

Bactérias endofíticas como agentes de controle biológico na orizicultura

Endophytic bacteria as biological control agents in rice fields

Taís Vargas Garcia¹, Neiva Knaak¹, Lidia Mariana Fiuza^{1*}

RESUMO: Esta publicação apresenta alguns dados sobre as interações entre as bactérias e as plantas hospedeiras, considerando os simbiontes e os patógenos das plantas de importância agrícola, com ênfase nos agroecossistemas de arroz irrigado. Neste trabalho foram abordados aspectos relacionados a essas bactérias endofíticas, tais como: (i) endofíticos e suas interações com as plantas cultivadas; (ii) rizobactérias promotoras do crescimento vegetal [*plant growth-promoting rhizobacteria* (PGPR)] e sua aplicabilidade no controle biológico; (iii) bactérias endofíticas *versus* PGPR no controle biológico de fitopatógenos; (iv) aplicação de recombinantes endofíticos na agrobiotecnologia. No final do artigo estão apresentadas as opiniões e perspectivas dos autores sobre as bactérias que vivem associadas às plantas cultivadas nos agroecossistemas.

PALAVRAS-CHAVE: bactérias endofíticas; manejo; doenças; pragas; *Oryza sativa* L.

ABSTRACT: This paper presents some data on the interactions of the bacteria and the host plants, considering the symbionts and pathogens of plants of agricultural importance, focusing on rice fields. This article addresses issues related to these endophytic bacteria, such as: (i) endophytes and their interactions with the cultivated plants; (ii) promoting rhizobacteria plant growth [*plant growth-promoting rhizobacteria* (PGPR)] and its application in biological control; (iii) endophytic bacteria PGPR against the biological control of plant pathogens; (iv) application of endophytic recombinant in agricultural biotechnology. This paper ends show the point of view and perspectives of the authors about bacteria that live associated with the plants grown in agroecosystems.

KEYWORDS: endophytic bacteria; management; diseases; pests; *Oryza sativa* L.

¹Laboratório de Microbiologia e Toxicologia, Programa de Pós-Graduação em Biologia, Universidade do Vale do Rio dos Sinos (UNISINOS) – São Leopoldo (RS), Brasil.

*Autor correspondente: fiuza@unisinis.br

Recebido em: 21/12/2013. Aceito em: 24/10/2015

Há uma demanda crescente por estratégias ecologicamente corretas na agricultura. Ao longo dos últimos 150 anos, a pesquisa repetidamente demonstrou que as bactérias e os fungos têm uma íntima interação com suas plantas hospedeiras e são capazes de promover o crescimento das plantas, resistência contra patógenos e parasitas, maior resistência a condições de estresse biótico e abiótico (WHIPPS, 2001), além de possuírem grande potencial biotecnológico (LINDOW; LEVEAU, 2002).

A interação benéfica entre planta e micro-organismo tem sido pouco explorada na agricultura, apesar de possuir importância global e local no equilíbrio dinâmico dos ecossistemas, para utilização em estratégias no Manejo Integrado de Doenças e Pragas. Desse modo, este trabalho de revisão sobre bactérias endofíticas teve como ênfase o controle biológico de doenças e pragas de importância agrícola, especialmente na cultura do arroz irrigado.

BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS E INTERAÇÕES COM AS PLANTAS CULTIVADAS

A agricultura é uma das atividades produtivas mais importantes de qualquer nação, mas sua prática requer cuidados especiais, pois a produção de alimentos está diretamente ligada à qualidade ambiental. Os atuais métodos de cultivo de plantas de lavouras que visam atingir o máximo potencial de produção agrícola requerem a aplicação de pacotes tecnológicos constituídos basicamente de fertilizantes e agrotóxicos, o que, por consequência, causa problemas à saúde humana e um desequilíbrio nos agroecossistemas, especialmente nas comunidades que habitam o solo, como os micro-organismos.

Nas diferentes formas de interações entre as plantas e os micro-organismos, o estabelecimento da associação planta-micro-organismo no sistema radicular é fundamental para a resposta quimioestática do endófito aos exsudatos radiculares. Já na colonização bacteriana da rizosfera ou da superfície da planta o processo é mais complexo, envolvendo genes e outros metabólicos das bactérias. No processo de colonização ocorrem múltiplas etapas, que iniciam com o deslocamento do micro-organismo em direção ao sistema radicular, passando pela adesão e distribuição, ao longo das raízes, que permite a sobrevivência e o crescimento da população de endofíticos (JHA *et al.*, 2013 *apud* GIRI; DUDEJA, 2013).

