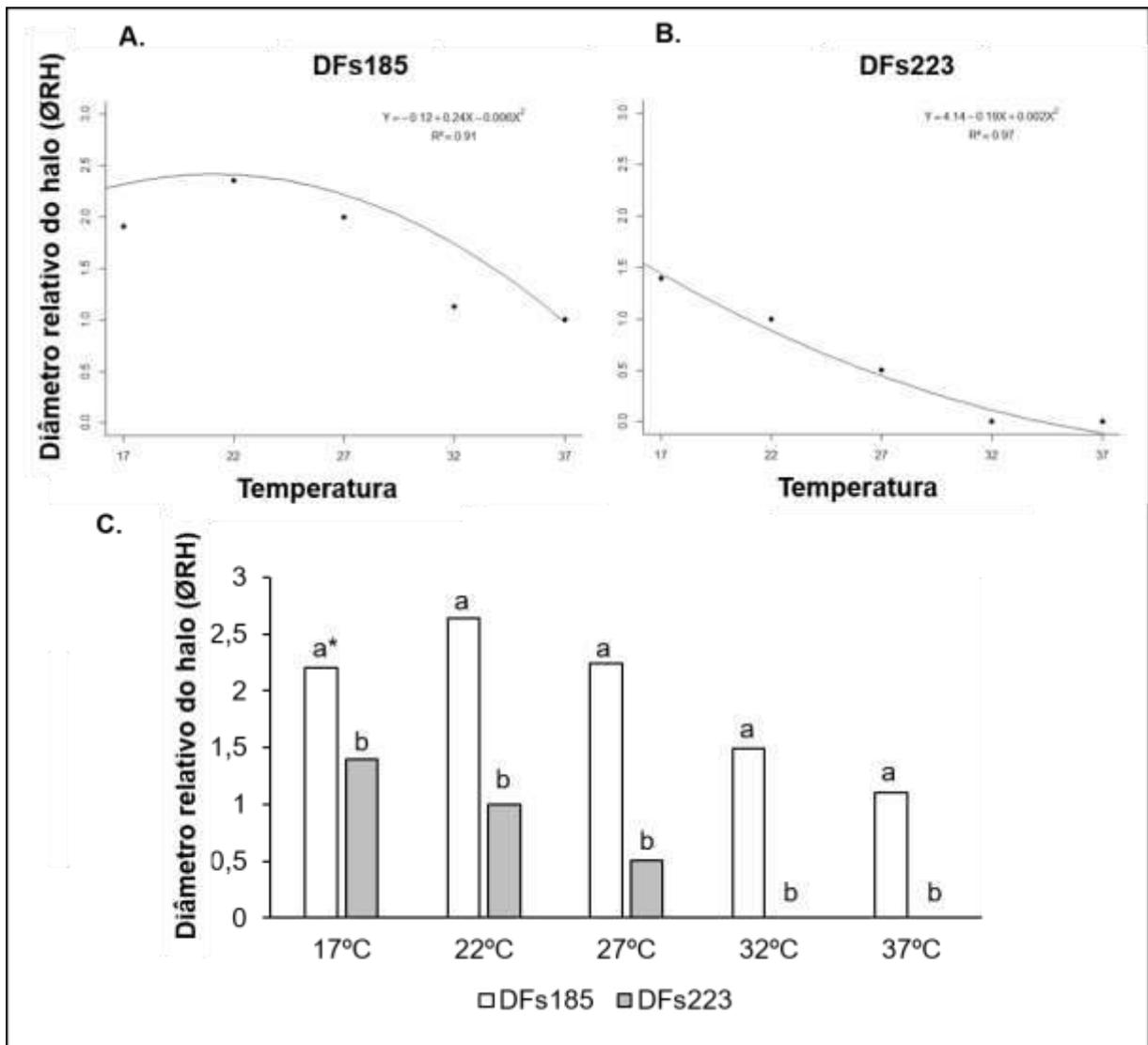


Figura 10- Produção de caseinase de isolados biocontroladores em diferentes temperaturas de incubação em meio de cultura Leite-Ágar. (A) DFs185- *Pseudomonas synxantha*; (B) DFs223- *Pseudomonas fluorescens*; (C) comparação entre tratamentos em diferentes temperaturas após 48 horas de incubação. Para cálculo do diâmetro relativo do halo (ØRH), foi utilizada a seguinte fórmula: $\text{ØRH} = (\text{ØH} - \text{ØC}) / \text{ØC}$, onde ØC = diâmetro das colônias, ØH = diâmetro dos halos formados, em dois sentidos diametralmente opostos. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Na avaliação da capacidade dos isolados bacterianos hidrolisarem lecitina, após 48 horas de incubação, ocorreu interação significativa entre isolados e temperaturas. Para ambos DFs185 e DFs223, ajustaram-se equações do tipo polinomiais de segundo grau, correspondendo a $R^2=0,78$ e $R^2=0,79$ respectivamente.

Os isolados apresentaram comportamento distinto em relação às temperaturas: DFs185 produziu maiores diâmetros relativos de halo (Fig.11A) na temperatura de 37°C, apresentando comportamento decrescente com a redução das temperaturas. DFs223 (Fig.11B), ao contrário, não produziu halos de degradação nas maiores temperaturas (32 e 37°C), sendo o maior halo observado a 22°C. Quando comparados os isolados entre si, DFs185 apresentou os maiores diâmetros relativos de halo nas temperaturas de 27, 32 e 37°C (Fig.11C), não diferindo de DFs223 nas temperaturas de 17 e 22°C.

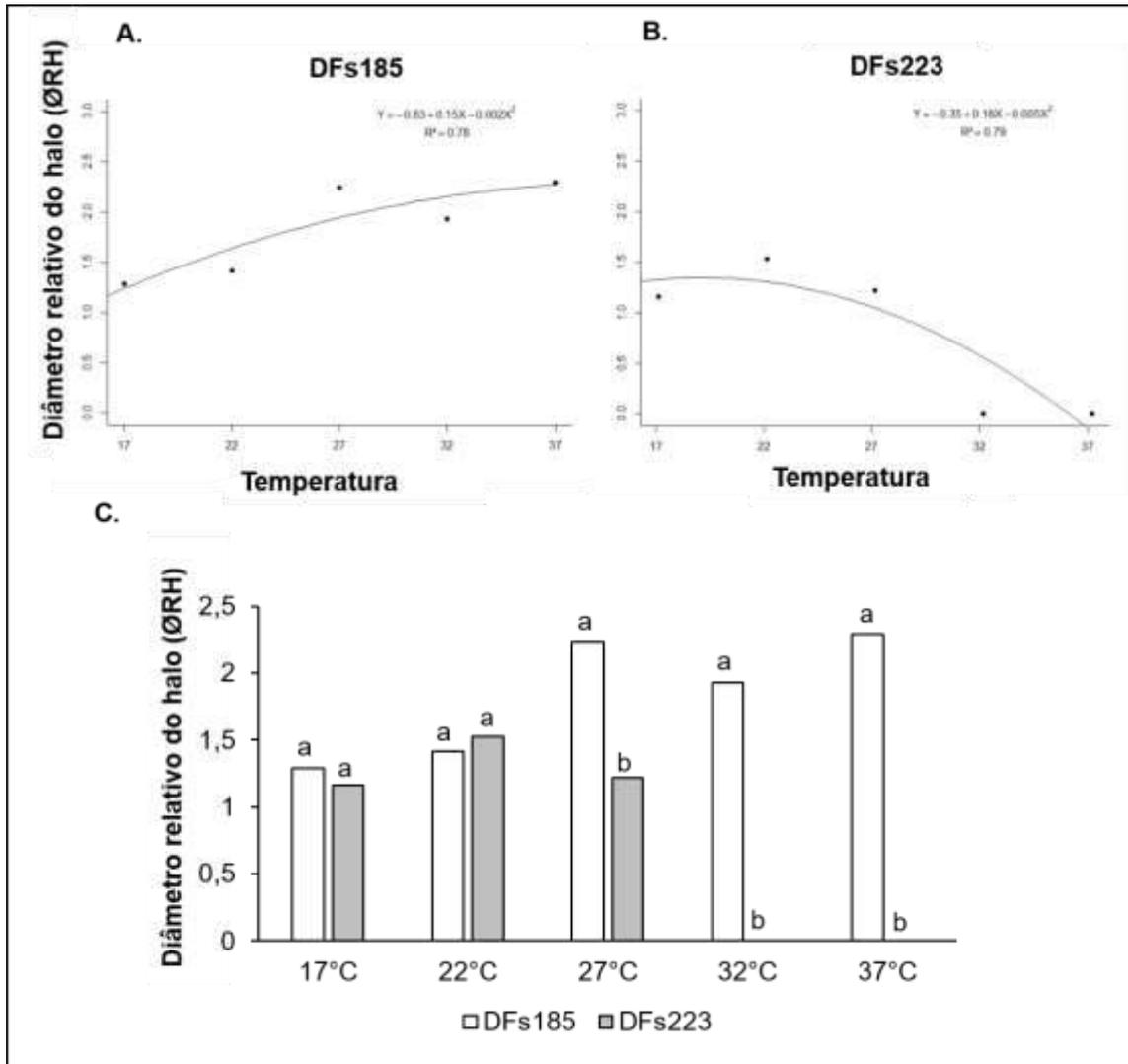


Figura 11- Produção de lecitinase de isolados biocontroladores em diferentes temperaturas de incubação em meio de lecitina (4%). (A) DFs185- *Pseudomonas synxantha*; (B) DFs223- *Pseudomonas fluorescens*; (C) comparação entre tratamentos em diferentes temperaturas, após 48 horas de incubação. Para cálculo do diâmetro relativo do halo (ØRH), foi utilizada a seguinte fórmula: $\text{ØRH} = (\text{ØH} - \text{ØC}) / \text{ØC}$, onde ØC= diâmetro das colônias, ØH= diâmetro dos halos formados, em dois sentidos diametralmente opostos. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

