



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE GURUPI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

MAIRA SORANYI TIQUE OBANDO

**POTENCIAL ANTAGÔNICO DE ISOLADOS DE *Bacillus* Spp. NO CONTROLE
DA MANCHA/ PARDA (*Bipolaris orizae*) EM CULTIVARES DE ARROZ NO
SUL DO TOCANTINS - BRASIL**

**Gurupi
– TO
2024**

Maira Soranyi Tique Obando

Potencial antagônico de isolados de *Bacillus* Spp. no controle da mancha parda (*Bipolaris orizae*) em cultivares de arroz no sul do Tocantins - Brasil

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Tocantins (UFT), como requisito à obtenção do grau de Mestre (a) em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Eugênio E. Oliveira
Coorientador: Prof. Dr. Raimundo W. S. Aguiar

Gurupi – TO 2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins

- O12p Obando, Maira Soranyi Tique.
Potencial antagonico de isolados de Bacillus Spp. no controle da mancha
parda (Bipolaris orizae) em cultivares de arroz no sul do Tocantins - Brasil. /
Maira Soranyi Tique Obando. – Gurupi, TO, 2024.
59 f.

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do Tocantins
– Câmpus Universitário de Gurupi - Curso de Pós-Graduação (Mestrado) em
Biotecnologia, 2024.
Orientador: Eugênio Eduardo de Oliveira
Coorientador: Raimundo Wagner de Sousa Aguiar

1. Potencial antagonico. 2. Bipolaris sp. 3. Controle biológico. 4. Bacillus
spp.. I. Título

CDD 660.6

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer
forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte.
A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184
do Código Penal.

**Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da
UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).**



ATA DE DEFESA N.º 1/2024/COL/PPGB/CAUG/UFT

Ata da sessão pública de Defesa de Dissertação de Mestrado, no Programa de Pós Graduação em Biotecnologia da UFT da aluna **Maira Soranyi Tique Obando**, intitulada "**Potencial antagônico de isolados de bacillus spp. no controle da mancha parda (*Bipolaris orizae*) em cultivares de arroz no sul do Tocantins - Brasil**", número de registro SEI 23101.000559/2024-82, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia. A sessão foi realizada dia 02 de fevereiro de 2024, às 14 horas e 30 minutos, por videoconferência e teve como Comissão Avaliadora os seguintes membros: Prof. Eugenio Eduardo de Oliveira - Orientador (UFV); Prof. Raimundo Wagner de Souza Aguiar - Coorientador (UFT); Prof. Gil Rodrigues dos Santos (UFT); Prof. Luis Oswaldo Viteri Jumbo (Univ. Loja), Prof. Rolando Tito Libio Bacca Ibarra (Univ. Tolima). Após o encerramento da sessão, a Comissão considerou a dissertação:

- (X) Aprovada
() Reprovada.



Documento assinado eletronicamente por **Luis Oswaldo Viteri Jumbo, Usuário Externo**, em 02/02/2024, às 16:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **ROLANDO TITO LIBIO BACCA IBARRA, Usuário Externo**, em 02/02/2024, às 17:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Eugenio Eduardo de Oliveira, Usuário Externo**, em 05/02/2024, às 08:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gil Rodrigues dos Santos, Servidor(a)**, em 05/02/2024, às 10:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Raimundo Wagner de Souza Aguiar, Servidor(a)**, em 06/02/2024, às 09:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.uft.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0243195** e o código CRC **F0750E1D**.

*Maria del carmen Obando, Katerine
Tique Obando, Carlos Andres
Ramirez, Giselly Batista Alves,
Déborah Rodello (emurawa), Laina
Pires e Katherine Villa.*

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha sincera gratidão ao Programa de Biotecnologia da Universidade Federal do Tocantins – Campus Universitario de Gurupi, por me dar a oportunidade de fazer parte desta prestigiada instituição acadêmica. esse programa tem sido fundamental para meu desenvolvimento profissional e pessoal, e sou profundamente grata por ter sido aceita nele.

Também gostaria de reconhecer e agradecer ao programa (capes) por ter me concedido a bolsa de estudos que possibilitou minha participação neste programa e tem sido um pilar fundamental em minha carreira acadêmica.

Um agradecimento especial aos meus orientadores e banca de avaliação por sua orientação especializada e apoio constante durante o desenvolvimento de minha pesquisa, seus conhecimentos e conselhos foram de valor inestimável para o progresso de meus estudos.

Não posso deixar de mencionar a valiosa contribuição de toda a equipe de técnicos e dos meus estimados colegas do laboratório de biologia molecular. seus ensinamentos, sugestões e colaboração foram fundamentais para o sucesso da minha pesquisa e o enriquecimento da minha experiência no campo da biotecnologia.

RESUMO

O fungo *Bipolaris oryzae* ameaça constantemente a cultura do arroz, causando a doença conhecida como a mancha parda, que resulta na diminuição da qualidade dos grãos e redução significativa do rendimento. O controle eficiente das doenças nos cultivos de arroz é um fator de grande relevância na agricultura e envolve a identificação de espécies antagonicas. Um método promissor para o controle dessas doenças é o controle biológico, que utiliza bactérias do gênero *Bacillus sp.* Em alguns casos, essa abordagem tem mostrado resultados promissores, com a redução da incidência do fungo e melhoria na saúde das plantas. No entanto, sua eficiência pode ser dependente do tipo de cultura e das condições ambientais. Este trabalho tem como objetivo isolar e avaliar o potencial antagonico de três cepas bacterianas do gênero *Bacillus* como agentes de biocontrole contra *B. oryzae* em duas variedades de arroz (Predileta e Rubeita). Dessa forma, a primeira parte do estudo consiste na análise sanitária das sementes, com o objetivo de identificar os fungos associados a essa cultura, bem como avaliar o potencial patogênico desses microrganismos. Outra etapa da pesquisa envolveu a aplicação *in vitro* e *in vivo* dos isolados. Também foram realizados estudos moleculares para identificar compostos relacionados à atividade antimicrobiana contra os fungos patogênicos. Com base nos resultados da análise sanitária, observou-se alta diversidade de fungos associados às sementes de arroz das variedades Rubelita e Predileta, tanto antes quanto após o tratamento. Dentre os fungos encontrados, *B. oryzae*, demonstrou ser altamente patogênico para a cultura do arroz, com índices de transmissão da doença de 3 e 5% respectivamente. Nos ensaios *in vitro* realizados contra *B. oryzae*, os isolados *Bacillus sp.* OP938255.1 e *Bacillus sp.* OP938696.1 demonstraram inibição do crescimento micelial já a partir do segundo dia de incubação, tendo se mantido constante com 50% de inibição ao final de sete dias. Em contraste, *B. velezensis*, se destacou entre os isolados, apresentando uma taxa de inibição expressiva de 95%. Em testes *in vivo*, os três isolados se mostraram altamente eficazes na atividade antagonista ao fungo, resultando em uma redução da severidade da doença nas plantas da variedade Rubelita, cujos índices ficaram abaixo de 5%. A cepa *Bacillus sp.* OP938255 foi especialmente eficaz, reduzindo significativamente a severidade da doença quando aplicada na concentração de $1,0 \times 10^7$, alcançando um índice menor que 1. Na caracterização bioquímica, todos os testes foram positivos, exceto para Ácido Indol-Acético (AIA) e

solubilização de potássio. A espécie *B. velezensis* foi a única identificada como produtora de protease, sugerindo seu potencial como promotor de crescimento vegetal. No que diz respeito á caracterização molecular *B. velezensis* foram geradas 6.310.092 leituras de extremidade emparelhada para *B. velezensis*. O genoma foi estimado em 3.913.362 pares de bases, com um teor médio de G+C de 46,51%. Adicionalmente, foram identificados genes que desempenham papéis na biossíntese de peptídeos ribossômicos e antifúngicos, como surfactina e fengicina, que têm a capacidade de inibir a formação de conídios de fungos patogênicos. Esses achados evidenciam a viabilidade de *B. velezensis* como uma alternativa promissora para a gestão sustentável de doenças em culturas agrícolas.

Palavras-chave: Potencial antagonico. *Bipolaris sp.* Controle biológico. *Bacillus spp.*

ABSTRACT

The fungus *Bipolaris oryzae* constantly threatens rice crops, causing the disease known as brown spot, which results in reduced grain quality and a significant reduction in yield. Efficient disease control in rice crops is a highly relevant factor in agriculture and involves the identification of antagonistic species. A promising method for controlling these diseases is biological control, which uses bacteria of the genus *Bacillus* sp.. In some cases, this approach has shown promising results, with reduced incidence of the fungus and improved plant health. However, its efficiency may depend on the type of crop and environmental conditions. This study aims to isolate and evaluate the antagonistic potential of three bacterial strains of the genus *Bacillus* as biocontrol agents against *B. oryzae* in two rice varieties (Predileta and Rubeita). Thus, the first part of the study consists of the sanitary analysis of the seeds, with the aim of identifying the fungi associated with this crop, as well as evaluating the pathogenic potential of these microorganisms. Another stage of the research involved the in vitro and in vivo application of the isolates. Molecular studies were also carried out to identify compounds related to antimicrobial activity against pathogenic fungi. Based on the results of the sanitary analysis, a high diversity of fungi associated with rice seeds of the Rubelita and Predileta varieties was observed, both before and after treatment. Among the fungi found, *B. oryzae* was shown to be highly pathogenic for rice crops, with disease transmission rates of 3 and 5%, respectively. In in vitro tests performed against *B. oryzae*, the isolates *Bacillus* sp. OP938255.1 and *Bacillus* sp. OP938696.1 demonstrated inhibition of mycelial growth from the second day of incubation, remaining constant with 50% inhibition after seven days. In contrast, *B. velezensis* stood out among the isolates, presenting a significant inhibition rate of 95%. In in vivo tests, the three isolates proved to be highly effective in antagonistic activity against the fungus, resulting in a reduction in the severity of the disease in Rubelita plants, whose rates were below 5%. The *Bacillus* sp. OP938255 strain was especially effective, significantly reducing disease severity when applied at a concentration of 1.0×10^7 , reaching an index lower than 1. In the biochemical characterization, all tests were positive, except for Indole-Acetic Acid (IAA) and potassium solubilization. The *B. velezensis* species was the only one identified as a protease producer, suggesting its potential as a plant growth promoter.

Regarding the molecular characterization of *B. velezensis*, 6,310,092 paired-end reads were generated for *B. velezensis*. The genome was estimated at 3,913,362 base pairs, with an average G+C content of 46.51%. Additionally, genes that play roles in the biosynthesis of ribosomal peptides and antifungals, such as surfactin and fengycin, which have the ability to inhibit the formation of conidia of pathogenic fungi, were identified. These findings highlight the viability of *B. velezensis* as a promising alternative for sustainable disease management in agricultural crops.

Keywords: Antagonistic potential. *Bipolaris sp.* Biological control. *Bacillus*

LISTA DE ILUSTRACOES

Figura 1-Germinação de sementes de arroz Rubelita e Predileta submetidas a dois tratamentos: desinfecção (barra vermelha) e controle (barra branca)..	27
Figura 2-Gel de agarose banda amplificada de 16S-DNA para o isolado bacteriana <i>Bacillus</i> .	48
Figura 3- Árvore filogenética construída a partir das sequências do gene rpoB das cepas tipo do "complexo de espécies <i>Bacillus</i> sp.".	50
Figura 4- Análise de qualidade realizada pelo software FastQC para leituras brutas do genoma de <i>B. velezensis</i>	50
Figura 5- Representação esquemática da regulação gênica dos genes relacionados à biossíntese de peptídeos	51
Figura 6- Colônia de fungos crescendo em sementes da variedade Prediletae na variedade rubelita	54
Figura 7-Confronto <i>in vitro</i> de <i>Bacillus</i> durante sete dias dia de avaliação	55
Figura 8-Confronto <i>in vitro</i> de <i>B. Velezensis e bacillus sp</i> durante sete dias de avaliação	55
Figura 9 - Análise de severidade da doença na variedade Predileta, considerando três espécies bacterianas e o fungicida metiltiofanato.	56
Figura 10-Análise de severidade da doença na variedade Rubelita, considerando três espécies bacterianas e o fungicida metiltiofanato.	58
Figura 11- Efeito de diferentes tratamentos na massa radicular (massa das raízes) da variedade Predileta sob a influência de três espécies bacterianas e o fungicida metiltiofanato. gicida metiltiofanato (barra laranja), e as diluições do inóculo bacteriano (10 ^x , 10 ^{3x} , 10 ^{6x} - tons de azul)	59
Figura 12 -Efeito de diferentes tratamentos na massa radicular (massa das raízes) da variedade Predileta	60
Figura 13-Efeito de diferentes tratamentos na massa radicular (massa das raízes) da variedade Rubelita.	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-Incidência de fungos nas sementes tratadas e não tratadas de arroz (<i>Oryza sativa</i> L. 1753) das variedades Predileta e Rubelita.....	28
Tabela 2-Identificação de microrganismo por sequenciamento de rDNA 16S como gênero <i>Bacillus</i> em comparação com o GenBank NCBI.	49
Tabela 3-Estatísticas básicas do genoma da bactéria <i>B. velezensis</i> , 6.310.092 leituras de extremidade emparelhada, O tamanho total do genoma foi estimado em 3.913.362 bp , com um conteúdo médio de G+C de 46,51%, e nenhum plasmídeo foi detectado.....	51
Tabela 4-Avaliação da produção de metabólitos promotores de crescimento por isolados de <i>Bacillus</i> spp., categorizados como positivos (+) ou negativos (-) com base em sua atividade enzimática.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS

ANAVA	Análise de Variância
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EMBRABA	Empresa Brasileira de Pesquisa
Agropecuária EU	Unidade experimental
MSPA	Massa seca da parte aérea
MSR	Massa seca da raiz
Ph	pares de bases
RNA	Ácido Ribonucleico
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
UFT-G	Universidade federal do Tocantins - Gurupi
TBE	Tris/Borato/EDTA

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO GERAL	17
1.1	Objetivo geral	19
1.2	Objetivos específicos	19
2.	CAPÍTULO 1 QUALIDADE SANITÁRIA INTRÍNSECA DE SEMENTES DE ARROZ DAS VARIEDADES RUBELITA E PREDILETA	20
2.1	Introdução	22
2.2	Metodologia	24
2.2.1	Amostras	24
2.2.2	Avaliação da incidência de fungos fitopatogênicos em sementes utilizando o teste blotter com congelamento (deep freezing)	24
2.2.3	Germinação e transmissibilidade de patógenos presentes nas sementes.....	25
2.2.4	Teste de patogenicidade as espécies fúngicas	25
2.2.5	Análise estatística	26
2.3	Resultados.....	27
2.3.1	Testes de germinação	27
2.3.2	Análise da incidência de patógenos em sementes de arroz.....	27
2.3.3	Transmissibilidade dos patógenos das sementes	29
2.4	Discussão.....	31
2.	Conclusão.....	33
	REFERÊNCIA.....	34
3	CAPÍTULO 2 IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA ECARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE BACTÉRIAS GÉNERO <i>BACILLUS</i> COM POTENCIAL FUNGICIDA CONTRA <i>BIPOLARIS ORYZAE</i>.....	36
3.1	Introdução	40
3.2	Metodologia	42

3.2.1	Origem e cultura.....	42
3.2.2	Caracterização molecular.....	42
3.2.2.1	<i>Sequenciamento de produtos de pcr - Bacillus sp.....</i>	42
3.2.2.2	<i>Preparação e sequenciamento da genômico do isolado Bacillus velezensis</i>	43
3.2.3	Caracterização bioquímica para atividades de promoção do crescimento de plantas.....	44
3.2.3.1	<i>Amostras</i>	44
3.2.3.2	<i>Amilase.....</i>	44
3.2.3.3	<i>Solubilização de fósforo.....</i>	44
3.2.3.4	<i>Ácido indolacético (IAA).....</i>	45
3.2.3.5	<i>Catalase</i>	45
3.2.3.6	<i>Celulase.....</i>	45
3.2.3.7	<i>Produção de protease.....</i>	46
3.2.4	Bioensaio antagonista in vitro.....	46
3.2.5	Análise da massa seca e da massa fresca	47
3.2.6	Análise estatística	47
3.3	Resultados.....	48
3.3.1	Caracterização molecular.....	48
3.3.1.1	<i>Sequenciamento de produtos de PCR</i>	48
3.3.1.2	<i>Sequenciamento e controle de qualidade.....</i>	49
3.3.1.3	<i>Genes associados à patogenicidade do Bacillus velezensis.....</i>	51
3.3.1.4	<i>Análises de bioinformática do genoma da bactéria Bacillus velezensis.....</i>	52
3.3.1.5	<i>Caracterização bioquímica das atividades de promoção do crescimento vegetal</i>	52
3.3.2	Caracterização morfológica do patógeno.....	53
3.3.3	Bioensaio antagonista in vitro.....	54

3.3.4	Bioensaio in vivo	55
3.3.4.1	<i>Variedade Rubelita e Predileta</i>	57
3.3.5	Análise de massa aérea.....	58
3.3.5.1	<i>Variedade Predileta</i>	58
3.3.5.2	<i>Variedade Rubelita</i>	59
3.3.6	Massa radicular	59
3.3.6.1	<i>Variedade predileta</i>	60
3.3.6.2	<i>Variedade Rubelita</i>	60
3.4	Discursão	62
3.5	Conclusão	65
	REFERÊNCIAS	66
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	71

1. INTRODUÇÃO GERAL

O arroz da espécie *Oryza sativa* é fonte de alimento de mais do 50% da população mundial, (Autarmat; Treesubstorn; Thiravetyan, 2023; Huluka; Kumsa, 2022). É cultivada em mais de 115 países, com uma média de 162 milhões de hectares colhidos, totalizando aproximadamente 755 milhões de toneladas produzidos (Imran *et al.*, 2023). Entre os principais produtores mundiais, o Brasil participa com x% ocupando a oitava posição, onde a maior parcela da produção de arroz é proveniente dos Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Tocantins, contribuindo com 13,6, 1,9 e 1,2 milhões de toneladas respectivamente (Santos *et al.*, 2021; Alves Ribeiro; Reinaldo Alves, 2022).

