

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
CAMPUS ITAQUI
CURSO DE GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**RIZOBACTÉRIAS NO CONTROLE *in vitro* DE
*Pyricularia grisea***

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Bruna Canabarro Pozzebon

**Itaqui, RS, Brasil
2012**

BRUNA CANABARRO POZZEBON

RIZOBACTÉRIAS NO CONTROLE *in vitro* DE *Pyricularia grisea*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Agronomia da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), como requisito parcial para obtenção do grau de **Engenheiro Agrônomo**.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Renata Silva Canuto de Pinho

Itaqui, RS, Brasil
2012

POZZEBON, Bruna Canabarro.

Rizobactérias no controle *in vitro* de *Pyricularia grisea* / Bruna Canabarro Pozzebon. 24 de julho de 2012.

36 folhas

Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Agronomia)

Universidade Federal do Pampa, 24 de julho de 2012.

Orientação: Prof^a. Dr^a. Renata Silva Canuto de Pinho.

1. Controle biológico. 2. *Oryza sativa*. 3. Brusone. I. PINHO, Renata Silva Canuto de. II. Rizobactérias no controle *in vitro* de *Pyricularia grisea*.

BRUNA CANABARRO POZZEBON

RIZOBACTÉRIAS NO CONTROLE *in vitro* DE *Pyricularia grisea*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Agronomia da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), como requisito parcial para obtenção do grau de **Engenheiro Agrônomo**.

Trabalho de conclusão de curso defendido e aprovado em: 24 de julho de 2012.
Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Renata Silva Canuto de Pinho
Orientadora
Curso de Agronomia - UNIPAMPA

Prof^a. Dr^a. Luciana Zago Ethur
Curso de Agronomia - UNIPAMPA

Prof^a. Dr^a. Adriana Pires Soares Bresolin
Curso de Agronomia - UNIPAMPA

Dedico este trabalho aos meus pais, Benjamin Francisco Pozzebon e Maria de Lourdes Canabarro Pozzebon, minha base, porto seguro, fonte de carinho, amor e dedicação, comigo em todos os momentos, e à minha irmã, Priscila Canabarro Pozzebon pelo apoio e cumplicidade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me guiar e não me deixar desistir nos momentos mais difíceis, e por permitir a realização de mais um sonho.

À minha família, especialmente meus pais, Benjamin Francisco Pozzebon e Maria de Lourdes Canabarro Pozzebon, e à minha irmã, Priscila Canabarro Pozzebon, que me deram suporte nos caminhos que eu decidi seguir, acreditando sempre no meu sucesso e apoiando em todos os momentos.

À Prof^a. Dr^a. Renata Silva Canuto de Pinho, que além de orientadora, foi uma amiga, uma mãe! Obrigada Renata, pela orientação, apoio, amizade, estímulo, dedicação, paciência, preocupação e disposição dispensadas a mim.

A Prof^a. Dr^a. Luciana Zago Ethur, minha tutora no Programa de Educação Tutorial – PET Agronomia. Pessoa amiga e de uma honestidade admirável, com quem iniciei na pesquisa na Unipampa e com quem sempre pude contar nos momentos que precisei de alguém para conversar.

Aos Profs. Drs. Larissa Canhadas Bertan e Odair José Kuhn, pela amizade, carinho, horas de conversa e choro. Pelos momentos que pararam tudo o que estavam fazendo para me ouvir e me dizer uma palavra de amizade. Agradeço por sempre acreditarem e torcerem por mim. São dois anjos que Deus colocou no meu caminho.

Aos professores, minha gratidão pelos ensinamentos passados, pela disponibilidade de tempo quando necessário e pela forma de conduzir o curso em todas as etapas.

Aos meus colegas, pela convivência e amizade criada durante o correr dos semestres letivos.

Aos meus amigos, que estiveram comigo e que torceram por mim nesta caminhada, em especial aos eternos André Ricardo Zeist, Carine Rey, Keilor da Rosa Dorneles, Marlon Ouriques Bastiani e Priscila Vogelei Ramos.

À equipe de pesquisa em Fitopatologia, Amanda dos Santos Hajar, Caroline Calvano Aguirre, Juliana Silva, Ketlen Rey, Rangel Behling, Rosana Taschetto Vey, Trajano Zubiaurre Pereira, pelo auxílio na execução deste projeto.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta pesquisa e conclusão deste sonho.

Se você souber olhar as coisas de um
jeito mágico, tudo fica mais bonito.

Caio F. Abreu

RESUMO

RIZOBACTÉRIAS NO CONTROLE *in vitro* DE *Pyricularia grisea*

Autor: Bruna Canabarro Pozzebon

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Renata Silva Canuto de Pinho

Local e data: Itaqui, 24 de julho de 2012.

O arroz é o segundo cereal mais cultivado no mundo e a brusone, causada por *Pyricularia grisea* é a principal doença desta cultura, causando perdas de até 100% na produção. O uso de rizobactérias tem demonstrado grande potencial no controle de fitopatógenos, sendo uma alternativa ecológica para a redução do uso de agrotóxicos na lavoura arrozeira. Com este trabalho, objetivou-se obter diferentes isolados rizobacterianos provenientes de plantas de arroz e avaliá-los *in vitro* quanto sua capacidade antagônica ao fungo *P. grisea*. Os testes foram realizados no Laboratório de Microbiologia do Solo e Fitopatologia da Universidade Federal do Pampa – Campus Itaqui. O isolamento das rizobactérias foi feito a partir de raízes de plantas de arroz, retiradas aleatoriamente de seis pontos distintos, provenientes de três lavouras de arroz irrigado dos municípios de Itaqui e Maçambará. Os isolados que apresentaram forma e coloração diferentes foram repicados para tubos de ensaio visando obter isolados puros. A partir dos isolados obtidos foi realizado um teste *in vitro* para avaliar o índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) e a % de inibição de crescimento micelial. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições para cada tratamento. Cada isolado rizobacteriano foi repicado nos quatro extremos da placa de Petri, exceto no tratamento testemunha, e um disco com 0,5 cm de micélio do fungo foi colocado no centro de todas as placas. Para avaliação do antagonismo rizobacteriano, foram realizadas medições diárias do patógeno, até a testemunha atingir a borda da placa. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias de cada tratamento, agrupadas pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade. Foram obtidos 39 isolados rizobacterianos de plantas de arroz, onde 89,7% apresentaram algum grau de controle quanto ao IVCM, quando comparados com o tratamento testemunha e 94,9% apresentaram antagonismo à *P. grisea* quando avaliado o percentual de inibição de crescimento micelial. A rizobactéria BAC5 foi a

mais eficiente, apresentando 73,1% de inibição do crescimento micelial de *P. grisea*. Foram obtidas rizobactérias da rizosfera de plantas de arroz que podem atuar como antagonistas ao patógeno *Pyricularia grisea*, onde o isolado BAC5 é o mais eficiente entre os isolados rizobacterianos testados.