3.2.4 Compostos antimicrobianos: voláteis e hidrossolúveis

A avaliação de compostos voláteis em meio BDA ½ dextrose foi realizada após cinco dias de incubação. A temperatura de 37°C não foi avaliada devido a incapacidade de crescimento do fungo. Houve interação significativa entre isolados e temperaturas, ajustando-se uma equação do tipo polinomial de terceiro grau para o isolado DFs185 com $R^2=1$ (Fig.12A). Para DFs223 não houve efeito da temperatura

para o crescimento micelial de *Bipolaris oryzae* (Fig.12B e 12C) não sendo possível realizar o ajuste

O crescimento fúngico foi menor quando incubado a 17°C para o tratamento DFs185 (Fig.12A), seguido pelas temperaturas de 32 e 22°C, ambas as reduções significativas (Fig.12C).

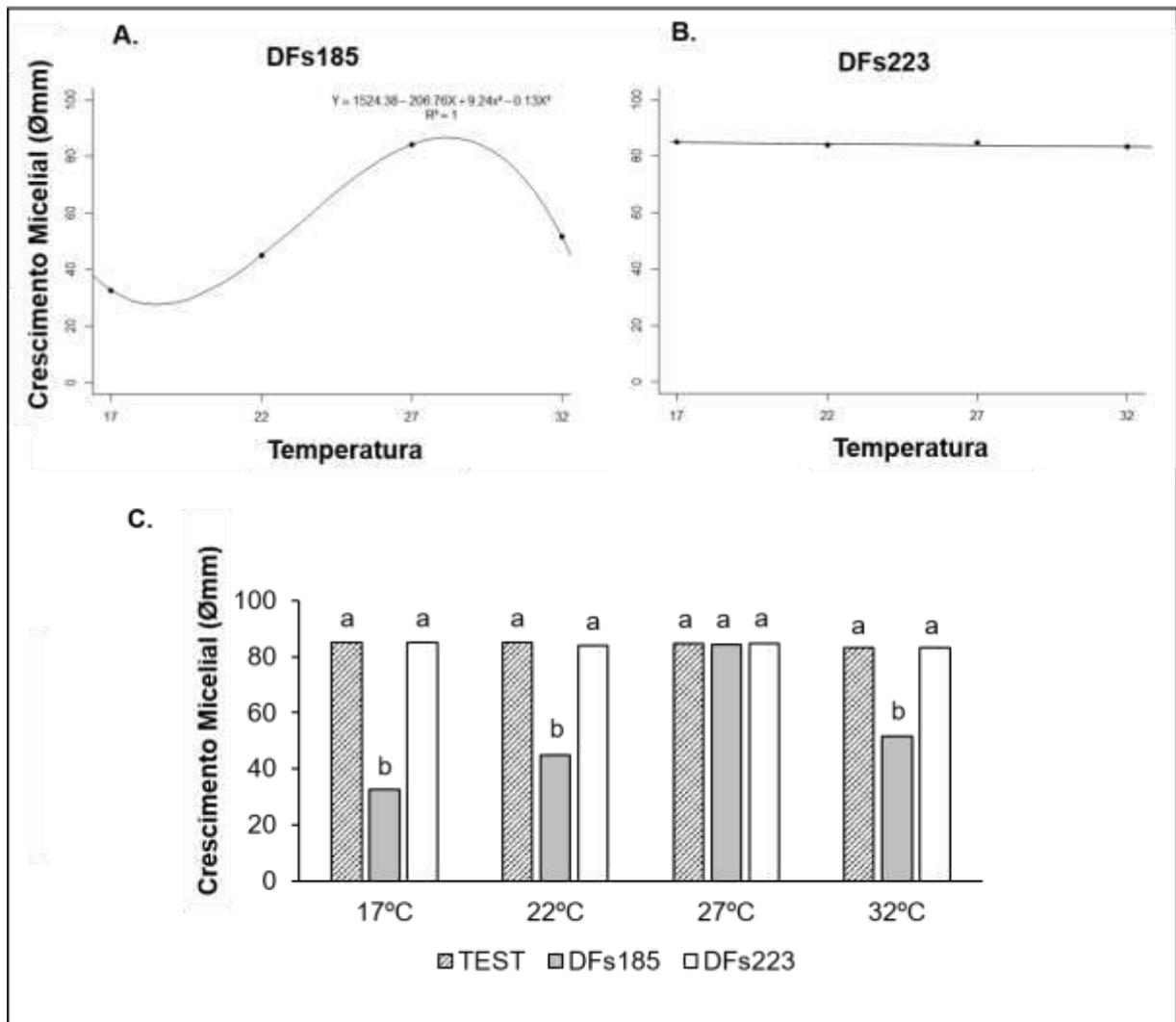


Figura 12- Crescimento micelial de *Bipolaris oryzae* pelos isolados biocontroladores por meio de compostos voláteis após 5 dias de incubação em placas de Petri contendo BDA ½ dextrose sob diferentes temperaturas. (A) DFs185- *Pseudomonas synxantha*; (B) DFs223- *Pseudomonas fluorescens*; (C) comparação entre tratamentos em diferentes temperaturas. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Na avaliação da produção de antimicrobianos hidrossolúveis após seis dias de incubação em meio BDA ½ dextrose, houve interação significativa entre isolados e temperaturas. Para DFs185 e DFs223, ajustaram-se equações do tipo polinomiais de segundo grau, correspondendo a $R^2=0,99$ e $R^2=0,98$ respectivamente.

Os isolados DFs185 e DFs223 apresentaram comportamento similar em relação as diferentes temperaturas (Fig.13A e 13.B) permitindo maior crescimento fúngico a 27°C e menor a 17°C.

Quando a comparação foi realizada entre os tratamentos dentro de cada temperatura estudada, houve redução significativa do patógeno por ambos os isolados em todas as temperaturas, porém DFs223foi mais eficiente que DFs185 nas temperaturas intermediárias (22 e 27°C) (Fig.13C).