Embora a quantidade total de arroz produzido mundialmente seja significativa, esse suprimento geralmente não é suficiente para atender a demanda local e global. Somado a isso, as lavouras de arroz têm sido constantemente afetadas por diversos fatores bióticos e abióticos, que impactam significativamente a cultura levando a perda de rendimento e qualidade dos grãos (Huluka; Kumsa, 2022). No caso do fator biótico, o fungo *B. oryzae* é o mais importante. É um patógeno necrotrófico, que afeta os estágios iniciais e finais da planta, sendo considerado um dos principais fungos responsáveis pela doença da mancha parda, (DA SILVA LOBO; CORSI DE FILIPPI; SITARAMA PRABHU, 2021). Esse fungo atua secretando citotoxinas, como a Ophiobolin, que inibe o crescimento de plantas e a germinação de sementes, levando assim a perdas significativas da cultura e produção de arroz em todo o mundo, representando uma ameaça anual a segurança alimentar (SHAO *et al.*, 2021; CIMINI *et al.*, 2022). Outros sintomas causados pela *B. oryzae* compreendem as manchas marrons nos estágios iniciais de desenvolvimento da planta. Nas folhas, essas manchas se diferenciam com um centro cinza ou esbranquiçado, cilíndricas ou ovais formando uma auréola amarela, enquanto as manchas jovens são pequenas, circulares, e podem aparecer como manchas marrom-escuras ou marrom- púrpura. (THUY *et al.*, 2023).

O uso de culturas resistentes no controle de doenças tem sido amplamente recomendado como uma estratégia eficaz para o controle de doenças em plantas. Contudo, a oferta de variedades resistentes ainda é limitada, e o número de cultivos

disponíveis não é suficiente para atender à crescente demanda, especialmente considerando a diversidade e especificidade dos patógenos. Além disso, há ainda limitações na compreensão dos mecanismos moleculares e fisiológicos de defesa das plantas, o que dificulta o desenvolvimento de culturas mais eficientes no combate a essas doenças. Isso contribuiu para a vulnerabilidade de algumas variedades de arroz, que se tornaram suscetíveis a importantes fitopatógenos como *Pyricularia grisea* (Guerrero *et al.*, 2022) e *B. oryzae* (Ota *et al.*, 2021).

Com o crescimento populacional, é necessário implementar um gerenciamento mais eficaz do cultivo para aumentar a produção. Entre as diversas abordagens disponíveis, o controle biológico se destaca como uma das mais comuns. Nesse contexto, a inoculação com bactérias do gênero *Bacillus* tem se mostrado particularmente eficaz. Estudos recentes demonstraram que essa prática contribui para o aumento do crescimento das plantas e para a resistência do arroz contra fungos como *B. oryzae* (Arnaouteli *et al.*, 2021; Perea-Molina *et al.*, 2022; Diniz *et al.*, 2023). Isso ocorre porque as espécies de *Bacillus* possuem diversos mecanismos para inibir o crescimento de microrganismos fitopatogênicos, como a produção de quitinases, incluindo as enzimas ChiA e ChiB, que desempenham um papel crucial na atividade antagônica contra diversos patógenos de plantas (Arnaouteli *et al.*, 2021). Espécies como *Bacillus methylotrophicus* e *Bacillus subtilis* demonstraram inibição significativa de *Alternaria triticina* e *Bipolaris sorokiniana* por meio dessas enzimas (Saini *et al.*, 2024).

Neste contexto, o objetivo deste trabalho é isolar, caracterizar molecularmente e avaliar o potencial antagônico, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, de três cepas de bactérias do gênero *Bacillus*, com potencial para serem utilizadas como agentes de controle contra *Bipolaris oryzae*.

1. OBJETIVO GERAL

Isolar, caracterizar molecularmente e avaliar o potencial antagônico *in vitro* e *in vivo* de três cepas de bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus*, como agentes de controle biológico contra *B. oryzae*.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a qualidade sanitária de sementes de arroz das variedades Rubelita e Predileta.
- Identificar e caracterizar molecularmente cepas do gênero *Bacillus*.
- Avaliar o potencial antagônico *in vitro* e *in vivo* dos três isolados de *Bacillus* contra *Bypolarys oryzae*.

2. CAPÍTULO 1 QUALIDADE SANITÁRIA INTRÍNSECA DE SEMENTES DE ARROZ DAS VARIEDADES RUBELITA E PREDILETA

RESUMO

Nos últimos anos, têm-se identificado problemas que impactam o crescimento e a produtividade dos cultivos de arroz. Estes incluem restrições bióticas e doenças causadas por fungos e bactérias, como o fungo *Bipolaris oryzae*. A presença destes patógenos nas sementes de arroz, especialmente em variedades como a Rubelita e a Predileta, pode ocasionar doenças e reduzir a produtividade das plantas, afetando a produção agrícola e a segurança alimentar. É crucial implementação de estratégias eficazes para gerenciar e controlar a propagação desses organismos prejudiciais, visando proteger a saúde e a produtividade das lavouras. Os estudos de sanidade das sementes fornecem informações sobre os patógenos e suas opções de controle. Assim, este trabalho visou a avaliação da sanidade destas sementes e o potencial desses microrganismos em transmitir a doença. A metodologia utilizada nesses estudos seguiu os princípios de Koch, estabelecendo uma relação causal entre o microorganismo causador e a doença. Verificou-se que fungos saprófitos, como *Aspergillus*, *Penicillium* e *Rhizopus*, e patogênicos como *Bipolaris oryzae* e *Fusarium*, estavam associados às sementes das variedades Rubelita e Predileta, com e sem assepsia. Dentre os fungos observados, *B. oryzae*, mostrou potencial para conferir a doença da semente para a plântula, com taxas de transmissão de 3% nas sementes de Predileta e 5% nas sementes de Rubelita. Além disso, testes de patogenicidade mostraram que apenas o fungo do gênero *B. oryzae* foi patogênico para as plantas de arroz dessas variedades. Fungos não saprófitos de armazenamento, como *Aspergillus*, *Penicillium* e *Rhizopus*, podem degradar as sementes, enquanto os patógenos das plantas, como *Fusarium sp.* e *B. oryzae*, reduzem a germinação e a vigorosidade das plantas. Esta pesquisa confirma a capacidade das sementes de disseminar patógenos para outras culturas além de evidenciar a importância da análise da sanidade das sementes para a implementação de medidas de controle eficazes.

Palavras-chave: Controle biológico. Fitopatógenos. *Bipolaris oryzae*.

ABSTRACT

In recent years, problems have been identified that impact the growth and productivity of rice crops. These include biotic constraints and diseases caused by fungi and bacteria, such as the fungus *Bipolaris oryzae*. The presence of these pathogens in rice seeds, especially in varieties such as Rubellita and Predileta, can cause diseases and reduce plant productivity, affecting agricultural production and food security. Implementing effective strategies to manage and control the spread of these harmful organisms is crucial to protecting crop health and productivity. Seed health studies provide information about pathogens and their control options. Thus, this study aimed to evaluate the health of these seeds and the potential of these microorganisms to transmit the disease. The methodology used in these studies followed Koch's principles, establishing a causal relationship between the causative microorganism and the disease. It was found that saprophytic fungi, such as *Aspergillus*, *Penicillium* and *Rhizopus*, and pathogenic fungi, such as *Bipolaris oryzae* and *Fusarium*, were associated with the seeds of the Rubelita and Predileta varieties, with and without asepsis. Among the fungi observed, *B. oryzae* showed potential to transmit the disease from seed to seedling, with transmission rates of 3% in Predileta seeds and 5% in Rubelita seeds. Furthermore, pathogenicity tests showed that only the fungus of the genus *B. oryzae* was pathogenic to rice plants of these varieties. Non-saprophytic storage fungi, such as *Aspergillus*, *Penicillium* and *Rhizopus*, can degrade seeds, while plant pathogens, such as *Fusarium sp.* and *B. oryzae*, reduce germination and plant vigor. This research confirms the ability of seeds to disseminate pathogens to other crops and highlights the importance of analyzing seed health for the implementation of effective control measures.

Keywords: Biological control. Phytopathogens, *Bipolaris oryzae*.

2.1 INTRODUÇÃO

O arroz, uma cultura originária da Ásia, é uma gramínea cultivada em diversos países e representa a principal fonte de alimentação para a maioria da população mundial, desempenhando, portanto, um papel crucial na segurança alimentar global. No entanto, essa cultura vital enfrenta desafios significativos, especialmente em razão de doenças bióticas causadas por fungos e bactérias, as quais não apenas reduzem a produtividade das plantações, mas também comprometem a oferta de alimento em várias regiões do mundo (Freitas, 2022; Behera, 2024).

Um exemplo de agentes patogênicos conhecidos dessa cultura é o fungo *Bipolaris oryzae* e o *Fusarium*, os quais têm sido apontados como responsáveis pela doença conhecida como mancha castanha. Esta doença afeta a qualidade das sementes em todos os estágios de desenvolvimento da planta, resultando em uma redução de produtividade de arroz de 10 a 30% nas áreas impactadas, o que compromete a alimentação de mais de 60 milhões de pessoas (Zhang; Islam; Liu, 2022).

Além desses patógenos, fungos saprofitos que afetam o armazenamento das sementes desempenham um papel significativo na qualidade e saúde das sementes de arroz. Esses fungos podem prejudicar a germinação, o crescimento e o conteúdo nutricional das sementes, agravando ainda mais as perdas econômicas na produção de arroz. A diversidade desses fungos é grande, variando conforme o clima e a região. Exemplos bem conhecidos de fungos saprofitos incluem *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp e *Rhizopus* sp. (Purushotham *et al.*, 1996; Ackaah; Nyaku; e Darkwa, 2023; Laut *et al.*, 2023).

Diante desse cenário, o desenvolvimento de estratégias de controle se torna necessário para reduzir o impacto desses fungos. O controle biológico surge como uma ferramenta promissora para mitigar os danos causados por agentes patogênicos como o *B. oryzae* (Roy; Shil, 2020; Zhang; Islam; Liu, 2022; Behera, 2024). Além disso, têm sido comprovadas vantagens ambientais significativas do controle biológico em comparação com os métodos tradicionais, por permitir uma produção sustentável nas culturas de arroz (Bandeira Silva *et al.*, 2019).

Dentre os inúmeros microrganismos estudados, a utilização de bactérias,

especialmente dos gêneros *Bacillus*, tem se revelado eficaz no controle de fungos patogênicos em sementes de arroz, minimizando a transmissão desses microrganismos às plântulas e, conseqüentemente, reduzindo o impacto negativo na produção (Prabhukarthikeyan *et al.*, 2019; Ramírez-Pool *et al.*, 2024). Apesar de sua eficiência, o sucesso das espécies de *Bacillus* no controle biológico pode ser influenciado pelo tipo de patógeno específico da região, que aliada as condições ambientais locais influi significativamente o desenvolvimento e a propagação da doença (Rajkumari; Pandey, 2019; Setiaji *et al.*, 2023; Nihorimbere *et al.*, 2024). Como as sementes são uma fonte potente de disseminação de várias doenças (Gupta; Kumar, 2020), a avaliação específica da qualidade sanitária delas torna-se, portanto, crucial, uma vez que ela permite identificar os patógenos predominantes, fornecendo, assim, subsídios importantes para o desenvolvimento de estratégias de manejo adaptadas às condições locais.

Nesse contexto, este estudo busca investigar a qualidade sanitária das sementes de duas variedades de arroz, *Rubelita* e *Predileta*, com o objetivo de avaliar a presença e incidência de fungos patogênicos na cultura de arroz, bem como o potencial de infecção desses patógenos, visando assim fornecer dados essenciais para manejo adequado e controle fitossanitário na cultura do arroz.

2.2 METODOLOGIA

2.2.1 Amostras

Os experimentos foram realizados no laboratório de Biologia Molecular e laboratório de Fitopatologia, da Universidade Federal do Tocantins - Campus de Gurupi (UFT). Para este estudo foram utilizadas duas cultivares de arroz. Rubelita (*Oryza e L*) e Predilleta (L.), foram fornecidas pela Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

As cepas de *Bacillus* foram obtidas do banco de cepas do laboratório, mantidas a 5°C em tubos de conservação com meio de cultura. As cepas foram reativadas em placas de Petri contendo meio LB - Luria-Bertani (5g/L de extrato de levedura, 10g/L de triptona, 10g/L de NaCl e 20g/L de ágar).

2.2.2 Avaliação da incidência de fungos fitopatogênicos em sementes utilizando o teste blotter com congelamento (deep freezing)

A análise da sanidade das sementes de arroz foi realizada pelo método Blotter test, de acordo com o Manual de Análise Sanitária de Sementes (Brasil, 2009) para sementes tratadas e não tratadas. Para o tratamento, as sementes foram imersas por trinta segundos em álcool (50%) e seguida de hipoclorito de sódio (1%) por quarenta segundos, e ao final submetidas de três lavagens consecutivas com água destilada estéril. Para execução do experimento as sementes foram semeadas em caixas Gerbox (11x11x3,5 cm) contendo três folhas de papel de filtro previamente tratados e umedecidas com água destilada autoclavada (Zhang; Islam; Liu, 2022). Para o experimento, 25 sementes de cada cultura foram distribuídas em caixas Gerbox totalizando quatro repetições (100 sementes) para cada tratamento. As caixas foram incubadas sob fotoperíodo de 12 horas e temperatura constante de 25 °C por um período de 24 horas. Após essa etapa, os recipientes foram removidos e colocados em um freezer a -20°C por 24 horas para inibir por completo o processo de germinação. Em seguida, as caixas foram colocadas novamente em câmara de incubação a 25±2

°C, sob fotoperíodo de 12 horas e ao final desses 7 dias foi observado a ocorrência de espécies de fungos nas sementes.

As sementes que apresentaram contaminação por fungos foram transferidas em placas de Petri (90 mm) contendo meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar) com auxílio de um estilete estéril para permitir a sua identificação por microcultura e confirmação dos Postulados de Koch (Barnett; Hunter, 1998; Watanabe, 2010).