No caso das bactérias endofíticas faz-se necessária uma etapa adicional na adesão e penetração nas raízes, com a formação de microcolônias intra e intercelulares. As diferentes associações das bactérias endofíticas podem causar alterações nos processos de colonização das plantas. Nesse sentido, os micro-organismos migram para a rizosfera, em resposta aos exsudatos, que são ricos em aminoácidos, ácidos

orgânicos, açúcares, vitaminas, purinas/pirimidinas, entre outros metabólicos. Além do fornecimento de substâncias nutritivas, as plantas podem fazer uma sinalização receptora aos micro-organismos, por meio de secreções, que facilitam a colonização de grupos específicos de bactérias, em detrimento de outros (BAIS *et al.*, 2006, COMPANT *et al.*, 2011 *apud* GIRI; DUDEJA, 2013; COMPANT *et al.*, 2010).

HALLMANN *et al.* (1997) sugeriram que, evolutivamente, as bactérias endofíticas são intermediárias entre as bactérias saprófitas e patogênicas, além de especularem a possibilidade de as bactérias endofíticas serem mais evoluídas que as patogênicas, por se nutrirem do hospedeiro sem matá-lo. Essa especulação pode ser reforçada pela sequência evolutiva proposta por DJORDJEVIC *et al.* (1987), que contemplaram a ideia de que a mais bem-sucedida interação entre micro-organismo e planta não apenas explora os vegetais como fonte nutritiva, mas através do tempo causa menos danos à planta.

De acordo com GILBERT *et al.* (1998), as bactérias metanotróficas oxidam mais da metade do metano produzido na Terra, para obtenção de energia e como fonte de carbono. Esses autores citaram que as bactérias metanotróficas estão presentes no solo e também colonizam os tecidos das plantas, como, por exemplo, a *Oryza sativa*, sendo responsáveis pela oxidação de 10 a 50% do metano produzido nas lavouras orizícolas. Desse modo, esses micro-organismos impedem que o metano atinja altas concentrações, o que poderia resultar em um aumento da temperatura do globo e causar diversas alterações químicas na atmosfera.

Os dados anteriormente mencionados revelam a importância das interações entre bactérias e plantas para a manutenção do equilíbrio nos diversos ecossistemas. Sendo assim, estudos contínuos para elucidar a dinâmica das diferentes associações entre plantas e bactérias são de grande relevância para o desenvolvimento de técnicas e estratégias aplicadas na agricultura e na biotecnologia (BALDOTTO *et al.*, 2010).

RIZOBACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO VEGETAL E SUA APLICABILIDADE NO CONTROLE BIOLÓGICO

As rizobactérias, ou seja, bactérias que habitam a rizosfera e o rizoplane, além de promoverem o crescimento das plantas hospedeiras, por intermédio de uma série de mecanismos, que incluem:

1. a produção de fito-hormônios, dentre os quais as auxinas;
2. a solubilização de fosfato e a produção de quelantes de ferro, como os sideróforos;
3. pela liberação de metabólitos antimicrobianos;
4. pela degradação da parede celular de patógenos através da produção de enzimas líticas;
5. pela competição por nutrientes e
6. pela indução de resistência sistêmica nas plantas (Fig. 1).

A indução de resistência nas plantas hospedeiras, provocada pela presença dessas bactérias, pode ampliar a persistência dos agrotóxicos, porque a durabilidade dessa resistência pode diminuir, diante da elevada variabilidade genética dos fitopatógenos, além de os ingredientes ativos dos agrotóxicos apresentarem limitado espectro de ação para os organismos-alvo (KUMAR *et al.*, 2012; HARDOIM *et al.*, 2012; REINHOLD-HUREK; HUREK, 2011).

Em termos de agricultura ecologicamente sustentável, as rizobactérias também constituem-se em uma excelente estratégia para reduzir resíduos tóxicos no ambiente, resultantes do uso indiscriminado de agrotóxicos? Assim, diversos estudos vêm sendo desenvolvidos no intuito de avaliar os inúmeros benefícios das rizobactérias para várias espécies vegetais (ROSENBLUETH; MARTÍNEZ-ROMERO, 2006; JHA *et al.*, 2013).