Palavras-chave: Controle biológico; *Oryza sativa*; Brusone.

ABSTRACT

RHIZOBACTERIA *in vitro* IN THE CONTROL OF *Pyricularia grisea*

Author: Bruna Canabarro Pozzebon

Advisor: Prof^a. Dr^a. Renata Silva Canuto de Pinho

Date: Itaqui, July 24, 2012.

Rice is the second most cultivated cereal in the world and the blast caused by *Pyricularia grisea* is a major disease of this crop, causing losses of up to 100% in production. The use of rhizobacteria has shown great potential to pathogens control, and an environmentally friendly alternative to the reduction of pesticide use in rice crops. This work aimed to obtain different rizobacterianos isolated from rice and soybeans plants and evaluate them *in vitro* for their antagonistic ability against fungus *P. grisea*. The tests were performed at the Laboratory of Soil Microbiology and Plant Pathology, Federal University of Pampa - Campus Itaqui. Isolation of rhizobacteria was made from roots of rice plants, taken at random from six different points from three crops of rice of the municipalities of Itaqui and Maçambará. The isolates with different shape and color were transferred to test tubes to obtain pure isolates. The isolates obtained was performed to evaluate the *in vitro* Mycelial Growth Speed Index (MGSI) and % inhibition of mycelial growth. The experimental design was completely randomized with four replications for each treatment. Each was isolated rizobacteriano peaked in the four ends of the petri dish, except the control treatment, and a disc with 0.5 cm of mycelium of the fungus was placed in the center of all cards. For evaluation of antagonistic rizobacteriano, measurements were made daily of the pathogen to the control reaches the edge of the plate. The data were subjected to analysis of variance and the means of each treatment, grouped by Scott-Knott test, at 5% probability. Rizobacterianos 39 isolates were obtained from rice and soybeans, where 89,7% had some degree of control as to MGSI compared with the control treatment and 94,9% showed antagonistic to *P. grisea* when evaluated the percentage inhibition of mycelial growth. The rhizobacterium BAC5 was the most effective, with 73,1% inhibition of mycelial growth of *P. grisea*. Rhizobacteria were obtained from the rhizosphere of rice plants that can act as

antagonists to the pathogen *Pyricularia grisea*, where the isolated BAC5 is the most efficient among the isolates tested rizobacterianos.

Keywords: Biological control; *Oryza sativa*; Rice Blast

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Amostra de solo e raiz (A); Pesagem de 10 g de amostra de raiz e solo (B); Agitação das amostras em agitador orbital para liberação das rizobactérias presentes nas raízes (C).....	23
FIGURA 2: Diluição em série (A); Alíquotas de 0,1 mL retiradas dos tubos de ensaio e colocadas em placas de Petri contendo meio de cultura MB1 (B); Distribuição da solução sobre o meio de cultura com alça de Drigalski (C).....	24
FIGURA 3: Repicagem das colônias de rizobactérias das placas de Petri para tubos de ensaio contendo meio de cultura MB1.....	25
FIGURA 4: Repicagem de <i>P. grisea</i> para o centro das placas de Petri (A); Repicagem das rizobactérias para os quatro extremos da placa de Petri com meio de cultura BDA (B).....	26
FIGURA 5: Antagonismo <i>in vitro</i> do isolado rizobacteriano BAC5 ao desenvolvimento micelial de <i>P. grisea</i> , comparado à testemunha.....	31
FIGURA 6: Ineficiência do isolado rizobacteriano BAC1 no controle de <i>P. grisea</i> , quando comparado à testemunha.....	31

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Isolados rizobacterianos obtidos da rizosfera de plantas de arroz dos seis pontos selecionados entre os municípios de Itaqui/RS e Maçambará/RS.....	28
TABELA 2: Efeito de rizobactérias de plantas de arroz no índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) e % de inibição de crescimento micelial de <i>Pyricularia grisea</i>	29

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 A cultura do arroz.....	17
2.2 A brusone – <i>Magnaporthe grisea</i> (<i>Pyricularia grisea</i> ou <i>Pyricularia oryzae</i>).....	18
2.3 O uso de rizobactérias no controle de doenças.....	20
3 MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1 Isolamento de rizobactérias presentes na rizosfera das plantas de arroz.....	23
3.2 Teste <i>in vitro</i> para avaliar o antagonismo das rizobactérias à <i>Pyricularia grisea</i>	25
3.3 Análise estatística.....	27
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
5 CONCLUSÃO	32
6 REFERÊNCIAS.....	33

1. INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é um dos alimentos mais importantes na nutrição humana, sendo a cultura com maior potencial de aumento de produção e o segundo cereal mais cultivado no mundo, com área em torno de 158 milhões de hectares. O Rio Grande do Sul se destaca como maior produtor nacional, responsável por cerca de 61% do total produzido no país. Entretanto, doenças causadas por fitopatógenos são alguns dos fatores limitantes para a expressão do potencial produtivo desta cultura (SOSBAI, 2010).

De acordo com Grohs et al. (2010), os maiores prejuízos costumam ocorrer nos períodos de florescimento e enchimento de grãos, momentos nos quais são definidos o número de espiguetas férteis por panículas, peso de grãos e percentual de grãos inteiros.

A brusone, causada pelo patógeno *Pyricularia grisea*, provoca danos de até 100% de perdas na produção da lavoura, sendo considerada a principal doença da cultura do arroz irrigado (GROHS et al., 2010). Embora afete toda a parte aérea da planta, as fases mais críticas são as que ocorrem nas folhas entre o 25º e o 35º dia após o plantio, e também a chamada brusone nas panículas, que costuma ocorrer nas fases de grão leitoso a pastoso (SILVA; PRABHU; FILIPPI, 2007).

Dias Neto et al. (2010), relatam em seu trabalho que o patógeno possui uma ampla gama de hospedeiros, capaz de causar doenças em mais de 50 espécies de gramíneas, sendo o arroz, o trigo, o triticale, o milho e a cevada, as culturas que mais sofrem quedas significativas de produtividade devido ao seu ataque. Dentre essas espécies, o arroz é considerado o hospedeiro mais importante, em função da sua ampla distribuição geográfica, fazendo da brusone uma doença de ocorrência generalizada nesta cultura em praticamente todas as regiões produtoras.