2.2.3 Germinação e transmissibilidade de patógenos presentes nas sementes

Para este teste, foram consideradas apenas as sementes nas quais foi observada a presença de fungos na análise sanitária descrita anteriormente. As sementes foram semeadas em bandejas de polietileno contendo areia de textura média, previamente autoclavada. Em cada bandeja, foram semeadas 20 sementes a uma profundidade de 1,0 cm, totalizando 100 sementes por tratamento. As bandejas foram irrigadas regularmente e mantidas em estufa a temperatura ambiente. A incubação ocorreu a 25 °C, com umidade relativa de 54% e fotoperíodo de 12 horas, durante 21 dias. A umidade do substrato foi mantida por irrigação diária com água esterilizada, garantindo condições adequadas para a germinação. A germinação, definida pela abertura total dos cotilédones, foi avaliada diariamente, e sua porcentagem foi calculada conforme descrito em (14, 15). A taxa de emergência foi avaliada no 21º dia após a semeadura, contando o número de plântulas que emergiram normalmente em relação ao total de sementes semeadas (16). Além disso, a presença de plântulas lesionadas pelos patógenos foi verificada com o auxílio de um microscópio estereoscópico nos dias 5, 10, 15 e 20 após a semeadura. Os dados obtidos nesta análise foram usados para calcular a transmissão e a taxa de transmissão do patógeno das sementes para a parte aérea das plântulas de arroz.

2.2.4 Teste de patogenicidade as espécies fúngicas

Com o objetivo de avaliar a capacidade dos fungos em causar doenças, as diferentes espécies fúngicas, consideradas potencialmente patogênicas, foram

isoladas, cultivadas e repicadas em placas de Petri contendo meio de cultura BDA durante 7 dias. O teste de patogenicidade seguiu o protocolo descrito no Manual de Análise Sanitária de Sementes (Ferreira *et al.*, 2023). As plantas foram cultivadas em sacos para mudas de tamanho médio (25x30 cm), contendo uma mistura esterilizada de areia, solo e substrato comercial na proporção de 1:1:1, sendo mantidas em casa de vegetação com irrigação diária. Vinte e cinco dias após a germinação, suspensões (1×10^6) contendo conídios de cada espécie foram pulverizadas nas folhas das plântulas saudáveis. Após a inoculação, as plantas foram mantidas em uma câmara úmida e escura por um período de 48 horas, durante o qual foram realizadas as avaliações de patogenicidade. Quando surgiram sintomas no tecido inoculado, o fungo foi isolado e cultivado novamente em meio BDA para confirmar o agente causal. Seguindo os postulados de Koch, o tecido foi submetido a um processo de assepsia antes de ser cultivado em meio de cultura (Dos Santos *et al.*, 2018).

2.2.5 Análise estatística

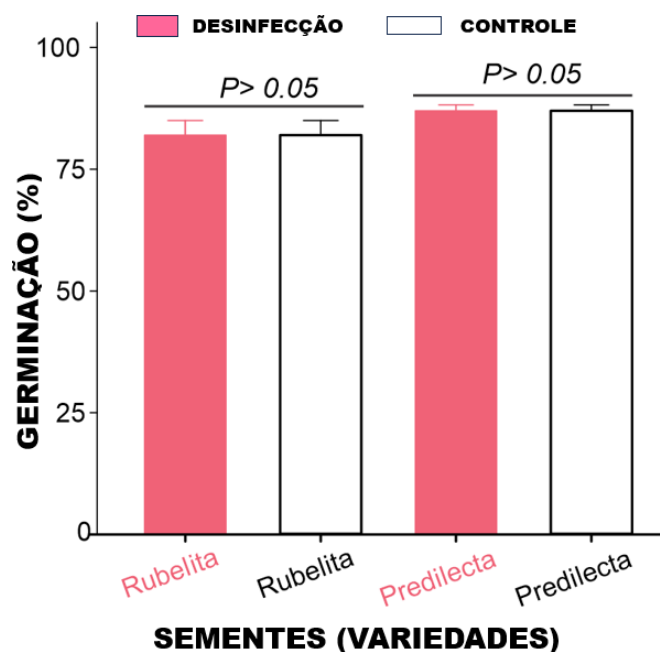
Para a análise dos dados, foi utilizada a versão 8.0,1 do software GraphPad Prism. As médias foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e à comparação de médias pelo teste de Tukey ($p = 0,05$). Todas as análises foram realizadas utilizando o software SigmaPlot 14.5.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Testes de germinação

A Figura 1 mostra o percentual de germinação (%) das sementes das variedades Rubelita e Predilecta, submetidas aos tratamentos de desinfecção e controle. Os resultados indicam que o processo de desinfecção não influenciou a germinação em nenhuma das variedades testadas. A comparação entre as sementes desinfetadas e o controle não revelou diferenças estatisticamente significativas, com valores de $P > 0,05$ para ambos os tratamentos.

Figura 1-Germinação de sementes de arroz Rubelita e Predileta submetidas a dois tratamentos: desinfecção (barra vermelha) e controle (barra branca). As linhas horizontais que cobrem as mesmas barras não mostram diferenças significativas ($P > 0,05$).



2.3.2 Análise da incidência de patógenos em sementes de arroz

Os resultados obtidos no teste de sanidade das sementes de arroz, com e sem assepsia, foram analisados com base na presença de diferentes gêneros fúngicos em duas variedades de arroz: Predileta e Rubelita Tabela 1., Nas sementes de Predileta

(*Oriza sativa*), a incidência de patógenos foi de 2 % em todos os gêneros identificados, incluindo *B. oryzae*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus sp.* e *Fusarium sp.* indicando uma baixa prevalência de infecções na amostra dessa variedade.

Por outro lado, na variedade Rubelita (L., 1753)., observou-se uma maior incidência de patógenos nas sementes, com *B. oryzae* e *A. niger* apresentando uma taxa de infecção de 4%. Além disso, gêneros adicionais, como *Curvularia* e *Rhizopus*, também foram detectados, com uma incidência de 2% para cada grupo. Essa diversidade e maior incidência de patógenos sugere uma susceptibilidade mais elevada da variedade Rubelita às infecções fúngicas.

Após a aplicação da assepsia, para a variedade Predileta não houve alteração na incidência de patógenos, mantendo a mesma taxa de infecção observadas nas sementes tratadas, com 2 % para todos os fungos. Esse resultado sugere que a aplicação de assepsia não foi suficientemente eficaz na redução da presença dos fungos nessa variedade ou que a mesma já apresenta uma resistência natural aos fungos analisados, embora outros fatores possam afetar a sanidade das sementes e precisam ser considerados.

Para a variedade Rubeita, a assepsia resultou em uma redução de 2% nas taxas de infecção para as espécies *B. oryzae* e *A. niger*, enquanto *Curvularia* e *Rhizopus* não foram identificados evidenciando a eficácia do procedimento de assepsia em reduzir a carga de patógenos nas sementes dessa variedade. No entanto, foi também observado a presença de *A. niger* e *Aspergillus sp.* com uma incidência de 2% respectivamente que anteriormente não tinha sido observada. Assume-se que isto tenha acontecido em decorrência de uma contaminação. Experimentos adicionais são necessários para confirmar esta hipótese.

Tabela 1-Incidência de fungos nas sementes tratadas e não tratadas de arroz (*Oryza sativa* L. 1753) das variedades Predileta e Rubelita.

Variedades	Sem assepsia					
	<i>Aspergillus sp.</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Curvularia sp.</i>	<i>Fusarium sp.</i>	<i>Rhizopus sp.</i>
Predileta	2	2	2	--	2	--
Rubelita	--	4	4	2	--	2
Com assepsia						
Predileta	2	2	2	--	--	--

Rubelita	2	2	2	--	--	--
----------	---	---	---	----	----	----

2.3.3 Transmissibilidade dos patógenos das sementes

A tabela 2 apresenta os resultados da análise de transmissão de sementes para a plântula dos fungos associados às sementes das duas variedades *Oryza sativa* aos 7, 14 e 21 dias após a semeadura. Não foi observada transmissão da infecção da semente-plântula para os fungos *Aspergillus*, *A. niger*, *Curvularia*, *Fusarium* e *Rhizopus spp.*, para as duas variedades estudadas sugerindo que esses fungos não têm um impacto significativo na saúde das plântulas nas condições testadas. Além disso, nenhum sintoma foi observado nas plântulas nesta condição. A exceção foi para o patógeno *B. oryzae* com taxas de transmissão de 3 e 5% para Predileta e Rubelita respectivamente. Isso aponta para o forte potencial desse fungo em transmitir a doença.

Tabela 2: Análise do potencial dos fungos associados a semente na transmissão da doença. O experimento foi realizado em casa de vegetação e avaliação feita aos 7, 14 e 21 dias após a semeadura.

Fungos	Incidência			
	Predileta	Rubelita	Patogenicidade	Sintomas
<i>Aspergillus sp.</i>	0	0	--	--
<i>Aspergillus niger</i>	0	0	--	--
<i>Bipolaris oryzae</i>	3	5	+	Manchas marrons e planta murcha
<i>Curvularia sp.</i>	0	0	--	--
<i>Fusarium sp.</i>	0	0	--	--
<i>Rhizopus sp.</i>	0	0	--	--

Ao teste de patogenicidade, os resultados dos isolados de *B. oryzae* registrados nas Tabelas 2, mostram que a agressividade dos isolados variou de acordo com a cultivar de arroz, sendo a cultivar predileta a mais resistente à infecção. As folhas de plântulas de arroz infectadas foram reconhecidas pelo aparecimento de manchas que foram inicialmente marrom-leves até murchamento da planta. Nenhuma alteração foi observada nas plantas inoculadas com outros fungos associados a semente. Amostras com sintomas de manchas obtidas de plântulas inoculadas, após o

isolamento e cultivo revelaram estruturas fúngicas típicas de *B. oryzae*, indicando a colonização dos tecidos pelo patógeno. A confirmação da identidade do patógeno foi obtida após o isolamento e cultivo em placas de Petri contendo meio BDA, o que completou os postulados de Koch.

2.4 DISCUSSÃO

Sementes podem ser um veiculos de agentes patogenicos que podem por sua vez causar doenças nas plantas, além de reduzir a germinação e o vigor das plantulas afetando negativamente o desenvolvimento e o crescimento das culturas (Chitnis *et al.*, 2020). A avaliação da saúde da planta torna-se imprescindível para garantir que as sementes estejam livres de patógenos e assim prevenir a propagação de doenças para outras áreas ou culturas. Dessa forma este estudo teve como objetivo a análise sanitária de duas culturas resistentes de arroz (Predileta e Rubelita) para identificar a presença de fungos patógenos em suas sementes. As sementes das variedades Rubelita e Predilera, revelaram uma diversidade de gêneros de fungos fitopatogênicos, tais como *Bipolaris oryzae*, *Fusarium Curvularia*. Além disso, foram identificados fungos saprófitos, como *Aspergillus*, *Penicillium* e *Rhizopus*, que podem ocasionar a depreciação de grãos e sementes (Sandoval-Martínez *et al.*, 2022). O desenvolvimento da cultura do arroz está sujeito adiversos estresses bióticos e abióticos, os quais, em conjunto com a variabilidade climática, impactam a sobrevivência e o rendimento da cultura. Este cenário é evidenciado pelos efeitos desfavoráveis ocasionados pelos estresses bióticos e abióticos na cultura do arroz (Pérez- Domfnguez *et al.*, 2021).

Embora as sementes de arroz fornecidas e certificadas pela EMBRAPA sejam caracterizadas por certa resistência a fungos fitopatogênicos, sua exposição em culturas de sequeiro, favorecidos pelo ambiente e pelo manejo inadequado da cultura, pode favorecer a contaminação por fungos (Atungulu *et al.*, 2019), informação consistente ao observado por este estudo onde foi observado inclusive a presença de um fungo potencialmente patogênicos para a cultura do arroz. Os resultados sugerem que o controle de fungos em sementes, incluindo de *B. oryzae* deve ser uma prioridade, especialmente para a variedade Rubelita, que demonstrou uma maior taxa de transmissão e sintomas mais evidentes.

A presença de espécies fitopatogênicas, como o gênero *Bipolaris sp.*, em sementes de *Oryza sativa*, pode causar problemas de germinação e está associada a sementes colhidas tardiamente ou à deterioração por umidade. A falta de produtos de controle biológico em larga escala e a negligência em práticas culturais e controle

químico tornam os tratamentos ineficazes (Scheuermann; NesI, 2021; Silva *et al.*, 2022).

A germinação das sementes de *Oryza sativa* para ambas as variedades não apresentou diferenças significativas, excedendo 80%, mas os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Rhizopus* foram registrados em ambas as variedades, podendo causar deterioração da qualidade e redução da germinação (Rodrigues Dos Santos Santos *et al.*, 2023).

Os resultados deste estudo demonstram que as sementes das variedades predileta e Rubelita de *Oryza sativa* L., 1753, carregam fungos saprófitas e fitopatogênicos, possuindo a capacidade de disseminar patógenos importantes para outras culturas de gramíneas de potencial econômico, esses achados ressaltam a importância do controle efetivo dos fungos fitopatogênicos em sementes de arroz, visando à preservação da segurança alimentar e do desempenho econômico das culturas de gramíneas (Xia *et al.*, 2019; Jana *et al.*, 2023).

2.5 CONCLUSÃO

As sementes de *Oryza sativa* L., 1753, das variedades Rubelita e Predilera, apresentaram uma diversidade de gêneros de fungos fitopatogênicos, incluindo *Bipolaris oryzae*, *Fusarium sp.*, *Curvularia*, *Aspergillus*, *Penicillium* e *Rhizopus*. Alguns desses fungos são saprófitos ou associados ao armazenamento, podendo, no entanto, causar a depreciação de grãos e sementes. Os resultados obtidos confirmam a relevância da análise sanitária das sementes, uma vez que a presença de fungos fitopatogênicos pode comprometer a qualidade das sementes e reduzir o potencial germinativo, além de favorecer a disseminação de doenças nas lavouras. A identificação desses patógenos é essencial para o desenvolvimento de estratégias eficazes de manejo, incluindo o uso de tratamentos químicos ou biológicos, visando garantir a sanidade e o rendimento das culturas de arroz.

REFERÊNCIA

ATUNGULU, G. G. *et al.* Postharvest technology: Rice storage and cooling conservation. **Rice: Chemistry and Technology**, p. 517-555, 1 jan. 2019.

BANDEIRA SILVA, O. *et al.* Efeito de rizobactérias na transmissibilidade de *Curvularia lunata* em arroz de terras altas. en: **Amazônia: desafios, avanços e contribuições na Educação, Saúde e Meio ambiente**. [s.l: s.n.].

BEHERA, A. Fungal metabolites as anticancer agent and their agricultural applications. **Fungal Secondary Metabolites**, p. 259-282, 1 jan. 2024.

CHITNIS, V. R. *et al.* **Fungal endophyte-mediated crop improvement: the way ahead. Frontiers in Plant Science**, 2020.

DOS SANTOS, P. R. R. *et al.* Morphological and molecular characterization of *Curvularia lunata* pathogenic to andropogon grass. **Bragantia**, v. 77, n. 2, 2018.

DOS SANTOS, P. R. R. *et al.* Pathogenicity of fungi associate with *Andropogon grass* seeds. **Journal of Plant Pathology**, v. 104, n. 2, p. 565-573, 1 maio 2022.

FERREIRA, T. P. DE S. *et al.* Prospecção de fungos Endofíticos isolados de plantas cultiváveis e não cultiváveis e seus efeitos na quebra de dormência de sementes de *capim Andropogon L.* **DELOS: DESARROLLO LOCAL SOSTENIBLE**, v. 16, n. 43, 2023.

FRANÇA DE FREITAS, D. A. **Boas práticas agrícolas para a produção de alimentos seguros**. 1. ed. Brasília, DF: 2 Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2022.

HE, K. *et al.* *Curvularia curculiginis* causes *Curculigo orchioides* Gaertn leaf spot in China. **Crop Protection**, v. 174, p. 106426, 1 dez. 2023..

JANA, S. K. *et al.* Rice seed endophytes transmit into the plant seedling, promote plant growth and inhibit fungal phytopathogens. **Plant Growth Regulation**, v. 99, n. 2, p. 373-388 1 mar. 2023.

PÉREZ-DOMÍNGUEZ, G. *et al.* Salt stress in rice (*Oryza sativa L.*):

The role of oligogalacturonides as plant protectors. **Revista Fitotecnia Mexicana**, v. 44, n. 3, 2021. **Rices**. New Delhi: Oxford & IBH publishing Co Pvt. Ltd, 2000. p. 5-15.513.