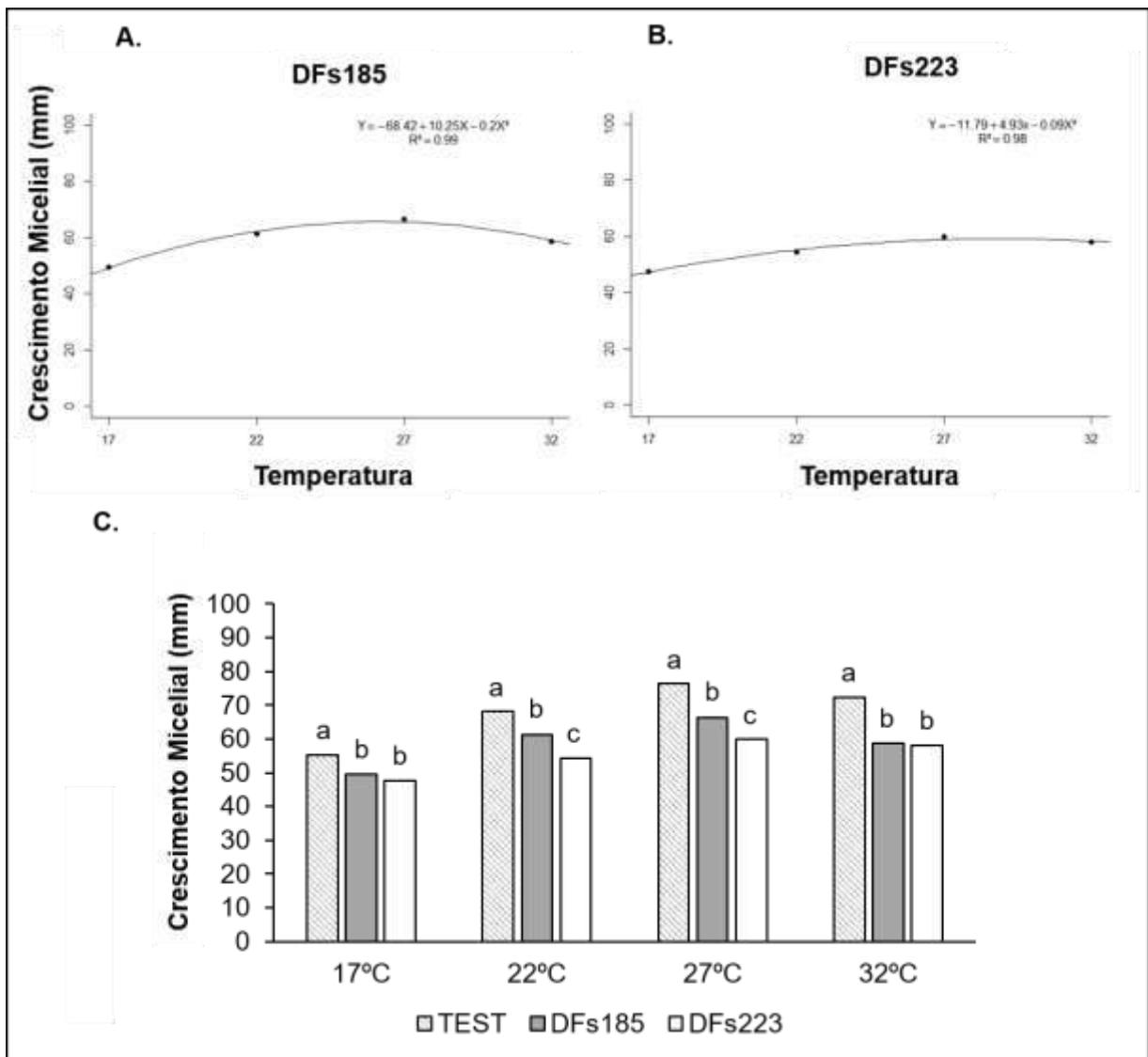


Figura 13- Crescimento micelial de *Bipolaris oryzae* em pareamento com os isolados biocontroladores em meio BDA ½ dextrose após 6 dias de incubação sob diferentes temperaturas. (A) DFs185- *Pseudomonas synxantha*; (B) DFs223- *Pseudomonas fluorescens*; (C) comparação entre tratamentos em diferentes temperaturas. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

3.2.5 Biocontrole *in vivo* da mancha-parda

3.2.5.1 Folhas destacadas de arroz em estágio V9/R1

Para o biocontrole *in vivo* a partir de folhas destacadas de arroz em estágio V9-R1, todos os fatores analisados resultaram em interação significativa. As pulverizações com os isolados DFs185 e DFs223 foram capazes de diminuir significativamente a doença, não havendo diferença entre os períodos de aplicação, exceto para DFs223 quando o maior tempo (48 horas) resultou em menor incidência da doença (Tab.3). Por outro lado, o isolado DFs223 foi mais eficiente nos períodos de pulverização preventivas (48 e 24 horas antes da inoculação de *B. oryzae*), reduzindo tanto a incidência quanto a severidade da mancha-parda em relação a testemunha. O isolado DFs185 reduziu somente a incidência quando aplicado 24 horas antes da inoculação, não diferindo significativamente da testemunha quanto a severidade (Tab.3)

Tabela 3- Biocontrole *in vivo* da mancha-parda (*Bipolaris oryzae*) representada pela medição do tamanho das lesões a partir do software ImageJ em folhas destacadas de arroz em estágio V9 pulverizadas (preventivas) com isolados biocontroladores 24 e 48 horas antes da inoculação do patógeno (*Bipolaris oryzae*). DFs185- *Pseudomonas synxantha*; DFs223- *Pseudomonas fluorescens*.

	Incidência			
	24 horas		48 horas	
Test	81,25	a A	83,33	a A
DFs185	35,42	b A	45,83	ab A
DFs223	33,33	b A	12,50	b B
Média	50,00	A	47,22	A
	Severidade			
	24 horas		48 horas	
Test	0,0775	a A	0,0705	a A
DFs185	0,0232	ab A	0,0288	ab A
DFs223	0,0079	b A	0,0044	b A
Média	0,0360	A	0,0350	A

*Médias seguidas pela mesma letra não diferiram significativamente entre si pelo teste de comparação múltipla de Dunn (alternativa não paramétrica para comparações múltiplas), maiúsculas na horizontal, minúsculas na linha. Foi considerado como significativo um valor-p menor ou igual a 0,05. Incidência final avaliada as 48 horas após a inoculação de *Bipolaris oryzae* pela porcentagem de folhas com sintomas. Severidade foi avaliada através da medição das lesões presentes nas folhas.

Nas avaliações das pulverizações curativas (24 e 48 horas depois da inoculação de *B. oryzae*), o período de 24 horas depois, resultou em menor incidência da mancha-parda para ambos os isolados, não havendo diferenças entre períodos para a severidade dos sintomas. Adicionalmente, a redução da severidade ocorreu somente pela pulverização curativa de DFs185, 24 horas após inoculação de *B. oryzae* (Tab.4).

Tabela 4- Biocontrole *in vivo* da mancha-parda (*Bipolaris oryzae*) representada pela medição do tamanho das lesões a partir do software ImageJ em folhas destacadas de arroz em estágio V9 pulverizadas (curativas) com isolados biocontroladores 24 e 48 horas depois da inoculação do patógeno (*Bipolaris oryzae*). DFs185- *Pseudomonas synxantha*; DFs223- *Pseudomonas fluorescens*.

	Incidência			
	24 horas		48 horas	
Test	75,00	a A	77,08	a A
DFs185	43,75	b B	68,75	a A
DFs223	56,25	ab B	83,33	a A
Média	58,33	B	76,39	A
	Severidade			
	24 horas		48 horas	
Test	0,0948	a A	0,0619	b A
DFs185	0,0247	b A	0,1465	a A
DFs223	0,0522	ab A	0,0988	ab A
Média	0,0570	B	0,102	A

*Médias seguidas pela mesma letra não diferiram significativamente entre si pelo teste de comparação múltipla de Dunn (alternativa não paramétrica para comparações múltiplas), maiúsculas na horizontal, minúsculas na linha. Foi considerado como significativo um valor-p menor ou igual a 0,05. Incidência final avaliada as 48 horas após a inoculação de *Bipolaris oryzae* pela porcentagem de folhas com sintomas. Severidade foi avaliada através da medição das lesões presentes nas folhas.

3.2.5.2 Plantas de arroz em estágio V3 em diferentes temperaturas

Para pulverização foliar preventiva dos isolados bacterianos (48 e 24 horas antes da inoculação de *B. oryzae*) objetivando o controle da mancha-parda, em plantas de arroz em estágio V3-V4, não houve interação significativa entre períodos e os demais fatores analisados (isolados e temperaturas), sendo possível observar

que o período de pulverização de 48 horas antes da inoculação do patógeno proporcionou os menores valores de AACPS (Fig.14B).

Entretanto, analisando o efeito dos tratamentos nas diferentes temperaturas, observou-se interação significativa, deste modo foi realizado o desdobramento da interação. Ambos os isolados apresentaram valores significativamente menores de AACPS em comparação a testemunha em todas as temperaturas (até 70% na temperatura de 27°C), não diferindo entre si (Fig.14A). Não foi possível realizar o ajuste de nenhuma das regressões para efeitos de temperatura em relação aos tratamentos.

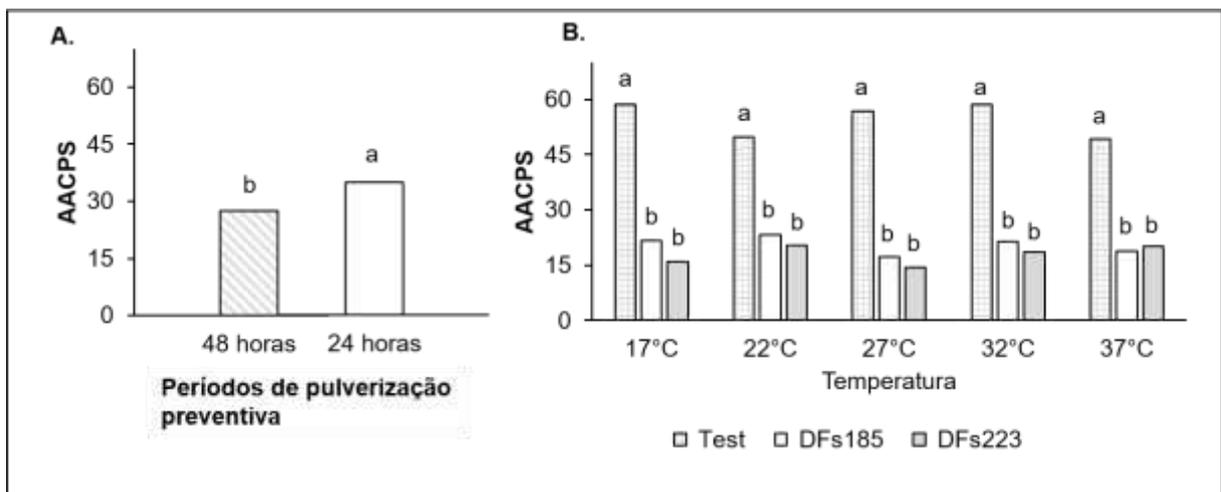


Figura 14- Severidade da mancha-parda representada pela área abaixo da curva de progresso da severidade (AACPS) em plantas de arroz em estágio V3-V4, pulverizadas com biocontroladores em diferentes períodos (48 e 24 horas antes da inoculação de *Bipolaris oryzae*) e submetidas a diferentes temperaturas (17, 22, 27, 32 e 37°C) por 48 horas. Avaliações realizadas 3, 6, 9, 12 e 15 dias após a inoculação do patógeno e posteriormente mantidas a 25°C. (A) comparação entre tratamentos nas diferentes temperaturas; (B) comparação entre períodos de aplicação. DFs185- *Pseudomonas synxantha*; DFs223- *Pseudomonas fluorescens*. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