O controle biológico por micro-organismos apresenta-se como alternativa para a redução ou eliminação do uso de agrotóxicos no controle de fitopatógenos. A diversidade de micro-organismos, bem como suas relações antagônicas são ferramentas importantes para este método de controle. Dentre os agentes de controle biológico destacam-se as rizobactérias, que têm demonstrado grande potencial no controle de fitopatógenos, além de proporcionar promoção de crescimento a plantas de diversas espécies (FILIPPI et al., 2011; ABO-ELYOUR et

al., 2010; SOUZA JÚNIOR et al., 2010; LUCAS et al., 2009; HARTHMANN et al., 2009).

As rizobactérias benéficas às plantas por promoverem seu crescimento e/ou atuarem no controle biológico de fitopatógenos são chamadas de bactérias promotoras de crescimento de plantas ou PGPR, abreviatura de seu nome em inglês *Plant Growth -Promoting Rhizobacteria* (KLOEPPER; SCHROTH, 1981). As PGPR aumentam a disponibilidade de nutrientes para a planta e podem produzir combinações e concentrações de substâncias promotoras de crescimento. Entretanto, o maior efeito destas rizobactérias é o de suprimir patógenos de plantas e rizobactérias deletérias ao crescimento de plantas. (LEONG, 1986; SCHIPPERS et al., 1987).

Um dos primeiros passos para utilização de qualquer organismo no controle biológico é a obtenção de um grande número de isolados e a seleção *in vitro*. Com este trabalho, objetivou-se obter diferentes isolados rizobacterianos provenientes de plantas de arroz e avaliá-los *in vitro* quanto sua capacidade antagônica ao fungo *Pyricularia grisea*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A cultura do arroz

O arroz (*Oryza sativa* L.) é uma gramínea originária da Ásia Meridional. É uma planta hidrófila, pertencente à família Poaceae, gênero *Oryza* que é constituído por sete espécies, sendo a mais conhecida e cultivada a *O. sativa* (DIAS NETO, 2008).

De acordo com dados da SOSBAI (2010), o arroz é o segundo cereal mais cultivado no mundo, sendo a base alimentar de mais de três bilhões de pessoas, onde o consumo médio mundial gira em torno de 60 kg/pessoa/ano. É considerada a cultura alimentícia de maior importância econômica para vários países em desenvolvimento, haja vista que fornece 27% da dieta calórica e 20% da proteína consumida no mundo (SCIVITTARO; GOMES, 2007).

Segundo a SOSBAI (2010), os dez países maiores produtores de arroz são, em ordem decrescente: China, Índia, Indonésia, Bangladesh, Vietnã, Tailândia, Myanmar, Filipinas, Brasil e Japão. No Brasil, os principais estados produtores de arroz são o Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Mato Grosso, Maranhão e Pará. A Ásia é o maior país consumidor em nível mundial (88,95%), seguida das Américas (4,94%), África (4,91%), Europa (1,03%) e Oceania (0,16%) (UTUMI, 2008).

De acordo com a CONAB (2012), a área cultivada com arroz na safra 2011/12 ficou em torno de 2.470,8 hectares, 12,4% menor que a área da safra anterior. Esta redução ocorreu principalmente em função da dificuldade de comercialização, preços pouco atrativos, aumento nos custos de produção e falta de água para irrigação da lavoura nos reservatórios. O 1,35 milhão de hectares cultivados com arroz irrigado representam 54,76% do total da área cultivada. A produtividade média ficou em torno de 6.954 kg/ha, enquanto a produção alcançou aproximadamente 11,8 milhões de toneladas.

Na Fronteira Oeste do Rio Grande do Sul, a redução de área cultivada foi de 10% e na depressão central, chegou a 25% menos quando comparado com a área plantada na safra anterior (CONAB, 2012).

O processo evolutivo do arroz levou o mesmo a se adaptar às mais variadas condições ambientais, sendo considerados dois grandes ecossistemas para o seu cultivo: o ecossistema *várzeas*, irrigado por inundação controlada, e o ecossistema

terras altas, englobando o cultivo sem irrigação e o com irrigação suplementar por aspersão (SANTOS; STONE; VIEIRA, 2006).

Segundo Rotili et al. (2010), no Brasil, a maior parcela da produção de arroz é proveniente do ecossistema várzeas, sendo a orizicultura irrigada responsável por 69% da produção nacional. Este cultivo exige o controle de lâmina de água pelo agricultor, colocando e retirando água da lavoura quando é conveniente ao cultivo e pode também ser utilizado em lavouras onde um nivelamento inadequado impede o manejo eficiente do sistema. Já no ecossistema terras altas, o arroz pode ser cultivado com irrigação suplementar por aspersão ou sem irrigação, onde a disponibilidade de água para a cultura é totalmente dependente da precipitação pluvial (SANTOS; STONE; VIEIRA, 2006).

A SOSBAI (2010) define que o sucesso de uma lavoura de arroz depende de um bom planejamento, organização, direção e controle da condução da atividade, que são as funções básicas da administração da atividade agrícola.

2.2 A brusone – *Magnaporthe grisea* (*Pyricularia grisea* ou *Pyricularia oryzae*)

Dentre os principais fatores limitantes da expressão do potencial produtivo na cultura do arroz irrigado no Rio Grande do Sul, estão as doenças causadas por fitopatógenos como fungos, bactérias, vírus e nematoides, onde a incidência das doenças e a severidade das mesmas, dependem da ocorrência do patógeno, do ambiente favorável e da suscetibilidade das cultivares (SOSBAI 2010).

Segundo Bedendo e Prabhu (2005), a brusone é considerada a principal doença do arroz no Brasil e em diversas partes do mundo. Os primeiros registros desta doença datam de 1637, na China e no Japão, onde era inicialmente chamada de febre do arroz. Em inglês é denominada “rice blast”, em função da severidade da queima das folhas. A primeira constatação da doença no Brasil foi feita por Avena-Sacca em 1912 no estado de São Paulo, sendo que atualmente está amplamente distribuída pelo território brasileiro, desde o Rio Grande do Sul até o Amazonas.

O agente causal da brusone é o fungo *Magnaporthe grisea* (Barr) (teleomorfo), anamorfo *Pyricularia grisea* (ou *P. oryzae*). Originalmente *P. oryzae* foi descrito na Itália como uma nova espécie, por Cavara em 1891, contudo, ambas as espécies (*P. grisea* e *P. oryzae*) possuem o mesmo estágio perfeito (*M. grisea*) e não existe uma base morfológica para separar as duas (BEDENDO; PRABHU, 2005).