RODRIGUES DOS SANTOS SANTOS, G. *et al.* Fungitoxic potential of essential oils from cerrado plants in the control of phytopathogens *Curvularia lunata* and *Rhizoctonia solani*. **Peer Review**, v. 5, n. 15, p. 112-127, 2023.

ROY, S. C.; SHIL, P. Assessment of genetic heritability in rice breeding lines based on morphological traits and caryopsis ultrastructure. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, 2020.

SANDOVAL-MARTÍNEZ, M. I. E. *et al.* Fungi associated to rice grain discoloration: a review. **Revista Fitotecnia Mexicana**, v. 45, n. 4, 2022.

SCHEUERMANN, K. K.; NESI, C. N. Chemical control of blast and brown spot in irrigated rice crop. **Summa Phytopathologica**, v. 47, n. 3, 2021.

SILVA, W. R. DA *et al.* Morphogenetic variability, cultural characteristics, aggressiveness, and transmission of *Bipolaris oryzae* isolates in Rio Grande do sul. **Brazilian Journal of Development**, v. 8, n. 9, 2022.

XIA, Y. *et al.* Culturable endophytic fungal communities associated with plants in organic and conventional farming systems and their effects on plant growth. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 2019.

ZHANG, H.; FENG, I.; ISLAM, T.; LIU, W. DE. Integrated pest management programme for cereal blast fungus *Magnaporthe oryzae*. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 21, n. 12, p. 3420-3433, 1 dez. 2022..

3 CAPÍTULO 2 IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE BACTÉRIAS GÊNERO *BACILLUS* COM POTENCIAL FUNGICIDA CONTRA *BIPOLARIS ORYZAE*.

RESUMO

Os patógenos causadores da murcha das plantas, representam uma grande ameaça ao cultivo do arroz, devido à sua capacidade de disseminação da doença nas lavouras, o que resulta em perdas econômicas significativas para os agricultores. Nesse contexto, *Bacillus* spp. têm se destacado como um potencial fungicida biológico eficaz no controle desses patógenos. O objetivo deste trabalho foi caracterizar e avaliar o potencial antagônico de três isolados do gênero *Bacillus* no controle do fungo fitopatogênico *Bipolaris oryzae* em duas variedades de arroz resistentes, Predileta e Rubelita. A metodologia adotada incluiu análise genômica da espécie de maior potencial, *Bacillus velezensis*, cujo genoma foi sequenciado. Na caracterização bioquímica, foram empregados os métodos de diluição em disco em ágar, de acordo com os protocolos padrão, para avaliar a solubilização de potássio e fósforo, bem como a atividade enzimática de amilase, catalase, celulase e protease. Todos os testes apresentaram resultados positivos, exceto para Ácido Indol-Acético (AIA) e a solubilização de potássio. *B. velezensis* foi a única bactéria a demonstrar produção positiva de protease, indicando seu potencial como promotor de crescimento vegetal (BPCV). Nos testes *in vitro* contra *B. oryzae*, *Bacillus* sp. OP938255.1 e *Bacillus* sp. OP938696.1 demonstraram inibição do crescimento micelial a partir do segundo dia de incubação, atingindo 50% de inibição após sete dias. Por outro lado, *B. velezensis*, se destacou entre os isolados, apresentando 95% de atividade. Em testes *in vivo*, os três isolados mostraram um bom potencial antagonista contra o fungo, reduzindo significativamente a severidade da doença na planta da cultura Rubelita, mantendo o índice abaixo de 5%. *Bacillus* sp. OP938255 foi capaz de reduzir significativamente a severidade da doença na planta quando aplicado a concentração de $1,0 \times 10^7$, alcançando um índice menor que 1. A cultura Predileta foi mais resistente ao patógeno, apresentando pontuações acima de 4% ao

final de 5 dias, com poucas diferenças significativas entre as concentrações, independente da espécie antagonista. Quanto à caracterização molecular de *B. velezensis* foi observado a geração de 6.310.092 leituras de extremidade emparelhada. O tamanho do genoma foi estimado em 3.913.362 pb, com um conteúdo médio de G+C de 46,51%. Na análise AntiSMASH, foram detectados genes relacionados à biossíntese de peptídeos ribossômicos e antifúngicos, como plipastatina, micosubtilina, surfactina, fengicina e bacilomicinas, que suprimem conídios de fungos patogênicos. Esses resultados indicam que *B. velezensis*, *Bacillus sp. OP938255.1* e *Bacillus sp. OP938696.1* representam fontes promissoras de biocontrole contra fungos patogênicos, oferecendo uma alternativa sustentável aos agroquímicos, ao suprimir patógenos e promover o crescimento das plantas.

Palavras-chave: Controle biológico. *Bacillus velezensis*. Fitopatógeno.

ABSTRACT

Plant wilt pathogens pose a major threat to rice cultivation due to their ability to spread disease in crops, resulting in significant economic losses for farmers. In this context, *Bacillus* spp. have emerged as a potential biological fungicide that is effective in controlling these pathogens. In this context, *Bacillus* spp. have emerged as a potential biological fungicide effective in controlling these pathogens. The objective of this study was to characterize and evaluate the antagonistic potential of three isolates of the genus *Bacillus* in controlling the phytopathogenic fungus *Bipolaris oryzae* in two resistant rice varieties, Predileta and Rubelita. The methodology adopted included genomic analysis of the species with the greatest potential, *Bacillus velezensis*, whose genome was sequenced. In the biochemical characterization, agar disk dilution methods were used, according to standard protocols, to evaluate potassium and phosphorus solubilization, as well as the enzymatic activity of amylase, catalase, cellulase and protease. All tests showed positive results, except for Indole-Acetic Acid (IAA) and potassium solubilization. *B. velezensis* was the only bacterium to demonstrate positive protease production, indicating its potential as a plant growth promoter (PGP). In *in vitro* tests against *B. oryzae*, *Bacillus* sp. OP938255.1 and *Bacillus* sp. OP938696.1 demonstrated inhibition of mycelial growth from the second day of incubation, reaching 50% inhibition after seven days. On the other hand, *B. velezensis* stood out among the isolates, presenting 95% activity. In *in vivo* tests, the three isolates showed good antagonistic potential against the fungus, significantly reducing the disease severity in the Rubellite crop plant, maintaining the index below 5%. *Bacillus* sp. OP938255 was able to significantly reduce the disease severity in the plant when applied at a concentration of 1.0×10^7 , reaching an index lower than 1. The Predileta culture was more resistant to the pathogen, presenting scores above 4% after 5 days, with few significant differences between concentrations, regardless of the antagonistic species. Regarding the molecular characterization of *B. velezensis*, the generation of 6,310,092 paired-end reads was observed. The genome size was estimated at 3,913,362 bp, with an average G+C content of 46.51%. In the AntiSMASH analysis, genes related to the biosynthesis of ribosomal peptides and antifungals, such as plipastatin, mycosubtilin, surfactin, fengycin and bacillomycins, which suppress conidia of pathogenic fungi, were detected. These results indicate that *B. velezensis*,

Bacillus sp. OP938255.1 and *Bacillus* sp. OP938696.1 represent promising sources of biocontrol against pathogenic fungi, offering a sustainable alternative to agrochemicals by suppressing pathogens and promoting plant growth.

Keywords: Biological control. *Bacillus velezensis*. Phytopathogen.

3.1 INTRODUÇÃO

A doença da mancha marrom do arroz (*Oryza sativa* L.) causada pelo fungo *Bipolaris oryzae* é uma das principais doenças fúngicas que afetam a produção de arroz em todo o mundo (Marwein *et al.*, 2022). A infecção do arroz pelo *B. oryzae* pode ocorrer por meio da germinação de sementes infectadas, ou por correntes de ar que espalham os esporos do fungo, o qual entra nas células da planta por meio da abertura dos estômatos ou da penetração direta com conídios (Marwein *et al.*, 2022). O uso de variedades resistentes da planta é a principal medida de controle de doenças nas lavouras, mas a oferta dessas variedades é escassa. Portanto, a aplicação foliar de fungicidas surgiu como alternativa, esta estratégia é comumente usada para reduzir os danos causados por fitopatógenos de final de ciclo, além de aumentar a produtividade e preservar a qualidade das sementes (Khoshru *et al.*, 2023).

A preocupação global em reduzir o uso de fungicidas químicos, motivou a implementação de diferentes estratégias dentro dos programas de Manejo Integrado de Pragas, tais como o uso de microrganismos antagônicos (Archana *et al.*, 2022). O uso indiscriminado de agroquímicos para o controle de doenças de plantas cultivadas perturba o equilíbrio ecológico dos microrganismos do solo, levando ao desenvolvimento de cepas resistentes do patógeno, assim como à contaminação de águas subterrâneas e a riscos evidentes para a saúde humana (Archana *et al.*, 2022). Para o controle de doenças associadas ao arroz (*Oryza sativa* L.) em condições irrigadas, uma alternativa é o uso de microrganismos bacterianos do gênero *Bacillus*, que têm um amplo espectro de atividade antimicrobiana contra bactérias fitopatogênicas, fungos e vírus (Singha; Pandey, 2023). O *Bacillus velezensis* é uma bactéria Gram-positiva, aeróbica, formadora de endósporos e tem sido amplamente utilizada como agente de biocontrole na agricultura (Vu *et al.*, 2023).

B. velezensis abriga uma série de nove grupos de genes que funcionam para produzir um espectro de metabólitos secundários bioativos. Cinco desses nove grupos de genes (srf, bmy, fen, nrs e dhb) estão envolvidos na síntese de moléculas de lipopeptídeos cíclicos, como surfactina, bacilomicina-D, fengicina, um peptídeo desconhecido e o sideróforo de ferro bacibactina (Ley-López *et al.*, 2022). Enquanto

isso, três outros grupos de genes (*mln*, *bae* e *dfn*) direcionam a síntese de policetídeos antibacterianos, como macrolactina, bacileno e difficidina, e o último grupo de genes direciona a síntese e a exportação do dipeptídeo antibacteriano bacilisina (Li *et al.*, 2020).

Outra característica importante é que, na rizosfera, as plantas criam ambientes que são benéficos do ponto de vista nutricional e físico-químico para a microbiota da raiz, liberando continuamente uma variedade de moléculas orgânicas. Algumas dessas moléculas atuam como sinais químicos que atraem bactérias móveis para se moverem em direção à superfície da raiz (ou seja, quimiotaxia), favorecendo assim a formação de biofilmes que são camadas de células que vivem em superfícies líquidas ou sólidas em uma superfície pegajosa (Marwein *et al.*, 2022). Trata-se de uma matriz autoproduzida de substâncias extracelulares poliméricas extracelulares hidratadas. Essas substâncias poliméricas extracelulares são compostas de polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos e lipídios. Dentre as funções dos biofilmes, estão facilitar a estabilidade celular, adesão, coesão, interconexão e imobilização transitória das células (Choi; Nam; Seo, 2021).

A análise genômica revelou que a *B. velezensis* tem grupos específicos de genes relacionados à biossíntese de metabólitos secundários, que desempenham papéis significativos na supressão de patógenos e na promoção do crescimento das plantas (Wang *et al.*, 2024). Mais especificamente, apresenta uma alta taxa de redes de interação complexa de genes, que funcionam para produzir um espectro de metabólitos secundários bioativos (Choi; Nam; Seo, 2021).

O *B. velezensis* demonstra uma elevada capacidade genética para a síntese de lipopeptídeos cíclicos e policetídeos como macrolactina, bacileno e difficidina. Os metabólitos secundários produzidos por *B. velezensis* também podem desencadear resistência sistêmica induzida em plantas, um processo pelo qual as plantas se defendem contra ataques recorrentes de microrganismos virulentos (Liu; Li; wu, 2022).

Nesse contexto, a análise genômica é uma ferramenta poderosa para a identificação de genes responsáveis pela codificação de enzimas antimicrobianas e antifúngicas. Por esse motivo, este estudo visa avaliar o potencial antagônico de isolados de *Bacillus* contra o fungo fitopatogênico *Bipolaris oryzae*.

3.2 METODOLOGIA

3.2.1 Origem e cultura

As cepas bacterianas de *Bacillus* foram disponibilizadas pelo laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal de Tocantins, campus de Gurupi, Chácara 69-72 Rua Badejos, Lote 7 s/n Câmpus - Jardim Sevilha, Gurupi - TO, 77410-530, e foram subsequentemente avaliadas contra o fungo *Bipolaris oryzae*, que está associado às sementes de *Oryza sativa*; L., 1753. As cepas bacterianas foram identificadas como *Bacillus* com base em suas bordas irregulares, achatadas, coloração branco-escura, aspecto brilhante, farinhento, ceroso, seco ou cremoso.

Essas cepas foram isoladas em meio de cultura (Potato Dextrose Agar) PDA para fins de purificação. Em seguida, foram diluídas em série, devidamente rotuladas, incubadas a 28°C e observadas diariamente por cinco dias para verificar a ausência de contaminação. Posteriormente, realizou-se coloração de Gram para determinar se as bactérias eram Gram positivas, utilizando-se a metodologia padrão (Larrea; Falconi; Arcos, 2015).

3.2.2 Caracterização molecular

3.2.2.1 Sequenciamento de produtos de pcr - *Bacillus* sp

A extração de DNA foi realizada de acordo com os protocolos descritos por Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual, (Wood, 1983) com algumas modificações. A identificação dos isolados a nível de gênero foi realizada por meio da análise da sequência de nucleotídeos do gene 16S rRNA. A amplificação do gene foi realizada por PCR utilizando os seguintes primers oligonucleotídicos: 1492r (5' TACCTTGTTACGACTT) e 27f (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG).

A reação de amplificação foi conduzida em termociclador (Hangzhou Bioer Technology Co LTDA™) com o seguinte programa: desnaturação inicial a 94 °C por 3 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento

a 51,3°C por 1 minuto e 30 segundos, extensão a 72 °C por 1 minuto e 30 segundos, e uma extensão final a 72 °C por 10 minutos.

O DNA genômico foi purificado a partir de culturas de pureza controlada utilizando o kit de purificação de DNA genômico Promega wizard® (A2360), seguindo as instruções do pelo método de Neighbor- Joining com parâmetro Jukes-Cantor e Bootstrap de 1000 réplicas. 748 os dados foram depositados no banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology 749 Information - <http://ncbi.nlm.nih.gov>) por meio do BLASTn.

3.2.2.2 *Preparação e sequenciamento da genômico do isolado Bacillus velezensis*

A Extração de DNA foi pelo Kit de Extração Comercial Comercial (GoTaq® qPCR and RT-qPCR Systems). Para garantir a confiabilidade dos dados, o controle de qualidade (CQ) é realizado em cada etapa do procedimento. O DNA genômico foi cortado aleatoriamente em fragmentos curtos. Os fragmentos obtidos foram reparados nas extremidades com uma cauda poli-A e posteriormente ligados aos adaptadores Illumina. Os fragmentos com adaptadores foram selecionados por tamanho, amplificados por PCR e purificados.

A identificação a nível de espécie do isolado, bem como a filogenia baseada no genoma deste, foi feita a partir de hibridização DNA-DNA digital de seu genoma (do inglês, digital DNA-DNA hybridization, dDDH) com o site Tygs (do inglês, Type Strain Genome Server, (Meier-Kolthoff; Göker, 2019). A completude do genoma foi avaliada com o programa Busco v 5.4.3 contra a lista de genes ortólogos da ordem Bacillales. A predição de plasmídeos foi feita com Mob-suite v 2.0 (Robertson; Nash, 2018).

Para a anotação do genoma, foi usado o programa Prokka 1.14.6 (Seemann, 2014). Com o arquivo fasta das proteínas codificadas obtido a partir da anotação, foi feita busca de homólogos no site BlastKOALA (<https://www.kegg.jp/blastkoala/> Kanehisa *et al.*, 2016) Com a lista de números KO obtida, a reconstrução de vias metabólicas preditas a partir do genoma foi feita a partir no site KEGG mapper (Kanehisa; Sato; Kawashima, 2022), (<https://www.genome.jp/kegg/mapper/>),. A confirmação dos genes para biossíntese de moléculas com atividade antifúngica, bem

como a sua localização no genoma, foi feita pelo site Antismash em sua modalidade para bactérias (Blin *et al.*, 2023).