3.3 Discussão

As bactérias do gênero *Pseudomonas* são mesófilas, tendo como temperatura ideal de crescimento 25 à 30°C (DAVID, CHANDRASEHAR, SELVAN, 2018), corroborando com os resultados encontrados no presente estudo, onde ambos os isolados (DFs185 e DFs223) obtiveram maiores absorvâncias nas temperaturas de 22 e 27°C, assim como maior duração da fase lag nas temperaturas de 17, 32 e 37°C. No presente estudo, ambos os isolados foram capazes de crescer em todas as temperaturas, o que os torna interessantes do ponto de vista do controle biológico, principalmente no que diz respeito às flutuações de temperatura ao longo do dia, tornando-as capazes de persistir no ambiente e desempenhar suas funções em temperaturas abaixo e acima da considerada ideal. Além disso, a capacidade de crescimento em todas as temperaturas estudadas pode afetar a produção de diferentes compostos e por conseguinte afetar a eficiência do controle biológico.

Microrganismos candidatos a potenciais biocontroladores de doenças passam por diversos testes iniciais de seleção, baseados em diferentes critérios. Alguns critérios levam em consideração a produção de determinado composto de interesse, em outros os microrganismos são previamente selecionados em função da temperatura de crescimento (KÖHL et al., 2011). Apesar de alguns critérios iniciais de seleção excluírem candidatos com capacidade de crescimento em temperatura corporal (37°C), fato este que pode dificultar o seu registro como produto formulado, esta característica pode ser uma vantagem, visto que a mesma poderia se estabelecer em condições tropicais.

O controle biológico de doenças pode se dar por diferentes mecanismos de ação, como competição por espaço (motilidade e colonização de superfícies), parasitismo (mediado por enzimas líticas), antibiose (pela produção de compostos antimicrobianos voláteis e hidrossolúveis) e indução de resistência (produção de compostos relacionados a resistência sistêmica induzida). Cada um destes mecanismos, em maior ou menor grau, pode ser afetado tanto pelo tamanho da população do biocontrolador, quanto pela sua capacidade em produzir respostas distintas em função das flutuações de temperatura, são esperadas para diferentes

isolados e aspectos estudados. Entretanto, apesar da temperatura influenciar na taxa de crescimento e produção de compostos envolvidos no biocontrole pelos microrganismos, a taxa de crescimento ótima pode não estar diretamente relacionada a capacidade da produção máxima (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1996), ou seja, mesmo em temperaturas onde o crescimento bacteriano é retardado ou acelerado, é possível que ocorram os processos de degradação e produção destes compostos.

No presente estudo, de forma geral, apesar das maiores absorbâncias para ambos os isolados encontrarem-se entre 22 e 27°C, a motilidade não foi afetada pela temperatura para o isolado DFs185, mostrando comportamento estável mesmo em temperaturas abaixo ou a cima da faixa ideal de crescimento. Este fato pode ser atribuído à limitada capacidade de movimentação aqui observada. No entanto, os isolados estudados não foram avaliados para outras formas de motilidade existentes. Em contrapartida, para DFs223 a temperatura de maior absorbância foi a que resultou em maiores diâmetros de colônia, indicando maior população bacteriana, o que vai de encontro com a definição de motilidade do tipo swarming, definida como um movimento bacteriano rápido e multicelular (KEARNS, 2010). Neste contexto Andreoglou e colaboradores (2003), estudando a influência de diferentes temperaturas (12, 15, 18, 21, 24, 27 e 30°) na motilidade de *P. oryzae* observaram forte influenciada temperatura, sendo máxima a 26°C e reduzida a temperaturas abaixo de 18°C.

A motilidade do tipo swarming envolve o movimento coletivo de bactérias, que sob condições adequadas de nutrientes e umidade, podem colonizar rapidamente as superfícies de tecidos (JARREL; McBRIDE; 2008). A capacidade de se locomover em ambientes distintos contribui para a sobrevivência e colonização, além de conferir vantagens para competir com outros microrganismos (McCARTER; MORABE; 2019), e assim sendo, essencial para o sucesso do controle biológico.

Bactérias biocontroladoras também podem produzir enzimas líticas capazes de atuar sobre os fitopatógenos a partir da degradação de compostos constituintes da parede celular (ALI et al., 2019). Bactérias do gênero *Pseudomonas* são relatadas em diversos trabalhos produzindo enzimas responsáveis pelo controle de doenças de plantas, incluindo proteases e lipases, que auxiliam na degradação da parede celular de fungos e nematoides (GEORGIEVA et al., 2018; CHENNIAPPAN

et al., 2019), Neste sentido Hernández-León e colaboradores (2015), relacionaram a atividade de proteases produzidas por *P. fluorescens* no controle de uma gama de fungos fitopatogênicos, incluindo *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Diaporthe phaseolorum* e *Colletotrichum lindemthianum*. No presente estudo, os isolados DFs185 e DFs223 foram capazes de hidrolisar caseína (proteína), entretanto, a maior produção da enzima ocorreu em temperaturas menores, sendo fortemente reduzida a partir de 27°C, o que poderia interferir na capacidade de parasitar o patógeno, porém esta habilidade não foi aqui avaliada. O isolado DFs223 não foi capaz de hidrolisar caseína nas temperaturas de 32 e 37°C.

Por outro lado ambos os isolados bacterianos também foram afetados pelas diferentes temperaturas, apresentando comportamento distinto. DFs185 produziu maiores halos de degradação de lecitina nas maiores temperaturas, em contrapartida, para DFs223 a maior produção da enzima ocorreu nas menores temperaturas, reforçando a interferência das diferentes temperaturas na produção das enzimas estudadas.

A literatura não dispõe de muitas informações acerca da produção de enzimas por bactérias do gênero *Pseudomonas* em função da temperatura. Entretanto, alguns estudos indicam que a produção enzimática é alterada, como observado por Saravanakumar et al. (2016), onde o fungo biocontrolador *Trichoderma* sp., respondeu de forma distinta em função das temperaturas e pH, em concordância com as diferenças na produção enzimática dos isolados bacterianos DFs185 e DFs223.

Outra forma das bactérias biocontroladoras do gênero *Pseudomonas* atuarem frente aos fitopatógenos é através da produção de compostos antimicrobianos voláteis, incluindo aldeídos, cetonas, álcoois, metanotiol, sulfeto de dimetila e trissulfeto de dimetila (HERNÁNDEZ-LEÓN et al., 2015). Li e colaboradores (2012) sugeriram que os compostos voláteis liberados por bactérias podem penetrar as células fúngicas, aumentar a vacuolização e retração da membrana plasmática, afetando sua permeabilidade. Adicionalmente, os voláteis liberados por bactérias podem induzir resistência sistêmica nas plantas (SANTORO et al., 2011; PARK et al., 2015; VAISHNAV et al., 2015).

Compostos voláteis liberados por *Pseudomonas* são relatados inibindo crescimento micelial de diversos fungos, como *R. solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, além de oomicetos, como *Phytophthora vignae* (FERNANDO; LINDERMAN, 1994; FERNANDO et al., 2005; ELKAHOUI et al., 2015). Neste sentido, os resultados encontrados no presente estudo, mostram efeitos de voláteis produzidos pelo isolado DFs185 diminuindo o crescimento micelial de *B. oryzae* nas diferentes temperaturas (17, 22 e 32°C), no entanto não foi possível determinar quais foram os compostos voláteis responsáveis pela inibição.

Outro mecanismo de controle de doenças utilizado pelas bactérias do gênero *Pseudomonas* é a antibiose, pela produção de compostos antimicrobianos hidrossolúveis, que suprimem ou reduzem o crescimento e esporulação de fitopatógenos, sendo eles 2,4-diacetilfloroglucinol, cianeto de hidrogênio, kanosamina, piocianina, fenazina, pirolnitrina, (PARK, et al., 2011, SARAF et al., 2014, MEYER et al., 2016). Entretanto, a literatura dispõe de poucas informações relacionadas à inibição de fitopatógenos em diferentes temperaturas. No presente estudo, ambos os isolados exerceram atividade antagônica sobre *B. oryzae* em todas as temperaturas estudadas, demonstrando que mesmo na faixa de temperatura ideal de desenvolvimento do fungo (27°C), a bactéria é capaz de exercer o antagonismo, além de apontar estabilidade de produção nas diferentes temperaturas. .