No que se refere ao arroz, *Oryza sativa*, SOUZA *et al.* (2013) e LUCAS *et al.* (2009) avaliaram a capacidade de duas cepas bacterianas, *Pseudomonas fluorescens* Aur 6 e *Chryseobacterium balustinum* Aur 9, quanto à proteção de plantas de arroz contra a brusone, causada pelo fungo *Magnaporthe oryzae*. O estudo foi pioneiro em utilizar uma cepa de *C. balustinum* na tentativa de proteger plantas de arroz, e também foi a primeira vez em que se considerou a proteção *in loco*, com dois atributos de rendimento da cultura: produtividade e qualidade. Ainda, além de avaliados seus efeitos individuais, foi testada a possibilidade de efeito sinérgico das cepas no controle da doença. Assim, com relação a dois dos anos agrícolas amostrados (2004 e 2005), pôde-se constatar que, em 2005, a severidade da doença foi maior que em 2004, atingindo altos valores de superfície foliar afetada nos controles: observou-se 3% de superfície foliar afetada em 2005 *versus* 0,3% em 2004, de modo que, nessas condições, cada cepa, individualmente, protegeu as plantas de arroz contra a brusone. Por outro lado, em menor grau no ano de 2005 do que no ano de 2004, quando a severidade da doença foi

mais baixa: 50% de proteção em 2004, contra 15% de proteção em 2005. No entanto, a combinação de cepas teve o mesmo efeito de proteção em ambos os anos de estudo, 40%, reforçando a ideia de que a combinação de cepas como ferramenta de biocontrole pode revelar-se uma estratégia vantajosa. Por fim, a relação direta entre o decréscimo da severidade da doença produzido por essas rizobactérias e o aumento na produtividade da cultura do arroz foi evidenciada, especialmente, pelos dados da amostragem de 2005.

Algum tempo depois, FILIPPI *et al.* (2011) conduziram um estudo visando selecionar rizobactérias associadas às raízes de arroz, desta vez cultivado em condições aeróbicas, isto é, o chamado “arroz de sequeiro”, capazes de estimular o crescimento da cultura, bem como suprimir a doença da brusone. Os resultados mostraram que, dos 148 isolados rizobacterianos avaliados, 18 tiveram potencial significativo em estimular o crescimento do arroz e suprimir a brusone nos estágios iniciais de desenvolvimento das plântulas, sendo que 4 dos 18 isolados foram positivos quanto à produção de ácido indolacético (principal auxina vegetal), ao passo que 8 foram considerados solubilizadores de fosfato. Embora os 18 isolados selecionados, por promoverem crescimento, tenham sido efetivos em suprimir a severidade da brusone, os isolados Rizo-46 e Rizo-55 reduziram-na em 90 e 95%, respectivamente, ao desencadear o fenômeno conhecido como resistência sistêmica induzida (IRS), gerado pelo aumento da atividade enzimática de proteínas relacionadas à patogênese (PRPs), tais como peroxidase (POX), β -1,3-glucanase e quitinase.

Ainda assim, poucos são os estudos que abordam os mecanismos e efeitos da indução de resistência sistêmica em plantas de arroz. Pensando nisso, CHITHRASHREE *et al.* (2011) conduziram experimento para avaliar a efetividade do tratamento de sementes com PGPR do gênero *Bacillus* (em dois estados: suspensões frescas e formulações em pó) para o manejo do crostamento foliar do arroz, causado pela bactéria