A fase perfeita pertence à classe Ascomycetes, ordem Diaporthales e família Physosporielleaceae. Os conídios são piriformes, obclavados, com base circular e ápice fino, levemente escuros e hialinos, medindo de 17-23 µm por 8-11 µm. Os esporos apresentam dois septos, os conidióforos são longos, septados, simples ou em pequenos feixes e o conídio geralmente germina a partir da célula apical ou basal. A temperatura ideal para o crescimento e esporulação em meio de cultura fica na faixa dos 28 °C. Em relação à germinação, temperaturas entre 25 °C e 28 °C favorecem o processo (BEDENDO; PRABHU, 2005).

Já o anamorfo pertence à classe dos fungos Mitospóricos, subclasse Hyphomycetidae, ordem Moniliales e família Moniliaceae. Geralmente, os fungos anamorfos causam sérios problemas com o ataque às folhas, pois causam necroses e murchas, o que acarreta na redução do desenvolvimento e leva às plantas à morte. Estes fungos, que podem ser chamados de anamorfos ou conidiais, são organismos que apresentam formas filamentosas, com estruturas de reprodução assexuadas representadas pelos conidióforos, pelas células conidiogênicas e conídios, e por estruturas somáticas tipo apressório (DIAS NETO, 2008).

O patógeno *P. grisea* possui um grande número de hospedeiros, podendo causar doença em mais de 50 espécies de gramíneas, entre elas, arroz (*O. sativa*), trigo (*Triticum aestivum*), aveia (*Avena* sp.), azevém (*Lolium multiflorum*), cevada (*Hordeum vulgare*), milheto (*Pennisetum* sp.), entre outros. Dentre estas, o arroz se destaca como o mais importante e mais afetado devido à sua ampla distribuição geográfica (DIAS NETO et al., 2010).

As infestações são dependentes principalmente das condições climáticas, práticas de manejo da cultura como entrada de nitrogênio ou irrigação, e susceptibilidade das cultivares. O potencial destrutivo desta doença é tão grande, que as lavouras de arroz que apresentam incidência acima de 30%, geralmente são abandonadas, devido à perda de potenciais benefícios em relação aos danos econômicos causados (LUCAS et al., 2009).

Em cada infestação, o ciclo do fungo inicia com a esporulação procedente de um inóculo presente em restos de culturas, sementes ou até mesmo plantas hospedeiras. Depois da germinação dos esporos, ocorre a infecção. Após o início da infecção, ocorre o período de incubação, e subsequente a este período, o fungo origina as lesões sobre as folhas ou outras partes da planta. Nas folhas, as lesões são geralmente fusiformes, de cor verde-azulada ou castanho-acinzentada.

Posteriormente estas lesões adquirem uma coloração cinzenta-esverdeada ou cinzenta-esbranquiçada, com as margens castanhas. Nas bainhas podem surgir lesões semelhantes as da folha, porém mais largas e com margens indefinidas. Na região dos nós e colmos, é possível detectar manchas úmidas que escurecem do castanho ao negro, podendo os colmos quebrar nas regiões onde existem necroses. No colo da panícula, as manchas de coloração castanha envolvem o último nó, em forma de anel e prolongam-se pelo ráquis, suas ramificações e pedicelos da espiguetas. Devido as lesões ao nível do colo, o ráquis quebra e a panícula fica pendente. Em ataques muito severos da doença, as panículas já emergem infectadas, tornando-se brancas antes da maturação (BARROS-GOMES; ROCHA, 2006).

A estimativa de danos causados pela brusone não é de fácil determinação devido aos efeitos diretos e indiretos causados pela infecção nas panículas e nas folhas. São relatadas perdas que variam de 10 – 80% da média da produção de algumas lavouras no Rio Grande do Sul (SANTOS; STONE; VIEIRA, 2006).

Atualmente a busca por uma agricultura ecologicamente sustentável faz com que os agricultores busquem outros métodos de controle que não se limite apenas ao uso de fungicidas (FILIPPI et al., 2011), sendo o controle biológico através da utilização de rizobactérias promotoras de crescimento, uma alternativa para a redução do uso de insumos químicos na lavoura arroseira, acarretando na redução do impacto ambiental.

2.3 Uso de rizobactérias no controle de doenças

A crescente preocupação da sociedade com o impacto da agricultura no ambiente e a contaminação da cadeia alimentar com agrotóxicos está alterando o cenário agrícola, fazendo com que cada vez mais o mercado exija alimentos produzidos sem o uso, ou com selo de uso adequado de agrotóxicos. Dentre as alternativas para a redução deste uso excessivo de agrotóxicos, o controle biológico é um dos mais discutidos, podendo aproveitar o controle biológico natural ou a introdução de um agente de controle biológico à cultura em questão (BETTIOL; MORANDI, 2009).

A introdução de bactérias benéficas visando aumentar a produtividade de culturas é uma atividade praticada há séculos. No decorrer dos anos, pesquisas vêm sendo realizadas com enfoque nesta ideia. Dentre as bactérias benéficas destacam-

se as rizobactérias que têm demonstrado grande potencial no controle de fitopatógenos (ROMEIRO, 2007).

As rizobactérias além de suprimir doenças de plantas causadas por fungos ou outros fitopatógenos, também podem ser promotoras de crescimento de plantas, quando passam a ser denominadas Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas (PGPR), e a sua aplicação em solos agricultáveis tem benefícios diretos e indiretos para a produção agrícola e o uso criterioso de insumos (FILIPPI et al., 2011).

Segundo Lucas et al. (2009), os mecanismos diretos estão relacionados com o metabolismo da planta, com o equilíbrio hormonal e com a capacidade da planta alterar ou induzir resposta de defesa sistêmica, enquanto os mecanismos indiretos envolvem a melhoria da disponibilidade de nutrientes ou impedem o crescimento de micro-organismos patogênicos.

As rizobactérias existem em grande quantidade na rizosfera, rizoplano e até nos espaços intracelulares das camadas superficiais das raízes, onde se nutrem de exsudatos e lisados liberados por plantas, bem como fazem da rizosfera, nichos ecológicos, utilizados como abrigo e proteção do antagonismo da microbiota circundante (ROMEIRO, 2007).

Vários trabalhos relatam o potencial de rizobactérias no controle de doenças de plantas. Por exemplo, Ludwig e Moura (2007), citam rizobactérias como *Bacillus* sp. e *Pseudomonas* sp., para o controle da brusone (causada por *Pyricularia grisea* Sacc), queima-das-bainhas (causada por *Rhizoctonia solani* J.G. Kühn) e galhas (causada por *Meloidogyne graminicola* Golden e Birchfeld Mew), sendo aplicados principalmente por microbiolização das sementes.