3.2.3 Caracterização bioquímica para atividades de promoção do crescimento de plantas

3.2.3.1 Amostras

Os isolados de *Bacillus* foram disponibilizados pelo laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal do Tocantins (UFT), campus de Gurupi, 11°44'53" S e 49°03'07" E, e a cultura de arroz (*Oryza sativa*; L., 1753) foi disponibilizada pelo Departamento de Entomologia da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil. 20° 45` 39`` S - 42° 52` 13`` W 658m. Os estudos foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular e casa de vegetação da Universidade Federal do Tocantins, campus de Gurupi, Brasil.

3.2.3.2 Amilase

Os isolados bacterianos foram cultivados em ágar amido (g-L -1 : 10,0 peptona, 5,0 786 extrato de levedura, 5,0 NaCl e 2,0 amido, 15,0 ágar; pH 6,9). As placas foram incubadas a 28 °C por 48 h e inundadas com solução de iodo de Lugol. Um resultado positivo foi determinado a partir de uma zona clara ao redor da colônia após 30 minutos (Khvedelidze *et al.*, 2017).

3.2.3.3 Solubilização de fósforo

As culturas bacterianas foram cultivadas em caldo de nutrientes por três dias a 28 °C ± 2 e sob agitação constante a 150 rpm. Para avaliar a eficiência da solubilização do fosfato de ferro, o meio MS líquido foi usado para solubilização e o método colorimétrico de Murphy & Riley foi usado para determinar o fósforo solubilizado. Uma mudança de cor de roxo para amarelo foi determinado como critério para um resultado positivo (Luiz *et al.*, 2021).

3.2.3.4 Ácido indolacético (IAA)

As culturas bacterianas foram cultivadas em caldo Luria Bertani (LB) com 100 mg/l de triptofano como precursor do IAA e incubadas em um agitador a 200 rpm a 28 °C por 5 dias. 50 µl de culturas bacterianas solubilizadoras de fosfato foram inoculadas em placas de Petri contendo caldo nutritivo suplementado com 5 mg/mL de triptofano e incubadas a 37 °C por 72 horas. A produção de IAA foi determinada pela mistura de 1 mL de bactérias em 2 mL do reagente de Salkowski (FeCl₃ · 6H₂O - 2% e HClO₄ - 37%) em placas de Petri, incubadas no escuro por 12 h para desenvolver o complexo rosa-avermelhado. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e o caldo de nutrientes simples com triptofano foi usado como controle. A presença de cor rosa indica um resultado negativo para a produção de IAA (Pathak *et al.*, 2019).

3.2.3.5 Catalase

As culturas bacterianas foram cultivadas em caldo Luria Bertani (LB), Catalase: o pH foi ajustado para 7,0 a 28 °C por 48 horas e, em seguida, examinado quanto à reação de Gram e formação de endosporos; 1 ml de H₂O₂ a 3% foi adicionado diretamente a uma cultura de ágar densamente inoculada em tubos de ensaio; foi observada a formação imediata de bolhas (resultado positivo) (Dong *et al.*, 2022).

3.2.3.6 Celulase

Os isolados bacterianos foram cultivados em meio pouco enriquecido (MM) suplementado com carboximetilcelulose (CMC) (1 L: 1 g de glicose, 2,5 g de extrato de levedura, 1 % de CMC, 15 g de ágar). As placas foram incubadas a 28 °C por 48 horas, a seguir coradas com corante vermelho Congo. A formação de halo amarelo foi observada como indicado de produção de celulase (Carhuapoma-Delacruz *et al.*, 2022).

3.2.3.7 Produção de protease

Os isolados bacterianos foram testados quanto à sua capacidade de produzir enzimas proteolíticas em ágar de leite desnatado em meio SMA (3% v/v). O diâmetro da zona clara formada ao redor da colônia bacteriana positiva foi medido após 48 horas de incubação a 28 °C (Moon *et al.*, 2021).

3.2.4 Bioensaio antagonista in vitro

Para o estudo do efeito antagonista de *B. velezensis* - *Bacillus* sp. OP938255.1 e *Bacillus* sp. OP938696.1, foi realizado experimento in vitro, utilizando o método do círculo. Inicialmente, os isolados de estas bactérias foram cultivados em meio de cultura BDA por 48 horas durante sete dias a 28 °C, após este período de cultivo transferiu-se assepticamente para placas de petri de 90 mm com meio sólido BDA, para o fungo, um disco de 6,0 mm, foi cortado de uma placa com crescimento ativo do fungo e colocado num lado da placa Petri (Bulhoes; Melo; Shiomi, 2019).

Para comparação com os isolados previamente descritos e purificados, uma alíquota de 0,5 ul de cada pre inoculo bacteriano foi inoculada por meio de medida de densidade óptica, em seguida espalhada com uma placa de platina, posteriormente um disco de 5 mm com o fungo *Bipolaris oryzae*, que é o fitopatógeno de interesse, previamente cultivado em meio BDA, foi adicionado à mesma placa. Para determinar a inibição, o diâmetro das colônias foi medido em duas direções diametralmente opostas usando um paquímetro.

Todos os experimentos foram realizados em quatro réplicas, o crescimento radial dos foi medido em intervalos de 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas; a porcentagem de inibição calculada usando a seguinte equação: $I\% = [(C-T) / C] \times 100$, em que I% = porcentagem de inibição do crescimento micelial, C= crescimento radial de fungos na placa de controle (mm) e T= crescimento radial de fungos na placa inoculada com bactérias (mm) (Alejandra *et al.*, 2022). Os tratamentos que não inibiram o crescimento receberam um valor igual a zero, definindo uma média para cada colônia, sendo que cada placa constitui uma unidade experimental (Rejón-Martínez *et al.*, 2022).

3.2.5 Análise da massa seca e da massa fresca

A parte aérea das plantas de arroz foi coletada 55 dias após a germinação DAE (estágio R) no estágio vegetativo. Em seguida, o material vegetal foi seco em uma estufa a 65 °C até atingir peso constante e, posteriormente, foi pesado em uma balança analítica para determinar a massa seca da parte aérea e da raiz. Os resultados foram expressos em gramas.

3.2.6 Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados por meio de análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) usando o software GraphPad Prisma versão 8.0.1.

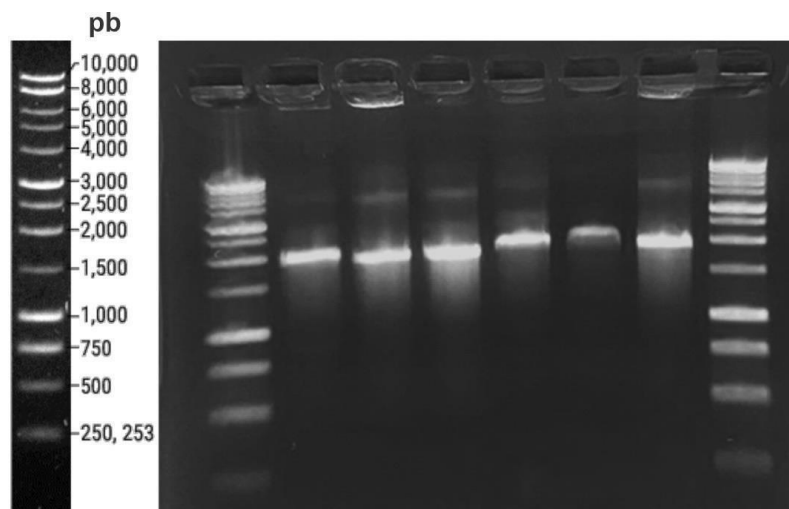
3.3 RESULTADOS

3.3.1 Caracterização molecular

3.3.1.1 Sequenciamento de produtos de PCR

A identificação de microrganismos por meio do sequenciamento do rDNA foi comparada com o GenBank NCBI, onde a imagem do gel de agarose revelou a presença da banda amplificada de 16S-DNA para o isolado bacteriano *Bacillus*, utilizando os primers contra o gene rRNA 16S. Para cada isolado, a eletroforese em gel de agarose apresentou bandas de amplificação de cerca de 1500pb, o que é o esperado para os amplicons desta reação Figura 2.

Figura 2-Gel de agarose banda amplificada de 16S-DNA para o isolado bacteriana *Bacillus*.



A análise filogenética do RNA ribossômico 16S (aproximadamente 1168 bp) agrupou seis bactérias no clado *Bacillus* sp. comumente isolado do solo, enquanto os outros grupos de 912 bactérias apresentam alta similaridade filogenética entre si Tabela 2 y Figura 3.

A Tabela 2 apresenta a identificação de microrganismos por sequenciamento de rDNA 16S comparados ao GenBank NCBI. A amostra OQ725688.1 foi identificada como *Bacillus* sp. (grupo *B. velezensis*) com similaridade de 98,95% para *B. tropicus* e *B. nitratreducens*, e cobertura de 99% (1147 pb). A amostra

OP938255.1 foi identificada como *Bacillus sp.* (grupo *B. subtilis*) com similaridade de até 99,78% e cobertura de 100% (1394 pb).

4°.

Tabela 2-Identificação de microrganismo por sequenciamento de rDNA 16S como gênero *Bacillus* em comparação com o GenBank NCBI.

Amostra:	Classificação taxonômica
OQ725688.1	
Identificação	<i>Bacillus sp. (B. Velezensis group)*</i>
Classificação	<i>Bacillus sp group</i>
Taxonômica (NCBI)	
Similaridade	<i>Bacillus tropicus</i> 98,95%; <i>Bacillus nitratireducens</i> 98,95%;
	<i>Bacillus paramycoides</i> 98,86%
Cobertura	99% (1147 pares de bases)
Amostra:	Classificação taxonômica
OP938255.1	
Identificação	<i>Bacillus sp. (Bacillus subtilis group)*</i>
Classificação	<i>Bacillus sp group</i>
Taxonômica (NCBI)	
Similaridade	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> 99,78%; <i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> 99,78%; <i>Bacillus</i> <i>vallismortis</i> 99,71% ou <i>Bacillus siamensis</i> 99,50%;
Cobertura	100% (1394 pares de bases)

Os valores de cepas tipo do "complexo de espécies *Bacillus sp.*" Os ramos principais da árvore indicam diferentes grupos de espécies, com valores de bootstrap representados nos nós. As informações adicionais ao lado, como o esquema de cores e as legendas associadas, fornecem dados sobre a origem, características morfológicas e status de tipo de cada cepa. Isso permite observar as relações evolutivas e genéticas entre as espécies, assim como a confiabilidade de cada agrupamento, dada a repetição da análise 1000.

3.3.1.2 Sequenciamento e controle de qualidade

O controle de qualidade foi a próxima etapa para obter os dados para a geração do genoman completo da bactéria *B. velezensis*, com uma qualidade média de mais de 37 em escala phred, de modo que a porcentagem de acuracia é de 99,88 e

uma porcentagem de erro de 0,03, em termos de DNA genômico $\geq 20 \mu\text{L}$; sem degradação e sem contaminação, de modo que se pode concluir que os resultados de qualidade são ideais para a análise e o desenvolvimento de testes *in vitro* e *in vivo* Figura 4.

Figura 3- Árvore filogenética construída a partir das sequências do gene *rpoB* das cepas tipo do "complexo de espécies *Bacillus sp.*" pelo método de união de vizinhos (usando o bootstrap (%) são dados para os nós obtidos pela repetição da análise 1000 vezes).

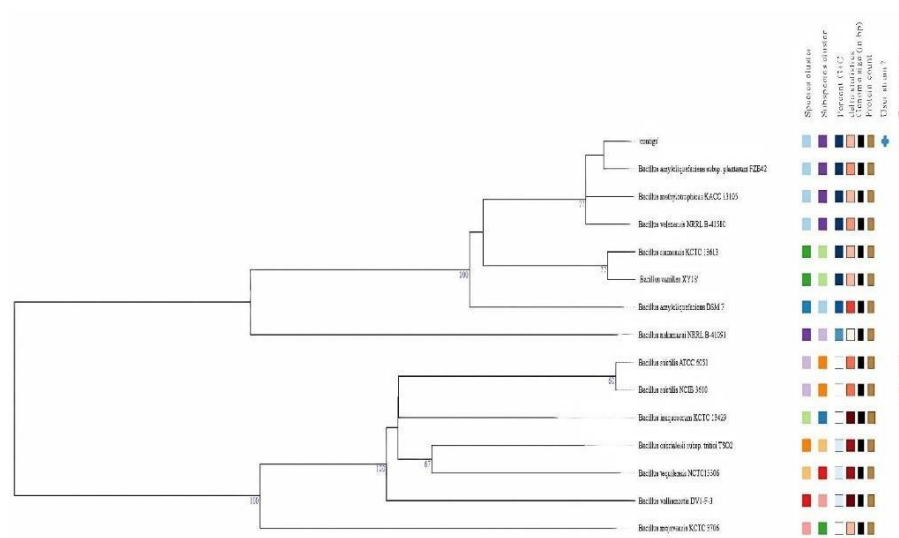
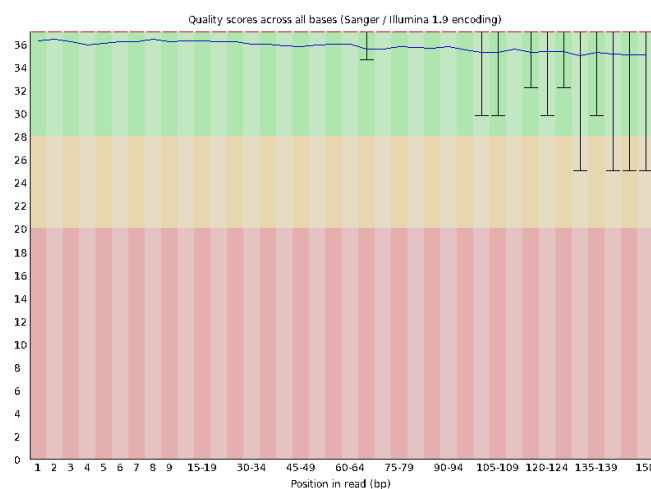


Figura 4- Análise de qualidade realizada pelo software FastQC para leituras brutas do genoma de *B. velezensis* (bactéria promotora de crescimento de plantas e controle biológico de fungos patogênicos de plantas). Os parâmetros básicos de qualidade são mostrados na parte superior. O eixo X corresponde à posição de cada base em uma sequência e o eixo Y ao valor de qualidade Q. As cores representam a qualidade de acordo com os valores de Q, alta em verde (Q maior ou igual a 30), intermediária em amarelo (Q menor que 30 maior que 20) e baixa em vermelho (Q menor que 20)



A análise do genoma de *B. velezensis* revela um total de 3.913.362 pares de bases (bp) e 6.310.092 leituras de extremidade emparelhada. Este organismo apresenta um conteúdo de G+C de 46,51%, o que sugere uma estabilidade genética moderada. Foram identificados 92 tRNAs e 7 rRNAs, juntamente com 3.747 regiões codificantes (CDS), indicando um potencial significativo para a síntese de proteínas. Notavelmente, não foram detectados plasmídeos, o que pode implicar uma menor capacidade de transferência horizontal de genes neste microrganismo Tabela 3.