Nos ensaios em folhas destacadas, DFs185 e DFs223 reduziram significativamente o tamanho das lesões causadas por *B. oryzae* nos períodos de pulverização preventiva (24 horas antes da inoculação do patógeno). Para o período de 48 horas antes da inoculação, DFs223 foi capaz de diminuir a severidade e a incidência nas duas avaliações realizadas, indicando estes períodos como eficientes no controle do patógeno. A metodologia de folha destacada para avaliação de controle de doenças na cultura do arroz já vem sendo utilizada por diversos autores, como Kumar e colaboradores (2011), que selecionaram 31 rizobactérias para o controle de *R. solani*, capazes de diminuir significativamente o tamanho das lesões, demonstrando a eficiência do método em avaliar o controle de doenças por rizobactérias.

Resultados semelhantes aos encontrados nos ensaios de pulverização foliar dos isolados DFs185 e DFs223 em folhas destacadas, foram encontrados nos

ensaios *in planta*. A pulverização preventiva de DFs185 e DFs223 resultou em AACPS significativamente menores. O efeito da pulverização preventiva foi estável em diferentes temperaturas, especialmente o período de 48 horas antes. A estabilidade do controle do patógeno nas diferentes temperaturas pode ser visto como uma característica interessante, especialmente quando se pensa que as variações de temperatura ocorrem diariamente em condições de campo.

O controle de doenças do arroz por *Pseudomonas* já vem sendo estudado por diversos autores, como Vidhyasekaran e Muthamilan (2010), avaliando uma formulação em pó de *P. fluorescens* Pf1 para o controle da ferrugem da bainha do arroz, determinaram que bactérias deste gênero foram capazes de se estabelecer de forma mais eficiente nas sementes em comparação aos tratamentos realizados nas raízes ou via solo. A aplicação da formulação bacteriana em pó via sementes, raízes, solo e folhas controlaram de forma efetiva a doença, bem como proporcionaram maiores rendimentos de grãos em quatro ensaios a campo, demonstrando o potencial do gênero no controle de doenças da cultura do arroz.

No mesmo sentido, Joshi e colaboradores (2007), estudaram a eficácia de antagonistas, incluindo *P. fluorescens* a campo contra mancha-parda do arroz, utilizando formulações em pó e a base de óleo, pulverizadas sobre as plantas, e comparadas com o controle obtido a partir da aplicação de fungicida ditiocarbamato. *P. fluorescens* foi tão efetivo (75% de controle) quanto o controle químico (79% de controle), resultando em severidades significativamente menores, rendimento superior de grãos, nos dois anos de experimento e em diferentes cultivares de arroz, demonstrando estabilidade dos tratamentos biológicos, bem como efetividade para mais de uma cultivar.

A redução da severidade observada no presente estudo pode ser relacionada com o fato das bactérias do gênero *Pseudomonas* produzirem um arsenal de compostos relacionados ao biocontrole de doenças (enzimas líticas, motilidade, compostos voláteis e hidrossolúveis), mesmo apresentando respostas distintas em relação às variadas temperaturas. Possivelmente a redução da produção de compostos em uma dada temperatura pode ter sido compensada pelo aumento de outro e assim, manter um balanço entre os diferentes mecanismos, resultando em um nível estável de biocontrole, atuando por diferentes mecanismos de ação, como antibiose, competição, parasitismo e/ou indução de resistência sistêmica (PIERSON;

THOMASHOW, 1992; PRASAD; KUMAR; VARMA, 2015; DAVID; CHANDRASEHAR; SELVAM, 2018).

Os resultados aqui descritos são promissores para o controle da mancha-parda no arroz, no entanto é necessário avaliar a resposta das biocontroladoras em relação as flutuação de temperatura em condições de campo. Além disso, sua compatibilidade com agrotóxicos tradicionalmente utilizados nos cultivos de arroz e no manejo integrado de pragas e a utilização de diferentes métodos de aplicação desses microrganismos deve ser investigado, de modo a maximizar seus efeitos.

4. Considerações Finais

As bactérias biocontroladoras dos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas* avaliadas no presente estudo possuem várias características de um bom biocontrolador de doenças de plantas: *i* - capacidade de crescimento em diferentes temperaturas, podendo responder de forma eficiente às flutuações de térmicas; *ii* – capacidade de colonizar superfícies rapidamente (movimento swarming); *iii* - capacidade de parasitar patógenos de plantas pela produção de enzimas hidrolíticas; *iv* – atividade antimicrobiana pela produção de compostos voláteis e hidrossolúveis ativo contra *Bipolaris oryzae*; *v* – capacidade de induzir resistência sistêmica nas plantas de arroz quando pulverizadas preventivamente.

Contudo estudos devem ser realizados no intuito de maximizar o efeito destas bactérias, avaliando o uso consorciado destas, objetivando o aumento do espectro de ação e/ou da intensidade do controle e de combinação de aplicações (solo, microbiolização das sementes, pulverização), doses e múltiplas aplicações.

Sendo assim, as bactérias aqui estudadas têm potencial para serem formuladas como produtos comerciais uma vez que mostraram a capacidade de produzir uma diversidade de compostos sob estresse térmico, culminando na estabilidade de controle em diferentes temperaturas

5. Conclusões Gerais

A temperatura interfere no crescimento dos isolados bacterianos DFs185, DFs223, DFs416 e DFs418.

A temperatura interfere na motilidade tipo swarming e na capacidade de produção de caseinases e lecitinases pelas bactérias biocontroladoras estudadas.

A temperatura interfere na produção de compostos antimicrobianos voláteis e hidrossolúveis pelas bactérias DFs185, DFs223, DFs416 e DFs418.

A pulverização preventiva com os isolados bacterianos dos gêneros *Pseudomonas* (DFs185 e DFs223) e *Bacillus* (DFs416 e DFs418) em folhas destacadas de arroz e em plantas de arroz reduz a mancha parda.

A temperatura não interfere no biocontrole da mancha-parda em arroz pelos isolados DFs185, DFs223, DFs416 e DFs418, mantendo a eficiência de controle.

Referências

AGRIOS, G. Control of plant diseases. In: **Plant pathology**. Flórida: Elsevier Academic Press: 5 ed, 2005. p.293-353.

AGROFIT. **Sistemas de agrotóxicos fitossanitários**. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em 26/12/2018.

ALI, J.; SHARMA, D. C.; BANO, A.; GUPTA, A.; SHARMA, S.; BAJPAI, P.; PATHAK, N. Exploiting microbial enzymes for augmenting crop production. In: KUDDUS, M. **Enzymes in Food Biotechnology**: production, applications, and future prospects. Saudi Arabia: Academic Press, 1ed., 2019. p.503-519.

ANDREOGLOU, F.; VAGELAS, I. K.; WOOD, M.; SAMALIEV, H. Y.; GOWEN, S. R. Influence of temperature on the motility of *Pseudomonas oryzae* and control of *Globodera rostochiensis*. **Soil Biology Biochemistry**, v.35, p.1095-1101, 2003.

ASADISAD, B.; OLSON, A. L. J. DUSANE, D. H.; GHOSHAL, S.; TUFENKJI, N. Transport, motility, biofilm forming potential and survival of *Bacillus subtilis* exposed to cold temperature and freeze-thaw. **Water Research**, v.58, p.239-247, 2014.

BARNWAL, M. K.; KOTASSTHANE, A.; MAGCULIA, N.; MUKHERJEE, P. K.; SAVARY, S.; SHARMA, A. K.; SINGH, H. B.; SINGH, U. S.; SPARKS, A. H.; VARIAR, M.; ZAIDI, N. A review on crop losses, epidemiology and disease management of rice brown spot to identify research priorities and knowledge gaps. **European Journal of Plant Pathology**, v.136, n.3, p.443–457, 2013.

BEDENDO, I. P.; MASSOLA JR, N. S.; AMORIM, L. Controles cultural, físico e biológico de plantas. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. (Ed.). **Manual de fitopatologia**: princípios e conceitos. Ouro Fino: Ceres, 4 ed, 2011. v.1, p.367-388.

BEDENDO, I. P.; PRABHU, A. S. Doenças do arroz. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (Ed.). **Manual de fitopatologia**: doenças das plantas cultivadas. Ouro Fino: Ceres, 5 ed., 2016. v.2, p.87-100.

BERENDSEN, R. L.; PIETERSE, C. M.; BAKKER, P. A. The rhizosphere microbiome and plant health. **Trends in Plant Science**, p.478–486.

BURKETOVÁ, L.; TRDÁ, L.; OTT, P.; VALENTOVÁ, O. Bio-based resistance inducers for sustainable plant protection against pathogens. **Biotechnology Advances**, v.33, p.994-1004, 2015.

CAMPBELL, C. L.; MADDEN, L. V. **Introduction to plant disease epidemiology**. New York: John Wiley Professio, 1990. 560p.

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

CHANDLER, S.; HESE, N. V.; COUTTE, F.; JACQUES, P.; HÖFTE, M.; DE VLEESSCHAUWER, D. Role of cyclic lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* in mounting induced immunity in rice (*Oryza sativa* L.). **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.91, p.20-30, 2015.

CHANG, C. H.; YANG, S. S. Thermo-tolerant phosphate solubilizing microbes for multifunctional biofertilizer preparation. **Bioresource Technology**, v.100, p.1648-1658, 2009.