Souza Júnior et al. (2010), testaram combinações de rizobactérias para o controle da queima-das-bainhas (*Rhizoctonia solani*) e meloidoginose (*Meloidogyne graminicola*). Os autores verificaram que as combinações DFs185/418, DFs306/416, DFs306/418, DFs416/418, DFs185/306/418 e o isolado DFs306 reduziram a reprodução de *M. graminicola* e promoveram o crescimento de plantas. Já a combinação DFs185/306 apresentou os melhores resultados quando avaliado o controle de *R. solani*, e a combinação DFs306/416 foi a que promoveu melhor controle das duas doenças.

Alves et al. (2011) testaram o efeito *in vitro* de 20 isolados rizobacterianos sobre *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* e *Pratylenchus zaei*, e destacam que este

teste demonstra os efeitos dos metabólitos que são produzidos e liberados pelas rizobactérias sobre a eclosão e a motilidade de juvenis de segundo estágio de *M. javanica* e sobre a motilidade de *Pratylenchus zaeae*, já para *M. incognita*, os isolados não tiveram efeito algum. Cipriano (2009) relata ainda que os resultados obtidos *in vitro* demonstram um possível antagonismo devido à produção de sideróforos e substâncias tóxicas.

Alguns estudos têm demonstrado o potencial de rizobactérias no controle da brusone em arroz. Lucas et al. (2009) testaram duas PGPRs (*Pseudomonas fluorescens* Aur 6 e *Chryseobacterium balustinum* Aur 9) sozinhas ou combinadas e observaram proteção de até 50% em panículas, com o isolado Aur 9, em condições de campo no Sul da Espanha. Quando as bactérias foram aplicadas nas sementes, a severidade da doença diminuiu em até 50%, sugerindo indução de resistência sistêmica.

Em estudos realizados no Brasil, em arroz de terras altas, Filippi et al. (2011) observaram o efeito de rizobactérias na promoção de crescimento de plantas de arroz e indução de resistência de plantas à brusone. Foram encontraram dois isolados rizobacterianos, Rizo-55 e Rizo-46, que promoveram simultaneamente a promoção de crescimento e redução da severidade da brusone.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos desenvolvidos neste trabalho foram realizados no Laboratório de Microbiologia do Solo e Fitopatologia da Universidade Federal do Pampa – UNIPAMPA/Campus Itaqui.

O isolado de *Pyricularia grisea* utilizado foi doado pelo Instituto Rio-grandense de Arroz (IRGA).

3.1 Isolamento de rizobactérias presentes na rizosfera das plantas de arroz

O isolamento das rizobactérias foi realizado de acordo com o método Oostendorp e Sikora (1989), com algumas adaptações. Foram utilizadas raízes de plantas de arroz, retiradas aleatoriamente de seis pontos distintos, provenientes de três lavouras de arroz irrigado dos municípios de Itaqui/RS (pontos 3, 4, 5 e 6) e Maçambará/RS (pontos 1 e 2). A parte aérea de todas as plantas foi descartada, restando apenas o sistema radicular, coberto com solo. As raízes das plantas foram ligeiramente separadas do solo e cortadas em pequenos fragmentos, visando remover o excesso de solo (Figura 1 A).

Foram pesados 10 g de amostra contendo raízes e solo de cada ponto (Figura 1 B). Este material foi colocado em erlemeyer contendo 100 mL de solução salina de NaCl a 0,1 M e posteriormente, procedeu-se à agitação por 30 minutos em agitador orbital (Figura 1 C) para facilitar a liberação das bactérias presentes na rizosfera das plantas coletadas.



FIGURA 1 - Amostra de solo e raiz (A); Pesagem de 10 g de amostra de raiz e solo (B); Agitação das amostras em agitador orbital para liberação das rizobactérias presentes nas raízes (C).

Transcorridos os 30 minutos de agitação, foi realizada a diluição em série de cada amostra, em solução salina de NaCl 0,1 M, com fator de diluição de 1:10 até 10^{-4} . Foram retiradas alíquotas de 0,1 mL dos tubos de ensaio contendo as diluições 10^{-3} e 10^{-4} (Figura 2 A), que foram distribuídas e espalhadas com alça de Drigalski em placas de Petri contendo meio de cultura MB1 de Kado e Heskett (1970), composto por:

Sacarose	10,0 g
Caseína ácida hidrolisada	8,0 g
Extrato de levedura	4,0 g
K_2HPO_4 (anidro)	2,0 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,3 g
Ágar	5,0 g
Água destilada	1000 mL

Em seguida, as placas foram incubadas em BOD a 28 °C, durante 24 h, para crescimento das colônias de rizobactérias (Figura 2 B e C). Foi escolhida a temperatura de 28 °C, por ser esta a temperatura ótima para desenvolvimento e crescimento das colônias rizobacterianas.

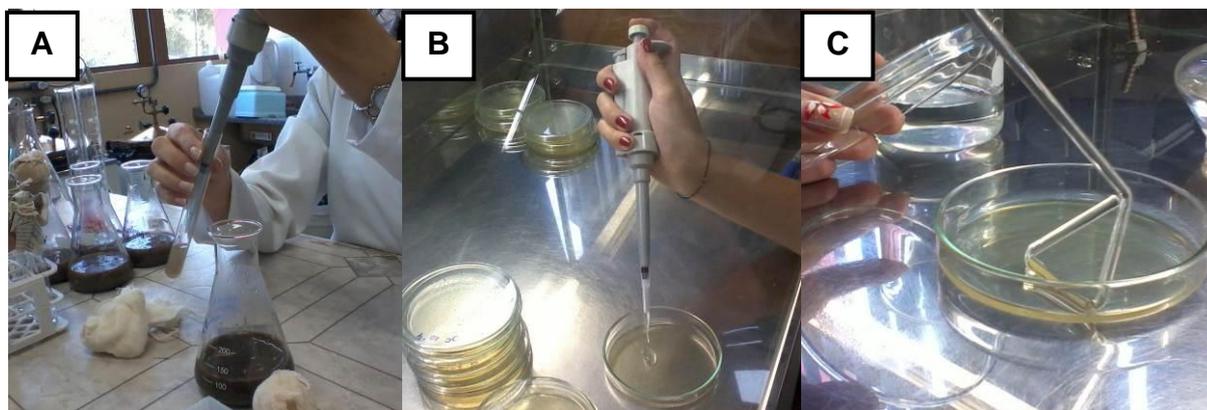


FIGURA 2 - Diluição em série (A); Alíquotas de 0,1 mL retiradas dos tubos de ensaio e colocadas em placas de Petri contendo meio de cultura MB1 (B); Distribuição da solução sobre o meio de cultura com alça de Drigalski (C).