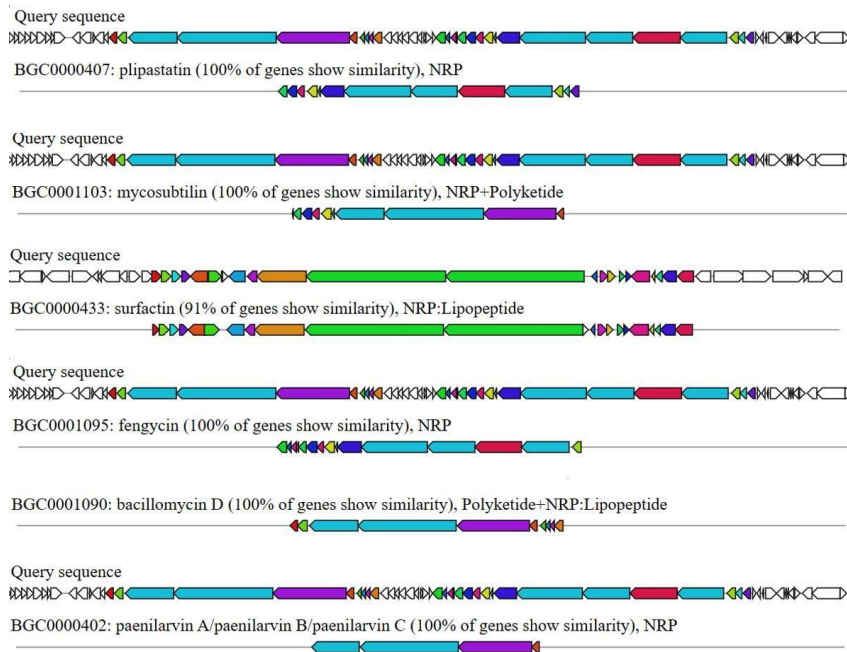
Tabela 3-Estatísticas básicas do genoma da bactéria *B. velezensis*, 6.310.092 leituras de extremidade emparelhada, O tamanho total do genoma foi estimado em 3.913.362 bp , com um conteúdo médio de G+C de 46,51%, e nenhum plasmídeo foi detectado.

Tamanho do genoma	Número de tRNAs	Número de rRNAs	Número de regiões codantes (CDS)	Conteúdo GC
3913362	92	7	3747	46.51%

3.3.1.3 Genes associados à patogenicidade do *Bacillus velezensis*

Os grupos de genes relacionados à biossíntese de peptídeos não ribossômicos com atividade 948 antifúngica foram encontrados em clusters completos de genes para esses peptídeos, os quais 949 são mostrados na Figura 5.

Figura 5– Representação esquemática da regulação gênica dos genes relacionados à biossíntese de peptídeos não-ribossômicos com atividade antifúngica (plipastatina, micosubtilina, surfactina, fengicina, bacilomicina, paenilarvina)



3.3.1.4 Análises de bioinformática do genoma da bactéria *Bacillus velezensis*

O genoma completo de *Bacillus velezensis* foi sequenciado, o que revelou a presença de grupos de genes responsáveis pela produção de várias substâncias antimicrobianas e antifúngicas, incluindo *plipastatina*, *micosubtilina*, *surfactina*, *fengicina*, *bacilomicina* e *paenilarvina*. Essas descobertas representam um grande avanço em nossa compreensão da biossíntese de polissacarídeos extracelulares em *Bacillus velezensis*. As valiosas informações obtidas com a sequência do genoma são apresentadas em detalhes na figura 4, fornecendo uma visão geral abrangente.

3.3.1.5 Caracterização bioquímica das atividades de promoção do crescimento vegetal.

As bactérias promotoras de crescimento de plantas (PGPB) são reconhecidas como uma das abordagens mais promissoras e ecologicamente corretas para estimular o crescimento das plantas. Esses microrganismos desempenham um papel fundamental na fixação de nitrogênio, solubilização de fósforo e produção de hormônios como o ácido indolacético e as giberelinas. Eles também atuam no controle biológico, oferecendo uma abordagem amplamente utilizada para melhorar a produtividade agrícola (Pandey; Bhattacharya; Pandey, 2023).

O isolado *B. velezensis* apresentou a maior atividade bioquímica nos testes realizados, com resultados positivos para a produção de amilase, solubilização de fósforo, catalase, celulose e protease, bem como resultados negativos para ácido indol acético (IAA) e solubilização de potássio. *Bacillus sp.* OP938255.1 e *Bacillus sp.* OP938696.1 apresentaram resultados semelhantes, com a diferença de que não houve produção de protease, o que é evidente na Tabela 4.

Tabela 4-Avaliação da produção de metabólitos promotores de crescimento por isolados de *Bacillus spp.*, categorizados como positivos (+) ou negativos (-) com base em sua atividade enzimática.

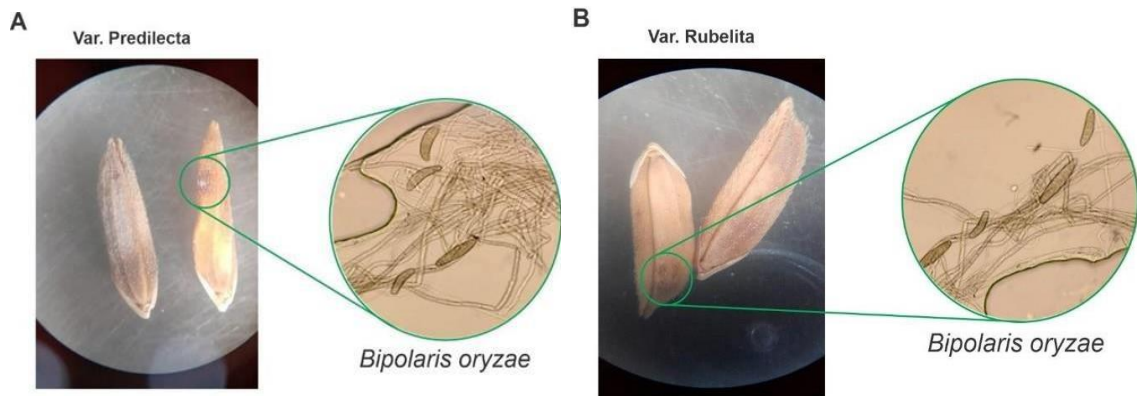
Número de isolados	Isolado	Amilase	Solubilização de fósforo	Ácido indol acético (IAA)	Catalase	solubilização de potássio	Celulase	Produção de protease
1	<i>Bacillus velezensis</i>	+	+	-	+	-	+	+
2	<i>Bacillus sp.</i> OP938255.1	+	+	-	+	-	+	-
3	<i>Bacillus sp.</i> OP938696.1	+	+	-	+	-	+	-

3.3.2 Caracterização morfológica do patógeno

Ao analisar as características do *Bipolaris oryzae* no microscópio, observa-se a presença de conídios característicos desse gênero, lesões pequenas, arredondadas e marrom-claras, durante a expansão, essas lesões assumem uma forma circular ou oval e tornam-se marrom-escuro ou marrom-avermelhadas, as lesões maiores, geralmente de formato circular, têm uma região central marrom-clara ou cinza, delimitada por bordas marrom-clara ou cinza.

A cor dos conidióforos varia de marrom a preto, sendo mais clara no ápice, estruturas septadas, retas ou flexíveis, às vezes geniculadas na parte superior podem ser simples ou ramificados, os conídios são hialinos quando imaturos e tornam-se marrons quando maduros, eles podem ser encontrados isoladamente ou em grupos, em quanto o tamanho, os conídios têm de 6 a 8 mm de comprimento Figura 6.

Figura 6- Colônia de fungos crescendo em sementes da variedade Prediletae na variedade rubelita com germinação dispersa de esporos (A); e esporos do fungo *Bipolaris oryzae* mostrando a forma, a elevação, a textura e a cor do micélio (B), , visualização com microscopia óptica . Objetiva 40X



3.3.3 Bioensaio antagonista *in vitro*

As Figuras 7 e 8 apresentam os resultados do confronto *in vitro* de diferentes isolados de *Bacillus* durante um período de sete dias. A avaliação dos halos de inibição dos fungos começou 48 horas após a incubação dos fungos *Bacillus* e *Bipolaris oryzae* em meio BDA (ágar batata dextrose). Na placa de Petri contendo o controle, conforme demonstrado pelos resultados estatísticos na Figura 7 e visualmente na Figura 8, foi possível observar que o fungo fitopatogênico *B. oryzae* cobriu 20% da superfície da placa de Petri de 90 mm de diâmetro nos primeiros três dias após o início do experimento e atingiu 70% de toda a superfície da placa após sete dias de experimento.

Quanto às outras placas contendo os *Bacillus* antagonistas, elas conseguiram inibir o crescimento do fungo no segundo dia após a incubação e, após sete dias de avaliação, foi possível que os antagonistas conseguiram inibir completamente o crescimento micelial do fungo, conforme mostrado na Figura 7 assim como na Figura 8 A, B, C e D, respectivamente *B. Velezensis* e *Bacillus sp* se mostraram muito eficazes na inibição do crescimento do fungo

B. oryzae desde o primeiro dia de confronto *in vitro* Figura 7. Os resultados indicam a

eficácia dos isolados de *Bacillus* na inibição do crescimento do fungo patogênico, sugerindo seu potencial como agentes de biocontrole.

Figura 7-Confronto *in vitro* de *Bacillus* durante sete dias de avaliação: (A) controle; (B) *B. velezensis* contra o fungo *Bipolaris oryzae*; (C) *Bacillus* sp. OP938255.1 contra o fungo *B. oryzae*; (D) *Bacillus* sp. OP938696.1 contra o fungo *B. oryzae*

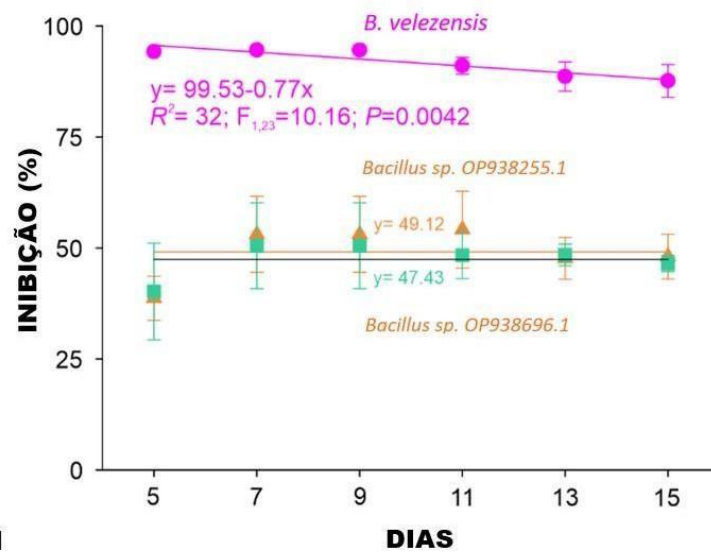
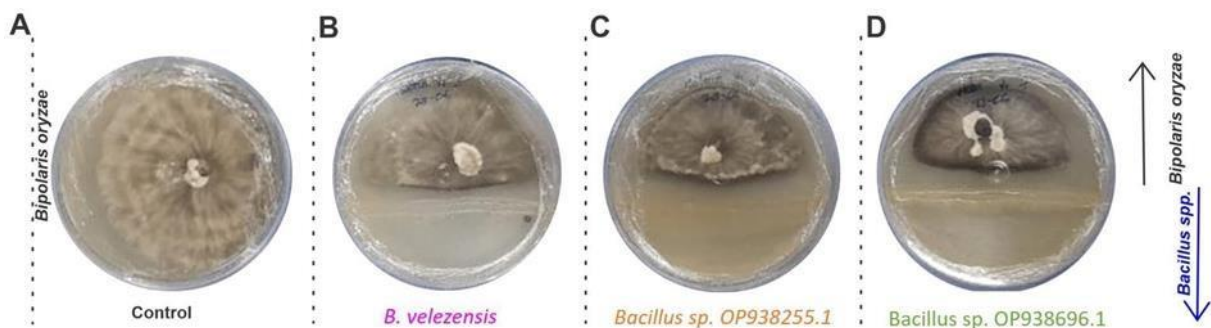


Figura 8-Confronto *in vitro* de *B. Velezensis* e *bacillus* sp durante sete dias de avaliação: (A) controle; (B) *B. velezensis* contra o fungo *B. oryzae*; (C) *Bacillus* sp. OP938255.1 contra o fungo *B.oryzae*; (D) *Bacillus* sp OP938696.1 contra o fungo *Bipolaris oryzae*



3.3.4 Bioensaio *in vivo*

Os três isolados antagonistas *B. Velezensis*, *Bacillus* sp. OP938255.1 e

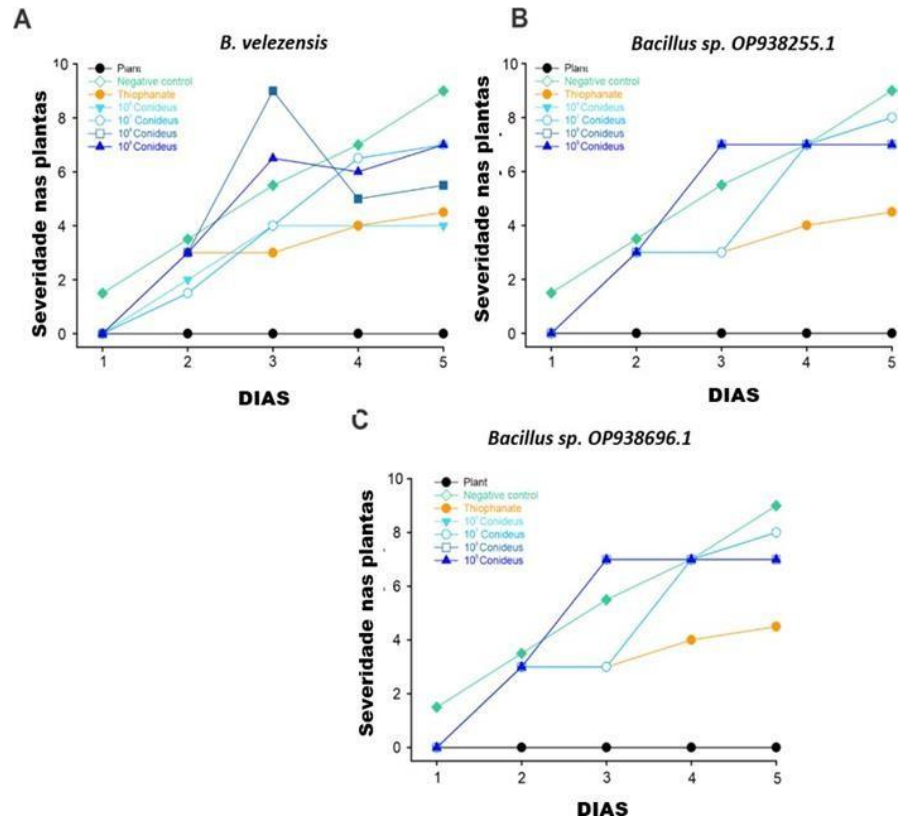
Bacillus sp. OP938696. 1 foram cultivados em meio LB (Luria-Bertani) em quatro concentrações diferentes ($1,0 \times 10^6$ UFC/mL, $1,0 \times 10^7$ UFC/mL, $1,0 \times 10^8$ UFC/mL, $1,0 \times 10^9$ UFC/mL), o qual inibira o crescimento do fungo fitopatogênico, o fungo foi inoculado em uma concentração de $1,0 \times 10^5$, as plantas foram inoculadas aos 55 dias de crescimento. os antagonistas mostraram inibição nas plantas em todas as quatro concentrações, protegendo-as dos sintomas fúngicos.

A inibição foi evidente e, dependendo da avaliação, foram adotados escores que variaram de 1 a 5, ou seja, a incidência do fungo foi de no máximo 25 e, na maioria das vezes, 0%. Após 5 avaliações, as pontuações não haviam mudado e possuía pouca diferença significativa entre a inoculação bacteriana. A variedade Predilecta pode ser visualizada com os resultados estatísticos na Figura 9, que mostra as variáveis de severidade nas plantas, assim como o suporte estatístico para Rubelita é mostrado na Figura 9 com as variáveis de 3 bactérias pertencentes ao grupo *Bacillus*.

A análise estatística foi então realizada para a massa seca da parte aérea entre *B. velezensis*, *Bacillus* sp. OP938255.1, *Bacillus* sp. OP938696.1 com a variedade Predileta respectivamente Figura 10, da mesma forma o teste de massa seca foi avaliado para a variedade Rubelita Figura 11.

A massa da raiz foi avaliada de acordo com os protocolos de massa seca, para a variedade Predileta os valores são mostrados na Figura 12, e para a variedade Rubelita na Figura 13.