CHEEKE, T.; COLEMAN, D. C.; WALL, D. H. **Microbial ecology in sustainable agroecosystems**. CRC Press: Boca Raton, 2013. 303p.

CHEN, L.; CAO, C.; WANG, S.; VARCOE, J. R.; SLADE, R. C. T.; AVIGNONE-ROSSA, C.; ZHAO, F. Electron communication of *Bacillus subtilis* in harsh environments. **iScience**, v.12, p.260-269, 2019.

CHENNIAPPAN, C.; NARAYANASAMY, M.; DANIEL, G. M.; RAMARAJ, G. B.; PONNUSAMY, P.; SEKAR, J.; RAMALINGAM, P. V. Biocontrol efficiency of native plant growth promoting rhizobacteria against rhizome rot disease of tumeric. **Biological Control**, v.129, p.55-64, 2019.

CHITHRASHREE, C.; UDAYASHANKAR, A. C.; NAYAKA, S. C.; REDDY, M. S.; SRINIVAS, C. Plant growth-promoting rhizobacteria mediate induced systemic resistance in rice against bacterial leaf blight caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **Biological Control**, v.59, p.114-122, 2011.

CHOWDAPP, P.; KUMAR, S. M.; LAKSHMI, M. J.; UPRETI, K. K. Growth stimulation and induction of systemic resistance in tomato against early and late blight by *Bacillus subtilis* OTPB1 or *Trichoderma harzianum* OTPB3. **Biological Control**, v.65, p.109-117, 2013.

COMMARE, R. R.; NANDAKUMAR, R.; KANDAN, A.; SURESH, S.; BHARATHI, M.; RAGUCHANDER, T.; SAMIYAPPAN, R. *Pseudomonas fluorescens* based bioformulation for the management of sheath blight disease and leafhopper insect in rice. **Crop Protection**, v.21, n. 8, p.671-677, 2002.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. **A cultura do arroz**. DE OLIVEIRA NETO, A. A. Brasília, 2018. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>> Acesso em 15 Julho 2018.

CONNOR, N.; SIKORSKI, J.; ROONEY, A. P.; KOPAC, S.; KOEPEL, A. F.; BURGER, A.; COLE, S. G.; PERRY, E. B.; KRIZANC, D.; FIELD, N. C.; SLATON, M.; COHAN, F. M. Ecology of speciation in the genus *Bacillus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.76, p.1349-1358, 2010.

CORE TEAM R. **A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2018.

DALLAGNOL, L. J.; RODRIGUES, F. A.; DAMATTA, F.M. Brown spot of rice is affected by photon irradiance and temperature, **Journal of Phytopathology**, v.159, p.630–634, 2011.

DAVID, B. V.; CHANDRASEHAR, G.; SELVAM, P. N. *Pseudomonas fluorescens*: a plant-growth-promoting rhizobacterium (PGPR) with potential role in biocontrol of pests of crops. In: PRASAD, R.; GILL, S. S.; TUTEJA, N. **Crop improvement through microbial biotechnology new and future developments in microbial biotechnology and bioengineering**. Elsevier, 1 ed, 2018. v.1, p.129-157.

DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of speciesgroups of *Trichoderma*. I - Production of non-volatile antibiotics. **Transactions of the British Mycological Society**, v.57, p.25-39, 1971.

DHINGRA, O.D.; SINCLAIR, J.B. **Basic plant pathology methods**. Boca Raton, Florida: Lewis Publishers, 1995. 448p.

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

ETESAMI, H.; ALIKHANI, H. A. Co-inoculation with endophytic and rhizosphere bacteria allows reduced application rates of N-fertilizer for rice plant. **Rhizosphere**, v.2, p.5-12, 2016.

FARR, D. F.; ROSSMAN, A. Y. Fungal databases, U.S. National Fungus Collections, ARS, USDA. Disponível em: <https://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/> Acesso em: 30 agosto 2018.

FERNANDO, W. G. D.; LINDERMAN, R. Inhibition of *Phytophthora vignae* and root rot of cowpea by soil bacteria. **Biological Agriculture and Horticulture**, v.12, p.1-14, 1994.

FERNANDO, W. G. D.; RAMARATHNAM, A.S.; KRISHNAMOORTHY, A. S.; SAVCHUK, S. C. Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol. **Soil Biology and Biochemistry**, v.37, p.955-964, 2005.

FIRA, D.; DIMKIC, I.; BERIC, T.; LOZO, J.; STANKOVIC, S. Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. **Journal of Biotechnology**, v.285, p.44-55, 2018.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAO. **Food outlook**: biannual report on global food markets. Rome, 2016. 139 p.

GAO, S.; WU, H.; YU, X.; QIAN, L.; GAO, X. Swarming motility plays the major in migration during tomato root colonization by *Bacillus subtilis* SWR01. **Biological Control**, v.98, p.11-17, 2016.

GAO, Z.; ZHANG, B.; LIU, H.; HAN, J.; ZHANG, Y. Identification of endophytic *Bacillus velezensis* ZSY-1 strain and antifungal activity of its volatile compounds against *Alternaria solani* and *Botrytis cinerea*. **Biological Control**, v.105, p.27–39, 2017.

GEORGIEVA, T.; EVSTATIEVA, Y.; SAVOV, V.; BRATKOVA, S.; NIKOLOVA, D. Assessment of plant growth promoting activities of five rhizosphere *Pseudomonas* strains. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.16, p.285-292, 2018.

GNANAMANGAI, B. M.; PONMURUNGAN, P. Evaluation of various fungicides and microbial based biocontrol agents against bird's eye spot disease of tea plants. **Crop Protection**, v.32, p.111–118, 2012.

GOWTHAM, H. G.; MURALI, M.; SINGH, S. B.; LAKSHMEESHA, T. R.; MURTHY, K. N.; AMRUTHESH, K. N.; NIRANJANA, S. R. Plant growth promoting rhizobacteria – *Bacillus amyloliquefaciens* improves plant growth and induces resistance in chilli against anthracnose disease. **Biological Control**, v.126, p.209-217, 2018.

GUEVARA-AVENDAÑO, E.; BEJARANO-BOLÍVAR, A. A.; KIEL-MARTÍNEZ, A. L.; RAMÍREZ-VÁSQUEZ, M.; MÉNDEZ-BRAVO, A. VON WOBESER, E. A.; SÁNCHEZ-RANGEL, D.; GUERRERO-ANALCO, J. A.; ESKALEN, A.; REVERCHON, F. Avocado rhizobacteria emit volatile organic compounds with antifungal activity against *Fusarium solani*, *Fusarium* sp. associated with kuroshio shot hole borer, and *Colletotrichum gloeosporioides*. **Microbiological Research**, v.219, p.74-83, 2019.

GUPTA, P. K. Absorption, distribution, and excretion of toxicants. In: GUPTA, P. K. **Fundamentals of toxicology**: Essential concepts and applications. Índia: Academic Press, 2016. p.185–202.

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

HUBER, B.; EBERL, L.; FEUCHT, W.; POLSTER, J. Influence of polyphenols on bacterial biofilm formation and quorum-sensing. **Zeitschrift für Naturforschung**. v.58, p.879-884, 2003.

HWANG, CHENG-AN.; HUANG, L. Growth and survival of *Bacillus cereus* from spores in cooked rice – one-step dynamic analysis and predictive modeling. **Food Control**, v.96, p.403-409, 2019.

JANGIR, M.; PATHAK, R.; SHARM, S.; SHARMA, S. Biocontrol mechanisms of *Bacillus* sp., isolated from tomato rhizosphere against *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici*. **Biological Control**, v.123, p.60-70, 2018.

JARREL, K. F.; McBRIDE, M. J. The surprisingly diverse ways that prokaryotes move. **Nature Reviews Microbiology**, v.6, p.466-476, 2008.

JOSHI, N.; BRAR, K. S.; PANNU, P. P. S.; SINGH, P. Field efficacy of fungal and bacterial antagonists against brown spot of rice. **Journal of Biological Control**, v.21, p.159–162, 2007.

KEARNS, D. B. A field guide to bacterial swarming motility. **Nature Reviews Microbiology**, v.8, p.634-644, 2010.