Transcorridas as 24 h de incubação, as colônias de bactérias que se apresentaram com forma e coloração diferente em cada placa de Petri foram

repicadas para tubos de ensaio, também com o meio de cultura MB1, com o objetivo de obter isolados puros (Figura 3).



FIGURA 3 - Repicagem das colônias de rizobactérias das placas de Petri para tubos de ensaio contendo meio de cultura MB1.

3.2 Teste *in vitro* para avaliar o antagonismo das rizobactérias à *Pyricularia grisea*

Foram testados 39 isolados rizobacterianos, onde cada isolado foi comparado com o tratamento testemunha, que continha na placa de Petri apenas o patógeno *P. grisea*. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições.

Antes da montagem do teste *in vitro*, foram repicadas novamente as colônias de rizobactérias presentes nos tubos de ensaio, para placas de Petri com meio de cultura MB1, para obter isolados com menor tempo de armazenamento. Essas

placas foram incubadas em BOD a 28 °C, por 24 h, para crescimento das colônias rizobacterianas.

Para a organização do teste, foi transferido um disco de 0,5 cm de diâmetro de micélio de *P. grisea*, previamente desenvolvido em meio de cultura BDA, para o centro de todas as placas de Petri, contendo também meio de cultura BDA (Figura 4 A).

Cada isolado rizobacteriano foi repicado nos quatro extremos da placa de Petri, formando um quadrado em torno do disco de micélio de *P. grisea* (Figura 4 B). Após o plaqueamento, as placas foram incubadas em BOD a temperatura de 25 °C, temperatura considerada ideal para o desenvolvimento para o fungo *P. grisea*, com fotoperíodo de 12 h (FILLIPI et al., 2011).

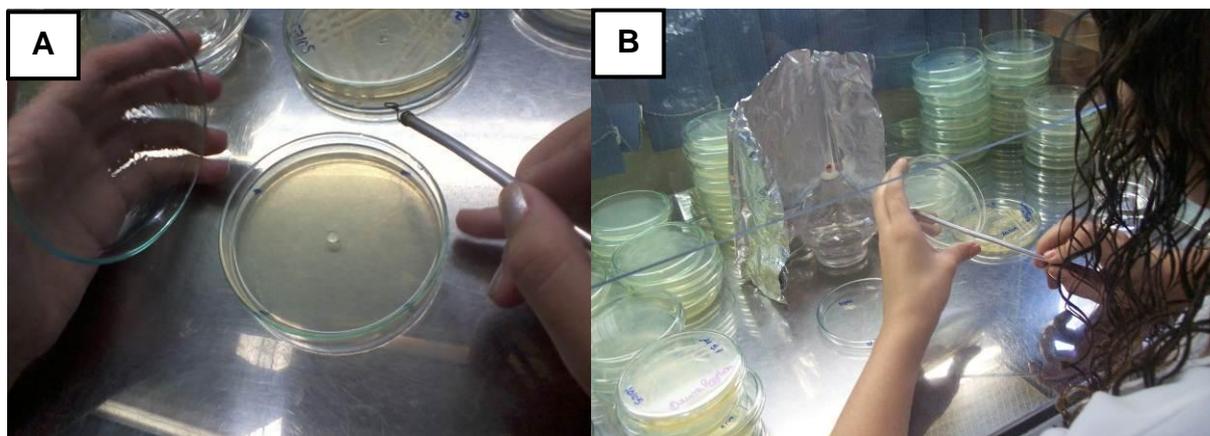


FIGURA 4 – Repicagem de *P. grisea* para o centro das placas de Petri (A); Repicagem das rizobactérias para os quatro extremos da placa de Petri com meio de cultura BDA (B).

Foi avaliado o índice de velocidade de crescimento micelial e a % de inibição de crescimento micelial de *P. grisea*. Foram realizadas medições do diâmetro da colônia do patógeno com régua, a cada 24 horas, em posição vertical e horizontal, sendo a última medição efetuada no dia que a testemunha registrou o máximo de crescimento, ou seja, alcançando a borda da placa de Petri (FILIPPI, et al., 2011). Esses dados foram utilizados no cálculo do índice de velocidade de crescimento micelial (OLIVEIRA, 1991) e no cálculo da % de inibição de crescimento micelial.

A fórmula para o cálculo do Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM) é dada por:

$$IVCM = \sum (D-Da)/N$$

Sendo:

IVCM = índice de velocidade de crescimento micelial

D = diâmetro médio atual da colônia

Da = diâmetro médio da colônia do dia anterior

N = número de dias após a inoculação

A fórmula para o cálculo do % de Inibição de Crescimento Micelial é dada por:

$$\% \text{ inibição} = 100 - (CM \times 100/T)$$

Sendo:

% inibição = % de inibição de crescimento micelial

CM = diâmetro da colônia

T = diâmetro da colônia da testemunha

3.3 Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias de cada tratamento foram agrupadas pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos seis pontos selecionados, foram isoladas 39 rizobactérias (Tabela 1).

TABELA 1 – Isolados rizobacterianos obtidos da rizosfera de plantas de arroz dos seis pontos selecionados entre os municípios de Itaqui/RS e Maçambará/RS.

Município	Ponto de coleta	Isolado
Maçambará/RS	P1	BAC1; BAC2; BAC3; BAC4; BAC5; BAC6; BAC7; BAC8; BAC9
Maçambará/RS	P2	BAC10; BAC11; BAC12; BAC13; BAC14; BAC15; BAC16;
Itaqui/RS	P3	BAC17; BAC18; BAC19; BAC20; BAC21
Itaqui/RS	P4	BAC22; BAC23; BAC24; BAC25; BAC26; BAC27; BAC28; BAC29
Itaqui/RS	P5	BAC30; BAC31; BAC32; BAC33; BAC34
Itaqui/RS	P6	BAC35; BAC36; BAC37; BAC38; BAC39

Os isolados receberam a denominação BAC seguida de número na ordem crescente de 1 a 39.

Os isolados foram diferenciados pela aparência visual das colônias de bactérias, presentes nas placas de Petri com meio de cultura MB1, após 24 h de incubação, em BOD a 28 °C para o crescimento.

Os nove isolados do Ponto 1 e os sete isolados do Ponto 2 foram obtidos das plantas de arroz procedentes do município de Maçambará/RS. Nos Pontos 3, 4, 5 e 6 foram obtidos cinco, oito, cinco e seis isolados, respectivamente, de plantas de arroz do município de Itaqui/RS.