Figura 9 - Análise de severidade da doença na variedade Predileta, considerando três espécies bacterianas e o fungicida metiltiofanato. (A) *B. Velezensis*; (B) *Bacillus* sp. OP938255.1; (C) *Bacillus* sp. OP938696.1. As linhas indicam diferentes tratamentos: controle positivo (plantas sem tratamento - barra preta), controle negativo (barra verde clara), fungicida metiltiofanato (barra laranja), e as diluições do inóculo bacteriano ($10 \times$, $10^3 \times$, $10^6 \times$ - tons de azul)

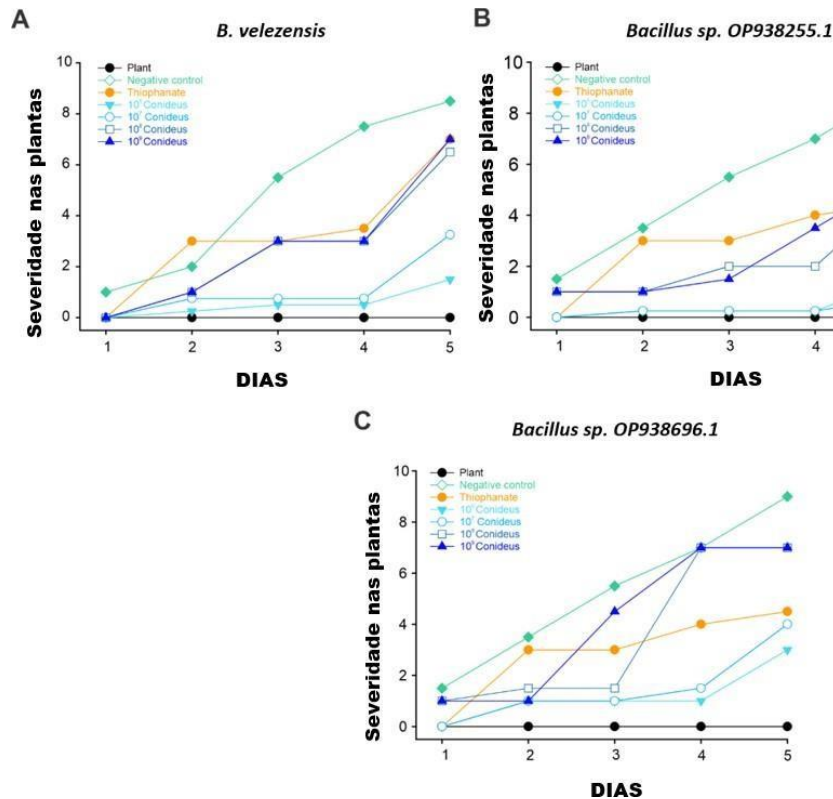


3.3.4.1 Variedade Rubelita

A presença dos sintomas do fungo fitopatogênico apareceu desde o primeiro dia, sendo que o *B. Velezensis.1* na concentração $1,0 \times 10^6$ foi o melhor controlador dos sintomas até a quarta avaliação, depois a diminuição foi leve, superando amplamente o tiofanato metílico, Figura 9B *Bacillus sp. OP938255.1* na concentração $1,0 \times 10^7$ controlou eficientemente os sintomas de severidade com índices menores que um durante todas as avaliações, Figura 9C *Bacillus sp. OP938696.1* nas concentrações $1,0 \times 10^6$ e $1,0 \times 10^7$ apresentou valores semelhantes controlando a severidade da doença sendo eficaz até a 4ª avaliação, posteriormente a severidade não ultrapassou a nota 5 sendo a concentração ótima no controle de *Bipolaris oryzae* Figura 9.

O gráfico mostra a inibição do fungo fitopatogênico (DIAS) por *B. velezensis* e duas linhagens de *Bacillus sp.* (*B. velezensis* reduz significativamente o patógeno (valores próximos a zero), enquanto as outras linhagens apresentam eficácia variável (2–5). Os dados sugerem que *B. velezensis* possui maior potencial como agente de biocontrole, devendo-se confirmar as diferenças com ANOVA ($p < 0,05$).

Figura 10-Análise de severidade da doença na variedade Rubelita, considerando três espécies bacterianas e o fungicida metiltiofanato. (A) *B. Velezensis*; (B) *Bacillus sp.* OP938255.1; (C) *Bacillus sp.* OP938696.1. As linhas indicam diferentes tratamentos, sendo: controle positivo (plantas sem tratamento - barra preta), controle negativo (barra verde clara), fungicida metiltiofanato (barra laranja), e as diluições do inóculo bacteriano ($10\times$, $10^3\times$, $10^6\times$ - tons de azul)



3.3.5 Análise de massa aérea

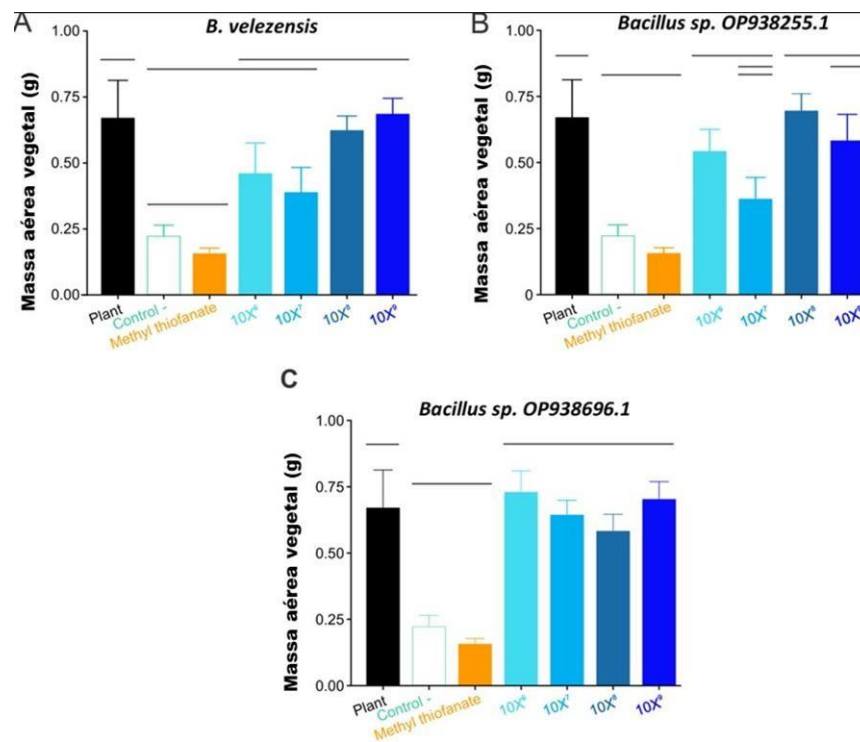
A coleta da parte aérea das plantas de arroz foi realizada aos 55 dias da germinação DAE (estádio R) em estágio vegetativo. Em seguida, o material vegetal foi seco em estufa a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ até peso constante e, pesado para a determinação da massa seca da parte aérea e massa seca da raiz.

3.3.5.1 Variedade Predileta

A massa seca aérea de *O. sativa* para predileta não foi influenciada significativamente quando tratadas com *Bacillus Velezensis* Figura 10A, *Bacillus sp.* OP938255.1 Figura 10B ou *Bacillus sp.* OP938696.1 Figura 10C. Contrariamente o tratamento químico com Methyl tiofanato reduz significativamente a massa vegeta

aérea.

Figura 11- Efeito de diferentes tratamentos na massa aérea (massa aérea vegetal) da variedade Predileta sob a influência de três espécies bacterianas e o fungicida metiltiofanato. (A) *B. Velezensis*; (B) *Bacillus* sp. OP938255.1; (C) *Bacillus* sp. OP938696.1. As barras horizontais indicam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$), sendo: controle positivo (plantas sem tratamento - barra preta), controle negativo (barra verde clara), fungicida metiltiofanato (barra laranja), e as diluições do inóculo bacteriano ($10\times$, $10^3\times$, $10^6\times$ - tons de azul)



3.3.5.2 Variedade Rubelita

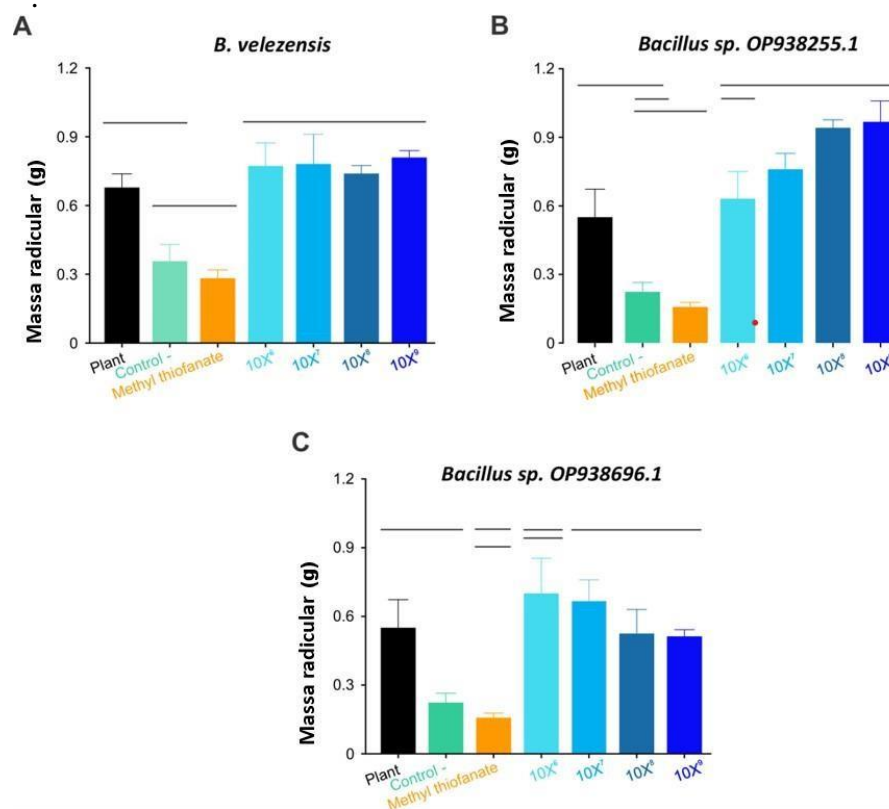
A massa seca aérea de *O. sativa* para Rubelita não foi influenciada significativamente quando tratadas com *Bacillus Velezensis* Figura 11A, *Bacillus* sp. OP938255.1 Figura 11B ou *Bacillus* sp. OP938696.1 Figura 11C. Contrariamente o tratamento químico com tiofanato metílico reduz significativamente a massa vegetal aérea.

3.3.6 Massa radicular

3.3.6.1 Variedade predileta

A massa da raiz apresentou diferenças significativas nas concentrações $1,0 \times 10^6$, $1,0 \times 10^7$, $1,0 \times 10^8$ da bactéria *Bacillus Velezensis* OQ725688 oscilando entre 0,1g e 0,2g. Figura 12B, na presença de *Bacillus sp.* OP938255, todos os tratamentos apresentaram diferenças significativas incluindo a planta de controle e o tratamento com tiofanato metílico. Figura 12C Ao contrário dos tratamentos anteriores, o *Bacillus sp.* OP938696.1 não apresentou nenhuma diferença significativa entre os quatro tratamentos, mesmo com Tiofanato metílico.

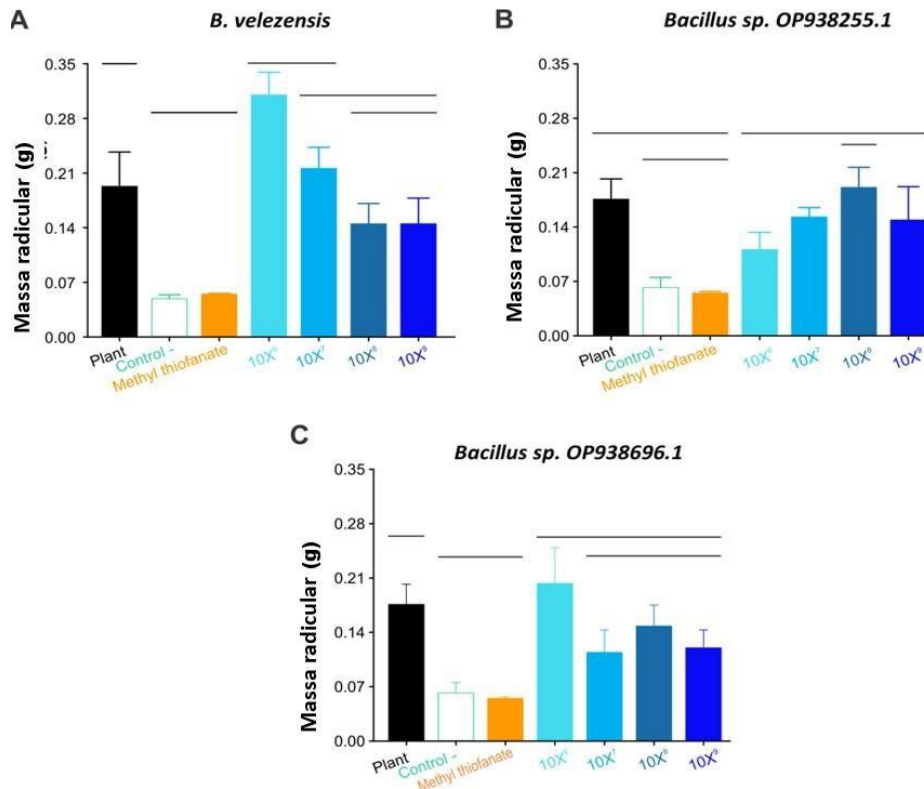
Figura 12 - Efeito de diferentes tratamentos na massa radicular (massa das raízes) da variedade Predileta sob a influência de três espécies bacterianas e o fungicida metiltiofanato. (A) *B. Velezensis*; (B) *Bacillus sp.* OP938255.1; (C) *Bacillus sp.* OP938696.1. As barras horizontais indicam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$), sendo: controle positivo (plantas sem tratamento - barra preta), controle negativo (barra verde clara), fungicida metiltiofanato (barra laranja), e as diluições do inóculo bacteriano ($10^6 \times$, $10^3 \times$, $10^6 \times$ - tons de azul)



3.3.6.2 Variedade Rubelita

A alta variabilidade entre as diferentes concentrações de *Bacillus Velezensis*, com presença de diferenças significativas que incluem tratamento com *tiofanato de metil* e grupo controle. Figura 13B a concentração $1,0 \times 10^8$ de *Bacillus sp.* OP938255 não apresentou diferenças significativas em relação aos grupos controle Figura 13C as concentrações $1,0 \times 10^7$, $1,0 \times 10^8$, $1,0 \times 10^9$ de *Bacillus sp.* OP938696.1 não apresentaram diferenças significativas com massa radicular inferior a 0,14 g.

Figura 13-Efeito de diferentes tratamentos na massa radicular (massa das raízes) da variedade Rubelita sob a influência de três espécies bacterianas e o fungicida metiltiofanato. (A) *B. Velezensis*; (B) *Bacillus sp.* OP938255.1; (C) *Bacillus sp.* OP938696.1. As barras horizontais indicam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$), sendo: controle positivo (plantas sem tratamento - barra preta), controle negativo (barra verde clara), fungicida metiltiofanato (barra laranja), e as diluições do inóculo bacteriano ($10^7 \times$, $10^8 \times$, $10^9 \times$ - tons de azul)



3.4 DISCURSÃO

Durante décadas, o *Bacillus velezensis* tem sido amplamente utilizado como agente antimicrobiano no setor agrícola. Estudos moleculares revelaram que várias regiões genéticas desse microrganismo estão relacionadas à síntese de substâncias antagônicas. (Mitra *et al.*, 2023) No entanto, a base funcional genética do efeito de biocontrole ainda não está clara devido à escassez de relatos sobre genomas completos de cepas de *B. velezensis*. Recentemente, isolamos uma nova cepa de *Bacillus velezensis* do laboratório de biologia molecular da Universidade Federal do Tocantins - Gurupi. Testes de antagonismo *in vivo* e *in vitro* foram realizados e mostraram que, essa cepa foi altamente eficaz contra o fungo fitopatogênico *Bipolaris oryzae*, com evidente inibição do crescimento micelial a partir do segundo dia de confronto, o que é consistente com os estudos de (Chi-kuan tu *et al.*, 2024).