- KHEDHER, S. B.; KILANI-FEKI, O.; DAMMAK, M.; JABNOUN-KHIAREDDINE, H.; DAMMI-REMADI, M.; TOUNSI, S. Efficacy of *Bacillus subtilis* V26 as a biological control agente against *Rhizoctonia solani* on potato. **Comptes Rendus Biologies**, v.338, p.784-792, 2015.
- KÖHL, J.; POSTMA, J.; NICOT, P.; RUOCCO, M.; BLUM, B. Stepwise screening of microorganisms for commercial use in biological control of plant pathogenic fungi and bacteria. **Biological Control**, v.57, p.1–12, 2011.
- KUMAR, A.; VERMA, J. P. Does plant – microbe interaction confer stress tolerance in plants: a review. **Microbiological Reserach** v.207., p.41-52, 2018.
- KUMAR, K. V. K.; REDDY, M. S.; YELLAREDDYGAR, S. K. R.; KLOEPPER, J. W.; LAWRENCE, K.; ZHOU, S.; MILLER, X. G. Evaluation and selection of elite plant growth-promoting rhizobacteria for suppression of sheath blight of rice caused by *Rhizoctonia solani* in a detached leaf bio-assay. **International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology**, v.2, p.488-495, 2011.
- LASTOCHKINA, O.; PUSENKOVA, L.; YULDASHEV, R.; BABAEV, M.; GARIPOVA, S.; BLOGOVA, D.; KHAIRULLIN, R.; ALINIAEIFARD, S. Effects of *Bacillus subtilis* on some physiological and biochemical parameters of *Triticum aestivum* L. (wheat) under salinity. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.121, p.80-88, 2017.
- LAVAKUSH, Y.J.; VERMA, J.P.; JAISWAL, D.K.; KUMAR, A. Evaluation of PGPR and different concentration of phosphorous level on plant growth, yield and nutrient content of rice (*Oryza sativa*). **Ecological Engineering**. v.62, p.123–128, 2014.
- LETCHER, T, M. **Climate Change: Observed impacts on Planet Earth**. 3 ed. The Netherlands: Elsevier, 2016. 588p.
- LI, Q.; NING, P.; ZHENG, L.; HUANG, J.; GUOQING, L.; HSING, T. Effects of volatile substances of *Streptomyces globisporus* JK-1 on control of *Botrytis cinerea* on tomato fruit. **Biological Control**, v.61, p.113-120, 2012.
- 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.
- LUDWIG, J.; MOURA, A. B.; SANTOS, A. S. DO.; RIBEIRO, A. S. Microbiolização de sementes para o controle da mancha-parda e da escaldadura em arroz irrigado. **Tropical Plant Pathology**, v.34, p.322-328, 2009.
- LUDWIG, J.; MOURA, A. B.; GOMES, C. B. Potencial da microbiolização de sementes de arroz com rizobactérias para o biocontrole do nematoide das galhas. **Tropical Plant Pathology**, v. 38, p.264-268, 2013.
- MACLEAN, J.; HARDY, B.; HETTEL, G. **Rice almanac: source book for one of the most important economic activities on earth**, 4.ed. Los Baños (Phillipines.): International Rice Research Institute, 2013. 283p.
- MARIANO, R.L.R.; SILVEIRA, E.B. **Manual de práticas em fitobacteriologia**. 2ed. Recife: UFRPE, 2005.184p.

- McCARTER, L. L.; MORABE, M. L. Swimming and swarming motility. In: ROITBERG, B. D.; COTTER, P. D. **Reference Module in Life Sciences**, v.1, p.1-9, 2019.
- MEENA, R. K.; SINGH, R. K.; SINGH, N.P; MEENA, S. K.; MEENA, V. S. Isolation of low temperature surviving plant growth – promoting rhizobacteria (PGPR) from pea (*Pisum sativum* L.) and documentation of their plant growth promoting. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.4, p.806-811, 2015.
- MELO, F. M. P. D. DE; FIORE, M. F.; MORAES, L. A. B. D.; SILVA-STENICO, M. E.; SCRAMIN, S.; TEIXEIRA, M. D. A.; MELO, I. S. D. Antifungal compound produced by the cassava endophyte *Bacillus pumilus* MAIIM4A. **Scientia Agricola**, v.66, p.583-592, 2009.
- MÉNDEZ-BRAVO, A.; CORTAZAR-MURILLO, E. M.; GUEVARA-AVENDAÑO, E.; CEBALLOS-LUNA, O.; RODRÍGUEZ-HAAS, B.; KIEL-MARTÍNEZ, A. L.; HERNÁNDEZ-CRISTÓBAL, O.; GUERRERO-ANALCO, J. A.; REVERCHON, F. 2018. Plant growth-promoting rhizobacteria associated with avocado display antagonistic activity against *Phytophthora cinnamomi* through volatile emissions. **Public Library of Science**, v.13, p.1-18, 2018.
- MENG, X.; YU, J.; YU, M.; YIN, X.; LIU, Y. Dry flowable formulations of antagonistic *Bacillus subtilis* strain T429 by spray drying to control rice blast disease. **Biological Control**, v.85, p.46-51, 2015.
- MEYER, S. L.; EVERTS, K. L.; GARDENER, B. M.; MASLER, E. P.; ABDELNABBY, H. M.; SKANTAR, A. M. Assessment of DAPG-producing *Pseudomonas fluorescens* for management of *Meloidogyne incognita* and *Fusarium oxysporum* on watermelon. **Journal of Nematology**, v.48, p.43-53, 2016.
- MNIF, I.; GHRIBI, D. Lipopeptide surfactants: production, recovery and pore forming capacity. **Peptides**, v.71, p.100-112, 2015.
- MOORE, J.C.; DE RUITER, P. C. Soil food webs in agricultural ecosystems. In: CHEEKE, T.; COLEMAN, D. C.; WALL, D. H. **Microbial ecology of sustainable agroecosystems**. Boca Raton: CRC Press, 2013. p.63–88.
- MOURA, A. B.; LUDWIG, J.; SANTOS, A. G.; SCHAFER, J. T.; SOARES, V. N.; CORREA, B. O. Biocontrol and seed transmission of *Bipolaris oryzae* and *Gerlachia oryzae* to rice seedlings. **Journal of seed science**, v.36, p.407-412, 2014.
- NAGARAJUMAR, 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.
- NAGARAJUMAR, M.; JAYARAJ, J.; MUTHUKRISHNAN, R.; BHASKARAN, R.; VELAZHAHAN, R. Detoxification of oxalic acid by *Pseudomonas fluorescens* strain PfMDU2: implications for the biological control of rice sheath blight caused by *Rhizoctonia solani*. **Microbiological Research**, v.160, p.291-298, 2005.

- ONGENA, M.; DUBY, F.; JOURDAN, E.; BEAUDRY, T.; JADIN, V.; DOMMES, J.; THONART, P. *Bacillus subtilis* M4 decreases plant susceptibility towards fungal pathogens by increasing host resistance associated with differential gene expression. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.67, p.692-698. 2005.
- PAPUOLO, T.; STAROVIC, M.; ALEKSIC, G.; ZIVKOVIC, S.; JOSIC, D.; IGNJATOV, M.; MILOVANOVIC, P. Response of different beans against common bacterial blight disease caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *Phaseoli*. **Bulgarian Journal Agricultural Science**, v.86, p.45-48, 2013.
- PARK, J. Y.; OH, S. A.; ANDERSON, A. J.; NEISWENDER, J.; KIM, J. C.; KIM, Y. C. Production of the antifungal compounds phenazine and pyrrolnitrin from *Pseudomonas chlororaphis* O6 is differentially regulated by glucose. **Letters in Applied Microbiology**, v.52, p.532-537, 2011.
- PARK, Y.; DUTTA, S.; ANN, M.; RAAJMAKERS, J.; PARK, K. Promotion of plant growth by *Pseudomonas fluorescens* strain SS101 via novel volatile organic compounds. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.461, p.361-365, 2015.
- PELCZAR JR., M.J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2. ed. São Paulo: Makron Books, 1996. v.1, 524p.
- PEPPER, I. L.; GENTRY, T. J. Earth Environments. In: PEPPER, I. L.; GERBA, C. P.; GENTRY, T. J. **Environmental Microbiology**. Academic Press, 3 ed., 2014. p.59-88.
- PIERSON, L. S.; THOMASHOW, L. S. Cloning and heterologous expression of the phenazine biosynthetic locus from *Pseudomonas aureofaciens* 30-84. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.5, p. 330-339, 1992.
- PIMENTEL-GOMES, F. **Curso de estatística experimental**. 15ed. Piracicaba: ESALQ, 2009. 451p.
- POTGIETER, H.; ALEXANDER, M. Susceptibility and resistance of several fungi to microbial lysis. **Journal of Bacteriology**, v.91, p.1526–1532, 1996.
- PRASAD, R.; KUMAR, M.; VARMA, A. Role of PGPR in soil fertility and plant health. In: EGAMBERDIEVA, D.; SHRIVASTAVA, S.; VARMA, A. (Eds.), **Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and medicinal plants**. Switzerland: Springer International Publishing, 2015. p.247–260.
- RATH, M.; MITCHELL, T. R.; OURO, S. E. Volatiles produced by *Bacillus mojavensis* RRC101 act as plant growth modulators and are strongly culture-dependent. **Microbiological Research**, v.208, p.76-84, 2018.
- REGO, M. C. F.; CARDOSO, A. F.; FERREIRA, T. C.; DE FILLIPI, M. C.C.; BATISTA, T. F.V.; VIANA, R. G.; DA SILVA, G. B. The role of rhizobacteria in rice plants: growth and mitigation of toxicity. **Jornal of Agricultura Integrative**, v.17, n. 12, p.2636-2647, 2018.

RINGLER, C.; CENACCHI, N.; KOO, J.; ROBERTSON, R. D.; FISHER, M.; COX, C. M.; PEREZ, N. D.; GARRETT, K.; ROSEGRANT, M. W. Sustainable agricultural intensification: the promise of innovative farming practices. In: ANDREW, M.; HEIDI, F. International Food Policy Research Institute (IFPRI). **Global Food Policy Report**. Washington, DC: 2014. p.43-52.