Em relação ao teste de antagonismo, dos 39 isolados rizobacterianos testados, 89,7% reduziram o índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) e 94,9% aumentaram a porcentagem de inibição micelial de *P. grisea* em relação à testemunha (Tabela 2).

TABELA 2 – Efeito de rizobactérias de plantas de arroz no índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) e % de inibição de crescimento micelial de *Pyricularia grisea*.

Tratamento	IVCM	% de inibição de crescimento micelial
BAC5	1,31 a	73,1 a
BAC24	1,38 a	64,3 b
BAC34	1,56 a	62,7 b
BAC6	1,84 b	57,2 c
BAC38	1,93 b	56,1 c
BAC31	2,07 b	54,1 c
BAC28	2,30 c	42,5 d
BAC36	2,30 c	42,5 d
BAC22	2,41 c	45,9 d
BAC32	2,41 c	48,0 d
BAC30	2,46 c	52,0 c
BAC4	2,48 c	38,6 d
BAC19	2,54 c	45,4 d
BAC29	2,59 c	47,0 d
BAC12	2,59 c	40,8 d
BAC33	2,59 c	41,9 d
BAC13	2,61 c	56,2 c
BAC8	2,61 c	42,4 d
BAC20	2,66 c	40,5 d
BAC26	2,66 c	32,6 e
BAC11	2,72 d	29,7 e
BAC25	2,74 d	41,8 d
BAC27	2,78 d	43,6 d
BAC2	2,81 d	34,7 e
BAC35	2,88 d	28,4 e
BAC15	2,89 d	30,6 e
BAC3	2,90 d	40,5 d
BAC23	2,93 d	37,4 d
BAC16	2,95 d	46,1 d
BAC21	2,98 d	37,9 d
BAC39	3,13 e	39,7 d
BAC9	3,19 e	35,7 e
BAC18	3,21 e	32,7 e
BAC37	3,31 e	39,3 d
BAC7	3,39 e	27,2 e

BAC17	3,95 f	11,8 f
BAC10	4,02 f	15,7 f
BAC14	4,25 f	0 g
Sem Bactéria	4,39 f	0,0 g
BAC1	4,43 f	0 g
CV (%) =	10,75	16,93

Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Dos 39 isolados rizobacterianos testados, oito apresentaram inibição acima de 50% do crescimento micelial de *P. grisea*. Desses oito isolados, dois são do P1 (BAC 5 e 6), um do P2 (BAC 13), um do P4 (BAC 24), três do P5 (BAC 30, 31 e 34) e um do P6 (BAC 38). Nenhum dos isolados do P2 se destacou quanto ao IVCM e porcentagem de inibição do crescimento micelial.

Quanto ao IVCM, os isolados BAC5 (Figura 5), BAC24 e BAC34 foram os que apresentaram os menores índices, não diferindo estatisticamente entre eles. No entanto, o isolado BAC5 foi o que causou a maior inibição do crescimento micelial do patógeno, podendo ser considerado como o mais eficiente de todos os isolados testados, sendo esse percentual de 73,1%. Os isolados BAC17, BAC10, BAC14 e BAC1 foram os que apresentaram os maiores índices de velocidade de crescimento micelial, da mesma forma que a BAC14 e BAC1 apresentaram nenhum percentual de inibição de crescimento micelial de *P. grisea*, podendo ser considerados resultados não satisfatórios para estes dois testes. Filippi et al. (2011) avaliando a supressão de *Magnaporthe oryzae in vitro* observaram que todos os isolados testados reduziram o crescimento do patógeno de 67% a 85%. Chaibub et al. (2011) também verificaram redução de crescimento de *M. oryzae* por rizobactérias. Dos 30 isolados testados todos reduziram o crescimento micelial com destaque para o isolado 9 com redução de 87,4%.

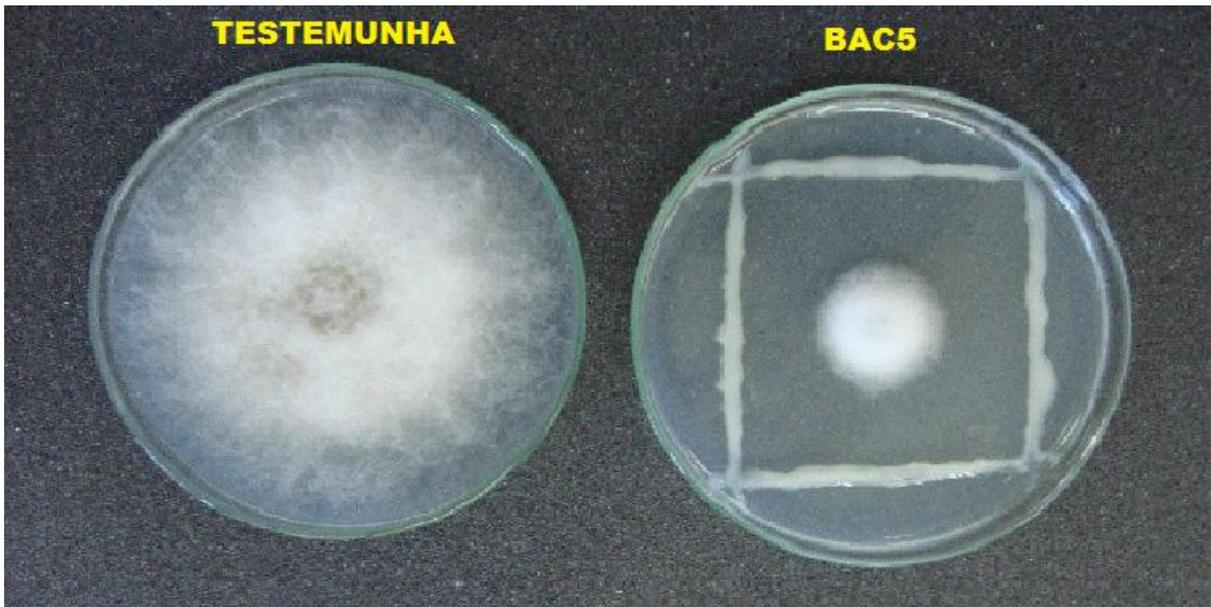


FIGURA 5 - Antagonismo *in vitro* do isolado rizobacteriano BAC5 ao desenvolvimento micelial de *P. grisea*, comparado à testemunha.

Os isolados BAC1 e BAC14 não diferiram da testemunha em relação à porcentagem de inibição de crescimento micelial (Figura 6), da mesma forma que os isolados BAC17, BAC10, BAC14 e BAC1 também não diferiram da testemunha, quando avaliado o IVCM.