Foram produzidas 6.310.092 leituras de extremidade emparelhada, o tamanho total do genoma foi estimado em 3.913.362 bp, com um conteúdo médio de G+C de 46,51%, e nenhum plasmídeo foi detectado. Cinco grupos de genes codificam peptídeos não ribossômicos e antifúngicos (Plipastatina, Mycissubtilina, Surfactina, Fengycin, Bacilomicina). Além disso, *Bacillus velezensis* possui a capacidade de produzir várias poliketídios sintases (PKS), como oleandomicina, biciclomicina, tetracenomicina, pristinamicina, lincomicina, β - lactamase e tetraciclina, que podem suprimir bactérias gram-positivas.

A plipastatina, um composto antibacteriano, desempenha um papel crucial na proteção das cepas de *Bacillus* contra bactérias e fungos concorrentes. Através da análise do genoma bacteriano, foi identificado que essas cepas apresentam mutações no gene ppsB, o que lhes permite sobreviver em altas concentrações de cobre. O cobre é reconhecido por sua capacidade de causar danos celulares e induzir a morte por contato. Essas características conferem às cepas de *Bacillus* o status de calcoforo, devido à sua capacidade de resistir e sobreviver em ambientes ricos em cobre (Johnson; Chandrangsu; Addison, 2023; Kim; Fraga; Virto, 2023).

A atividade antifúngica da micosubtilina está relacionada tanto ao comprimento do componente de ácido graxo quanto à sua isomeria, a biossíntese da micosubtilina é mediada por um complexo multienzimático modular e pelo chamado

mecanismo de “peptídeos sintetases não ribossômicos” (NRPS). Além disso, a maioria das cepas de *Bacillus* co-produz outros compostos NRPS, como a surfactina, um poderoso biosurfactante lipopeptídico envolvido na colonização de superfícies, e formação de biofilme, outras iturinas (iturina A e bacilomicinas) ou lipopeptídeos da família fengicina e plipastatina (Béchet *et al.*, 2013).

Genes relacionados à formação de biofilme, aquisição de ferro, colonização e síntese de compostos orgânicos voláteis foram encontrados no genoma da *Bacillus velezensis*. Essas características tornam a *Bacillus velezensis* uma excelente candidata a agente de biocontrole, fornecendo informações valiosas para pesquisas futuras sobre mecanismos de resistência.

Com relação às atividades enzimáticas, como a produção de amilase, foram observados resultados positivos nos três isolados, que foram muito eficientes na degradação do amido. Além disso, a solubilização de fósforo e potássio também foi positiva nos três isolados, indicando sua capacidade de fornecer nutrientes e promover o crescimento das plantas (Leonardo-Silva *et al.*, 2023). Com relação ao ácido indol acético (IAA), os resultados foram negativos nos três isolados. Com relação aos testes de catalase, foi observada a formação de bolhas, indicando uma reação positiva. Isso é promissor, pois a catalase é um tetrâmero que promove o crescimento celular mais rápido (CorraleS Ramírez; Caycedo Lozano; Quijano Duarte, 2022).

No caso da celulase, todos os isolados apresentaram uma reação negativa. A protease foi positiva apenas para *Bacillus Velezensis*, mostrando sua capacidade de hidrolisar ligações peptídicas e degradar proteínas, enquanto os isolados de *Bacillus* sp.OP938255 e *Bacillus* sp.OP938696.1 tiveram uma resposta negativa. Esses estudos demonstram o potencial das bactérias endofíticas como promotoras de crescimento em plantas de arroz (García Sánchez; Cruz Flores; Mera De La Rosa, 2021) Os testes foram realizados em triplicata, o que reforça a validade dos resultados.

A produção de celulase de protease é uma indicação da capacidade de promover o crescimento da planta, enquanto a celulase auxilia na mineralização dos nutrientes e na degradação da matéria orgânica; protease hidrolisa proteínas na parede celular de outros organismos, servindo assim como controle biológico (García Sánchez; Cruz Flores; Mera De La Rosa, 2021) função da enzima catalase é

necessária porque durante o metabolismo celular é formado o peróxido de hidrogênio, H₂O₂ (peróxido de hidrogênio). Esta enzima decompõe o peróxido em água e oxigênio, moderando a produção de espécies reativas de oxigênio (Chatterjee; Chakraborty; Abraham, 2021).

As bactérias promotoras do crescimento das plantas (PGPB) possuem a capacidade de modular a absorção e o acúmulo de diversos nutrientes (por exemplo, fósforo (P) e potássio (K) por meio de duas estratégias distintas: aumentando a disponibilidade de nutrientes e/ou aprimorando o acesso das plantas a esses compostos (Roriz *et al.*, 2020). As PGPBs podem aprimorar a absorção de fósforo (P) e potássio (K) e estimular o crescimento vegetal ao promover a solubilização desses nutrientes por meio da produção de ácidos orgânicos, compostos fenólicos, agentes quelantes e sideróforos. Além disso, essas bactérias são capazes de potencializar a capacidade fotossintética das plantas, o que resulta indiretamente em um aumento do teor de clorofila (Roriz *et al.*, 2020).

Outro mecanismo benéfico promovido pelas PGPBs é a síntese do ácido indol-3- acético (IAA), o qual pode contribuir para o desenvolvimento do sistema radicular, melhorando, assim, a absorção de nutrientes. Essas bactérias também intensificam a atividade da enzima ácido 1- aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) desaminase, reduzindo os efeitos negativos nos processos fisiológicos da planta, o que se torna extremamente importante quando as plantas são expostas a condições de estresse (Autarmat; Treesubuntorn; Thiravetyan, 2023).

Bacillus velezensis é um valioso agente de controle biológico. Portanto, para desenvolver e formular produtos de base biológica, é cada vez mais importante entender o potencial antimicrobiano da biossíntese de *Bacillus velezensis*. Além disso, a identificação de genes responsáveis por metabólitos secundários bioativos e a capacidade de regular esses genes são etapas adicionais essenciais para aumentar a produção de metabólitos por microrganismos benéficos e facilitar a biotecnologia e a engenharia metabólica. O *Bacillus velezensis* pode representar um agente de biocontrole prático e potente que pode ser usado como uma alternativa eficaz aos agroquímicos tradicionais.

3.5 CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou que as cepas do gênero *Bacillus*, especialmente *Bacillus velezensis*, têm grande potencial como biocontrole contra o fungo *Bipolaris oryzae*, causador da mancha parda em arroz, mostrando eficácia tanto in vitro quanto in vivo. Além disso, a caracterização bioquímica e molecular de *B. velezensis* indicou a presença de compostos bioativos, como surfactina e fengicina, conhecidos por suas propriedades antifúngicas. A produção de protease por *B. velezensis* também sugere seu potencial adicional como promotor de crescimento vegetal, um benefício adicional para a saúde das plantas e o aumento da produtividade agrícola. Os achados deste trabalho reforçam a viabilidade do uso de *Bacillus sp.* como uma ferramenta promissora para o manejo sustentável de doenças fúngicas, especialmente em cultivos de arroz. No entanto, a eficácia dessas cepas parece estar relacionada ao tipo de cultura utilizada, sendo necessário estudos adicionais para sua aplicação em campo.

Testes sob diferentes condições e interação com plantas poderão fornecer dados importantes para a implementação do controle biológico em larga escala.

REFERÊNCIAS

ALEZANDRA, M. *et al.* In vitro antagonistic activity of *Sclerotium* sp. by *Bacillus* sp. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 13, p. e380111335351 e380111335351, 10 out. 2022.

ARCHANA, H. R. *et al.* Biopesticides: a key player in agro-environmental sustainability. In: **TRENDS OF APPLIED MICROBIOLOGY FOR SUSTAINABLE ECONOMY**. [S.l.]: Elsevier, 2022. p. 613-653.

AUTARMAT, S.; TREESUBSUNTORN, C.; THIRAVETYAN, P. Comparison of using *Bacillus Strain* with Potential for Biofertilizer and Biocontrol Agent. 16 ago. 2022.

BÉCHET, M. *et al.* Production of a novel mixture of mycosubtilins by mutants of *Bacillus subtilis*. **Bioresource Technology**, v. 145, p. 264-270, 1 out. 2013.

Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, v. 48, 2023. 1 mar. 2023.

BLIN, K. *et al.* antiSMASH 7.0: new and improved predictions for detection, regulation, chemical structures and visualisation. **Nucleic Acids Research**, v. 51, 2023.

BULHOES, C. C.; MELO, I. S.; SHIOMI, H. F. Biocontrole da antracnose em frutos de maracujá amarelo por bactérias antagônicas a fitopatógenos. **Scientific Electronic Archives**, p. 10-16, 2019.

CARHUAPOMA-DELACRUZ, V. *et al.* Fibrolytic bacteria isolated from the rumen of alpaca, sheep and cattle with cellulose biodegrading capacity. **Revista Científica de la Facultad de Veterinaria**, v. 32, p. 1-7, 11 set. 2022.

CAYCEDO LOZANO, L.; CORRALES RAMÍREZ, L. C.; QUIJANO DUARTE, S. Catalisis, enzimas y pruebas rápidas. **Nova**, v. 20, n. 39, p. 121-150, 2022.

CHATTERJEE, A.; CHAKRABORTY, P.; ABRAHAM, J. Microbial Enzymes for the Mineralization of Xenobiotic Compounds. In: **Bioprospecting of microorganism-based industrial molecules**. [s.l.]: [s.n.] p. 319-336, 1 ene. 2021.

CHOI, J.; NAM, J.; SEO, M. H. Complete genome sequence of *Bacillus velezensis* NST6 and comparison with the species belonging to operational group *B. amyloliquefaciens*. **Genomics**, v. 113, n. 1, p. 380-386, 1 ene. 2021.

CORRALES RAMÍREZ, L. C.; CAYCEDO LOZANO, L.; QUIJANO DUARTE, S. DINI, M. *et al.* Breeding Peaches for Brown Rot Resistance in Embrapa. **Agronomy**, v. 12, n. 10, p. 2306, 1 oct. 2022.

DONG, P. T. *et al.* Photoinactivation of catalase sensitizes a wide range of bacteria to ROS- producing agents and immune cells. **JCI Insight**, v. 7, n. 10, 5 maio 2022.

GARCÍA SÁNCHEZ, R.; CRUZ FLORES, G.; MERA DE LA ROSA, C. J. **Técnicas de** in transcriptome of black rice (*Oryza sativa* L.). **Environmental and Experimental Botany**, v. 213, p. 105396, 1 set. 2023.

JOHNSON, G.; CHANDRANGSU, P.; ADDISON, M. Abstract 1900: Plipastatin contributes to copper homeostasis in *B. subtilis*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 299, n. 3, 2023.

KANEHISA, M.; SATO, Y.; KAWASHIMA, M. KEGG mapping tools for uncovering hidden features in biological data. **Protein Science**, v. 31, n. 1, p. 47-53, 1 jan. 2022.

KHOSHURU, B. *et al.* Decrypting the multi-functional biological activators and inducers of defense responses against biotic **stresses in plants**. **Heliyon**, 2023.

KHVEDELIDZE, R. M. *et al.* Amilase-producing mikromycetes isolated from soils of South Caucasus. **Annals of Agrarian Science**, v. 15, n. 3, p. 318-321, 1 set.

2017.

KIM, S.; FRAGA, D.; VIRTO, J. G. Abstract 1885: Are the arginine kinase functions found in *Myxococcus xanthus* conserved in a sister species, *Myxococcus macrosporus*? **Journal of Biological Chemistry**, v. 299, n. 3, 2023.

LARREA, I.; FALCONI, C.; ARCOS, A. Isolation and characterization of strains of *Bacillus* spp. With activity against *Tetranychus urticae* Koch in commercial crops of roses. **Revista Colombiana de Biotecnología**, v. 17, n. 2, p. 149-155, 2015.

LEONARDO-SILVA, L. *et al.* Assessment of morphophysiological and genotypic diversity of endophytic bacteria isolated from rice (*Oryza sativa* L.) plants. **Caatinga**, v. 36, n. 4, p.775-784, 2023.

LEY-LÓPEZ, N. *et al.* Biosíntesis inducida de fengicina y surfactina en una cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* con actividad oomicetida sobre zoosporas de *Phytophthora capsica*. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 54, n. 3, p. 181-191, 1 jul. 2022.

LI, X. *et al.* Characterization of a *Bacillus velezensis* with antibacterial activity and inhibitory effect on common aquatic pathogens. **Aquaculture**, v. 523, 2020.

LIU, F.; LI, W.; WU, M. Complete Genome Analysis of *Bacillus Velezensis* ES2-4: A Novel LUIZ, G. *et al.* Assessment of phosphorus solubilization potential by *Aspergillus terreus*. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 16, p. e73101623271-e73101623271, 7 dez. 2021.

MARWEIN, R. *et al.* Transcriptome-wide analysis of North-East Indian rice cultivars in response to *Bipolaris oryzae* infection revealed the importance of early response to the pathogen in suppressing the disease progression. **Gene**, v. 809, 2022. **microbiología y bioquímica en el estudio del suelo y planta**. Zaragoza: UNAM, 2021.

MITRA, D. *et al.* Rice (*Oryza sativa* L.) plant protection using dual biological control and plant growth-promoting agents: Current scenarios and future prospects. **Pedosphere**, 2023.

MOON, J. H. *et al.* *Bacillus velezensis* CE 100 Inhibits Root Rot Diseases (Phytophthora spp.) and Promotes Growth of Japanese Cypress (*Chamaecyparis obtusa* Endlicher) Seedlings. **Microorganisms** **2021**, Vol. **9**, Page **821**, v. 9, n. 4, p. 821, 13 abr. 2021.

PANDEY, V. V.; BHATTACHARYA, A.; PANDEY, A. Plant growth-promoting microbiomes: History and their role in agricultural crop improvement. In: Plant-microbe interaction -**Recent Advances in Molecular and Biochemical Approaches**: Volume 1: Overview of Biochemical and Physiological Alteration During Plant-Microbe Interaction. [s.l: s.n.].

PATHAK, J. *et al.* Genetic regulation of scytonemin and mycosporine-like amino acids (MAAs) biosynthesis in cyanobacteria. **Plant Gene**, v. 17, p. 100172, 1 mar. 2019.

Plant growth promoting bacteria and exogenous indole acetic acid on rice under ozone stress. REJÓN-MARTÍNEZ, G. A. *et al.* Antagonist activity of *Streptomyces* sp. Y20 against fungi causing diseases in plants and fruits. **Tropical and Subtropical Agroecosystems**, v. 25, n. 2, p. 2022, 22 mar. 2022.

ROBERTSON, J.; NASH, J. H. E. MOB-suite: software tools for clustering, reconstruction and typing of plasmids from draft assemblies. **Microbial genomics**, v. 4, n. 8, 2018.

RORIZ, M. *et al.* Legume biofortification and the role of plant growth-promoting bacteria in a sustainable agricultural era. **Agronomy**, 2020.

SINGHA, K. M.; PANDEY, P. Endophytic bacteria with host-supportive genetic determinants in their genomes induce growth and antioxidant activity related gene functions **Trends of Applied Microbiology for Sustainable Economy**, p. 613-653, 1 ene. 2022.

VELASCO-JIMÉNEZ, A. *et al.* Bacterias rizosféricas con beneficios potenciales en la agricultura. **Terra Latinoamericana**, v. 38, n. 2, p. 333-345, 2020.

VU, T. X. *et al.* Efficient control of the fungal pathogens *Colletotrichum gloeosporioides* and *Penicillium digitatum* infecting citrus fruits by native soilborne *Bacillus velezensis* strains. **Heliyon**, v. 9, n. 2, p. e13663, 1 feb. 2023.

WANG, X. *et al.* Biocontrol potential of *Bacillus velezensis* wr8 secondary metabolites against *Penicillium* sp. **Gene**, v. 892, p. 147872, 20 ene. 2024.

WOOD, E. **Molecular cloning. a laboratory manual. Biochemical Education**, v. 11, n. 2, 1983.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise das sementes de arroz destaca a presença de fungos fitopatogênicos que podem causar perdas na colheita, bem como a transmissão horizontal para outras espécies. O controle biológico e o tratamento com fungicidas são importantes para o desenvolvimento de novas tecnologias, portanto, o presente estudo apresenta a filogenia de bactérias endolíticas com potencial inibitório e promotor de crescimento em duas variedades de *Oryza sativa*; L., 1753 como uma contribuição para o desenvolvimento biotecnológico na agricultura.