ROY, T. BANDOPADHYAY, A.; SONAWANE, P. J.; MAJUMDAR, S.; MAHAPATRA, N. R.; ALAM, S.; DAS, N. Bio-effective disease control and plant growth promotion in lentil by two pesticide degrading strains of *Bacillus* sp. **Biological Control**, v.127, p.55-63, 2018.

SAAKRE, M.; BABURAO, T. M.; SALIM, A. P.; FFANCIES, R. M.; ACHUTHAN, V. P.; THOMAS, G.; SIVARANJAN, S. R. Identification and characterization of genes responsible for drought tolerance in rice mediated by *Pseudomonas fluorescens*. **Rice Science**, 5ed. v.24, p.291-298, 2017.

SABATÉ, D. C.; BRANDAN, C. P.; PETROSELLI, G.; ERRA-BALSELLS, R.; AUDISIO, M. C. Decrease in the incidence of charcoal root rot in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) by *Bacillus amyloliquefaciens* B14, a strain with PGPR properties. **Biological Control**, v.113, p.1-8, 2017.

SANTORO, M.; ZYGADLO, J.; GIORDANO, W.; BANCHIO, E. Volatile organic compounds from rhizobacteria increase biosynthesis of essential oil and growth parameters in peppermint (*Mentha piperita*). **Plant Physiology and Biochemistry**, v.49, p.1177-1182, 2011.

SARAF, M.; PANDYA, U.; THAKKAR, A. Role of allelochemicals in plant growth promoting rhizobacteria for biocontrol of phytopathogens. **Microbiological Research**, v.169, p.18-29, 2014.

SARAVANAKUMAR, K.; YU, C.; DOU, K.; WANG, M.; LI, Y.; CHEN, JIE. Synergistic effect of *Trichoderma*-derived antifungal metabolites and cell wall degrading enzymes on enhanced biocontrol of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*. **Biological Control**, v.94, p.37-46, 2016.

SARWAR, A.; HASSAN, M. N.; IMRAN, M.; IQBAL, M.; MAJEED, S.; BRADER, G.; SESSITSCH, A.; HAFEEZ, F. Y. Biocontrol activity of surfactin purified from *Bacillus* NH-100 and NH-217 against bakanae disease. **Microbiological Reserach**, v.209, p.1-3, 2018.

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

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

SHABANAMOL, S.; DIVYA, K.; GEORGE, T. K.; RISHAD, K. S.; SREEKUMAR, T. S.; JISHA, M. S. Characterization and *in plant* nitrogen fixation of plant promoting endophytic diazotrophic *Lysinibacillus sphaericus* isolated from rice (*Oryza sativa*). **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.102, p.46-54, 2018.

- SHAFI, J.; TIAN, H.; JI, M. *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens: a review. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v.31, n.3, p.446-459, 2017.
- SHARMA, R.; SINGH, J.; VERMA, N. Production, characterization and environmental applications of biosurfactants from *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.16, p.132-139, 2018.
- SIDDIQUIE, K. S.; CAVICCHIOLI, R. Cold-adapted enzymes. **Annual Review of Biochemistry**, v.75, p.4210-4218, 2006.
- SINGH, M. SINGH, D., GUPTA, A.; PANDEY, K. D.; SINGH, P. K.; KUMAR, A. Plant growth promoting rhizobacteria: application in biofertilizers and biocontrol of phytopathogens. In: SINGH, A. K.; KUMAR, A.; SINGH, P. K (Eds). **PGPR amelioration in sustainable agriculture: Food security and environmental management**. India: Woodhead Publishing, Inc, 1 ed, 2019. v.1. p.41-66.
- SINGH, R. K.; SINGH, C. V.; SHUKLA, V. D. Phosphorus nutrition reduces brown spot incidence in rainfed upland rice. **International Rice Research Notes**, v.30, p.31–32, 2005.
- SINGH, V. K.; SINGH, A. K.; SINGH, P. P.; KUMAR, A. Interaction of plant growth promoting bacteria with tomato under abiotic stress: a review. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v.267, p.129-140, 2018.
- SOUZA JÚNIOR, I. T. DE.; MOURA, A. B.; SCHAFFER, J. T.; CORRÊA, B. O.; GOMES, C. B. Biocontrole da queima-das-bainhas e do nematoide-das-galhas e promoção de crescimento de plantas de arroz por rizobactérias. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.45, p.1259-1267, 2010.
- SOUZA JÚNIOR, I. T.; SCHAFFER, J. T.; CORREA, B. O.; FUNCK, G. R. D.; MOURA, A. B. Expansion of the biocontrol spectrum of foliar diseases in rice with combinations of rhizobacteria. **Revista Ciencia Agrônômica**, v.48, p.513-522, 2017.
- SUKKASEM, P.; KURNIAWAN, A.; KAO, T-C.; CHUANG, H-W. A multifaceted rhizobacterium *Bacillus licheniformis* functions as a fungal antagonist and a promoter of plant growth and abiotic stress tolerance. **Environmental and Experimental Botany**, v.155, p.541-551, 2018.
- SUN, L.; LU, Z.; BIE, X.; LU, F.; YANG, S. Isolation and characterization of a co-producer of fengycins and surfactins, endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* ES-2, from *Scutellaria baicalensis* Georgi. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.22, p.1259-1266, 2006.
- TENDULKAR, S. R.; SAIKUMARI, Y. K.; PATEL, V.; RAGHOTAMA, S.; MUNSHI, T. K.; BALARAM, P.; CHATTO, B. B. Isolation, purification and characterization of an antifungal molecule produced by *Bacillus licheniformis* BC98, and its effect on phytopathogen *Magnaporthe grisea*. **Journal of Applied Microbiology**, v.103, p.2331-2339, 2007.
- TOKPAH, D. P.; LI, H.; WANG, L.; LIU, X.; MULBAH, Q. S.; LIU, H. An assessment system for screening effective bacteria as biological control agents against *Magnaporthe grisea* on rice. **Biological Control**, v.103, p.21-29, 2016.

TYC, O.; SONG, C.; DICKSCHAT, J. S.; VOS, M.; GARBEVA, P. The ecological role of volatile and soluble secondary metabolites produced by soil bacteria. **Trends in Microbiology**, v.25, p.280-292, 2017.

VAISHNA, A.; KUMARI, S.; JAIN, S.; VARMA, A. CHOUDHARY, D. K. Putative bacterial volatile-mediated growth in soybean (*Glycine max* L: Merrill) and expression of induced proteins under salt stress. **Journal of Applied Microbiology**, v.119, p.539-551, 2015.

VIDHYASEKARAN, P.; MUTHAMILAN, M. Evaluation of a powder formulation of *Pseudomonas fluorescens* Pf1 for control of rice sheath blight. **Biocontrol Science and Technology**, p.67-74, 2010.

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

WOBBROCK, J. O.; FINDLATER, L.; GERGLE, D.; HIGGINS, J. J. "The Aligned Rank Transform for Nonparametric Factorial Analyses Using Only ANOVA Procedures." *In Proceedings of the ACM Conference on Human Factors in Computing Systems (CHI '11)*. ACM Press: New York, 2011. p.143–146.

WU, Y.; YUAN, J.; RAZA, W.; SHEN, Q.; HUANG, Q. Biocontrol traits and antagonistic potential of *Bacillus amyloliquefaciens* strain NJZJSB3 against *Sclerotinia sclerotiorum*, a causal agent of canola stem rot. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.24, n.10, p.1327-1336, 2014.

XIE, Y.; WU, L.; ZHU, B.; WU, H.; GU, Q.; RAJER, F. U.; GAO, X. Digital gene expression profiling of the pathogen-resistance mechanism of *Oryza sativa* 9311 in response to *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 induction. **Biological Control**, v.110, p.89-97, 2017.

YANG, J-H.; ZHANG, W-W.; XIAO T. Biocontrol activities of bacteria from cowdung against the rice sheath blight pathogen. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v.124, n. 2, p.131-141, 2017.

YANG, L. HAN, X.; ZHANG, F.; GOODWIN, P. H.; YANG, Y.; LI, J.; XIA, M.; SUN, R.; JIA, B.; ZHANG, J.; QUAN, X.; WU, C.; XUE, B.; LU, C. Screening *Bacillus* species as biological control agentes of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* on wheat. **Biological Control**, v.118, p.1-9, 2018.

YU, YI-YANG.; JIANG, CHUN-HAO.; WANG, C.; CHEN, LIU-JUN.; LI, HONG-YANG.; XU, Q.; GOU, JIAN-HUA. An improved strategy for stable biocontrol agentes selecting to control rice sheath blight caused by *Rhizoctonia solani*. **Microbiological Research**, v.203, p.1-9, 2017.

ZHAO, X.; HAN, Y.; TAN, X. Q.; WANG, J.; ZHOU, Z. J. Optimization of antifungal lipopeptide production from *Bacillus* sp. BH072 by response surface methodology. **Journal of Microbiology**, v.52, p.324-332, 2014.