FIGURA 6 – Ineficiência do isolado rizobacteriano BAC1 no controle de *P. grisea*, comparado à testemunha.

5 CONCLUSÃO

Foram obtidas rizobactérias da rizosfera de plantas de arroz que podem atuar como antagonistas ao patógeno *Pyricularia grisea*.

O isolado BAC5 é o mais eficiente entre os isolados rizobacterianos testados.

6 REFERÊNCIAS

ABO-ELYOURS, K. A.; KHAN, Z.; AWARD, M. EL-M.; ABEDEL, MONEIM, M. F. Evaluation of plant extracts and *Pseudomonas* spp. For control of root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* on tomato. **Nematropica**, v. 40, p. 289-299, 2010.

ALVES, G. C. S. et al. Avaliação in vitro do efeito de rizobactérias sobre *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* e *Pratylenchus zaeae*. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.78, n.4, p.557-564, out./dez., 2011.

BARROS-GOMES, H. E ROCHA, C. **Serviço Nacional de Avisos Agrícolas: Métodos de previsão e evolução dos inimigos das culturas - Arroz**. Oeiras: Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas. 2006. 65p.

BEDENDO, I. P. E PRABHU, A. S. Doenças do arroz. In: KIMATI, H. et al. **Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**. 4. Ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v. 2, 2005. 663p.

BETTIOL, W. E MORANDI, M. A. B. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. 341p. ISBN 978-85-85771-48-5.

CHAIBUB, A. A. ; SENA, A. P. A. ; MAGALHAES, M. S. ; CORTES, M. V. C. B. ; SILVA-LOBO, V. L. ; FILIPPI, M. C. C. ; ARAUJO, L. G. . **Antagonismo in vitro e in vivo entre *Magnaporthe oryzae* e bactérias do filoplano do arroz**. In: 44º Congresso Brasileiro de Fitopatologia., 2011, Bento Gonçalves.. Tropical Plant Pathology.. Brasília. : Brazilian Phytopathological Society., 2011.

CIPRIANO, M. A. P. **Potencial de *Pseudomonas* spp na promoção de crescimento e no controle de *Pythium* em alface cultivada em sistema hidropônico**. Campinas – São Paulo: IAC, 2009. 49p.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento de safra brasileira**: grãos, oitavo levantamento, maio 2012 / Companhia Nacional de Abastecimento. – Brasília: Conab, 2012. 36p. Publicação mensal.

DIAS NETO, J. J. et al. Influência do meio de cultura na esporulação de *Magnaporthe grisea* e da concentração de conídios na severidade da brusone em arroz. **Biosci. J.**, Uberlândia, v. 26, n. 2, p. 173-179, Mar./Apr. 2010.

DIAS NETO, J. J. ***Magnaporthe grisea***: Biologia e identificação de patótipos isolados de plantas de arroz na região tropical do Brasil. Gurupi – Tocantins: UFT, 2008. 97p. (dissertação de mestrado)

FILIPPI, M. C. C. et al. Leaf blast (*Magnaporthe oryzae*) suppression and growth promotion by rhizobacteria on aerobic rice in Brazil. **Biological Control**, 58, 2011, 160–166.

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

HARTHMANN, O.E.L.; MÓGOR, A.F.; WORDELL FILHO, J.A.; LUZ, W.C.; BIASI, L.A. Tratamento de sementes com rizobactérias na produção de cebola. **Ciência Rural**, v.39, p.2533-2538, 2009.

KADO, C.I. E HESKETT, M.G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, v. 60, p. 969–976, 1970.

KLOEPPER, J.W.; SCHROTH, M.N. Relationship of *in vitro* antibiosis of plant growthpromoting rhizobacteria to plant growth and the displacement of root microflora. **Phytopathology**, v. 71, p. 1020-1024, 1981.

LEONG, J. Siderophores: their biochemistry and possible role in the biocontrol of plant pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v. 24, p.187-209, 1986.

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

LUDWIG, J. E. MOURA, A. B. Controle biológico da queima-das-bainhas em arroz pela microbiolização de sementes com bactérias antagonistas. **Fitopatologia Brasileira**. 32(5), set – out, 2007.

OLIVEIRA, J. A. **Efeito do tratamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativas* L.) e pimentão (*Capsicum annanum* L.)**. 1991. 111 f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) – Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, 1991.

OOSTENDORP, M. E. SIKORA, R.A. Seed treatment with antagonistic rhizobacteria for the suppression of *Heterodera schachtii* early root infection of sugar beet. **Revue de Nématologie**, v.1, n.12, p.77-83, 1989.

ROMEIRO, R. S. **Controle biológico de enfermidades de plantas: fundamentos**. Viçosa: Ed. UFV, 2007. 269p.

ROTILI, E. A. et al. Eficiência no uso de fósforo de variedades de arroz cultivadas em solos de várzea irrigada. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 57, n.3, p. 415-420, mai/jun, 2010.

SANTOS, A. B.; STONE, L. F. E VIEIRA, N. R. A. **A cultura do arroz no Brasil**. 2. Ed. Ver. Ampl. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2006. 1000p.

SCHIPPERS, B.; BAKKER, A.W.; BAKKER, P.A.H.M. Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.25, p.339-358, 1987.

SCIVITTARO, W. B. E GOMES, A. S. **Adubação e calagem para o arroz irrigado no Rio Grande do Sul**. Pelotas: EMBRAPA, 2007. 8p. (Circular técnica, 62). ISSN 1981-5999.

SILVA, G. B. DA; PRABHU, A. S. E FILIPPI, M. C. DE. **Variabilidade de *Pyricularia grisea* em arroz de terras altas**. Santo Antônio de Goiás : Embrapa Arroz e Feijão, 2007. 24 p. - (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Arroz e Feijão, ISSN 1678-9601 ; 29).

SOCIEDADE SUL-BRASILEIRA DE ARROZ IRRIGADO. **Arroz irrigado: Recomendações técnicas da pesquisa para o Sul do Brasil**. Porto Alegre: SOSBAI, 2010. 188p.

SOUZA JÚNIOR, I. T. DE. et al. Biocontrole da queima-das-bainhas e do nematoide-das-galhas e promoção de crescimento de plantas de arroz por rizobactérias. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.45, n.11, p.1259-1267, nov. 2010.

UTUMI, M. M. **Sistema de produção de arroz de terras altas**. 4. Ed. Porto Velho, RO: EMBRAPA Rondônia, 2008. 33p. – (Sistemas de Produção/Embrapa Rondônia, 0103-1668 ; 31).