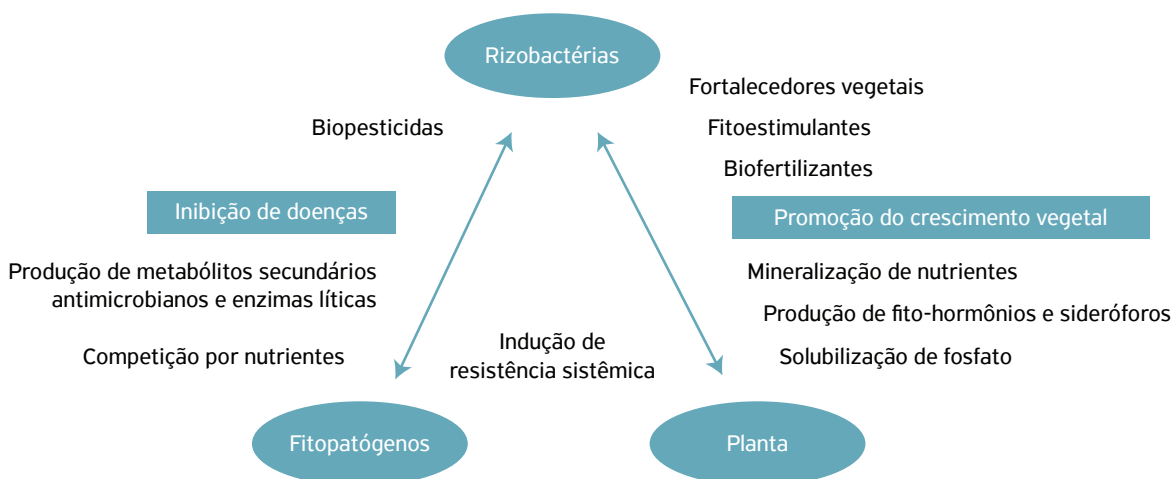


Figura 1. Interações das bactérias endofíticas na promoção do crescimento das plantas e da sanidade vegetal (adaptado de BERG, 2009).

Xanthomonas oryzae pv. *oryzae*, por meio da resistência sistêmica induzida, em estufa. Como resultados, as sete cepas de *Bacillus* testadas reduziram a incidência do cretamento foliar, a extensão da lesão e o murchamento das plantas tratadas, em comparação às plantas-controle, sendo que uma cepa de *B. subtilis*, GBO3, e duas cepas de *B. pumilus*, SE34 e T4, mostraram-se mais eficientes em suprimir a doença quando utilizadas no tratamento das sementes tanto como suspensões frescas quanto como formulações em pó. A cepa SE34 ofereceu o nível mais alto de proteção, 71%, seguida pela cepa GBO3, 58%, quando utilizadas na forma de suspensões frescas. Essas cepas foram as únicas que, além de reduzir a incidência da doença, ainda atuaram como promotoras efetivas de crescimento. As plantas inoculadas com a bactéria patogênica e tratadas com as cepas PGPR não demonstraram murchamento ou morte. O estudo também revelou que o tratamento das sementes com cepas PGPR, *in vitro*, melhorou significativamente vários parâmetros de rendimento das plantas, como a germinação das sementes, o vigor, a emergência e o estabelecimento das plântulas em relação aos controles. Para responder seu objetivo principal, o estudo examinou a produção de enzimas relacionadas à defesa, de modo a determinar seu papel nas reações de resistência à infecção, induzidas pelo tratamento com as PGPR. Os resultados mostraram um claro aumento na síntese de três enzimas de defesa nas plantas de arroz tratadas com as cepas PGPR SE34 e GBO3 após a inoculação com o patógeno: fenilalanina amônia-liase (PAL), POX e polifenoloxidase (PPO). O aumento observado pode ser explicado pelas funções desempenhadas por essas enzimas (PAL e POX), visto que exercem um papel importante na síntese de compostos fenólicos, fitoalexinas e lignina, os quais são fatores-chave na resistência às doenças; enquanto a PPO é uma enzima que contém cobre, o qual oxida compostos fenólicos para quininas altamente tóxicas, estando, assim, envolvida na oxidação final do tecido vegetal doente e, portanto, na resistência aos fitopatógenos.

De fato, apesar de altos níveis de controle das doenças, resultantes da indução de resistência, serem alcançados em experimentos controlados, níveis menores podem ser observados em campo. Uma possível explicação sugerida por WALTERS (2009) é a hipótese de as plantas, em condições naturais, já estarem induzidas: a interação dessas plantas tanto com fatores bióticos (patógenos, fungos micorrízicos, micro-organismos rizosféricos) como com fatores abióticos (estresse hídrico, nutrição mineral) culminaria na indução de resistência. O mesmo autor ainda faz um questionamento: se as plantas em campo já estão induzidas, até que ponto elas poderiam ser ainda mais induzidas pela aplicação do tratamento com agentes indutores? Primeiramente, o estudo cita duas outras pesquisas (HERMAN *et al.*, 2007; PASQUER *et al.*, 2005) que comprovam sua hipótese inicial por meio da análise da expressão gênica, isto é, ambos demonstram que a expressão de genes

de defesa já é elevada previamente ao tratamento das plantas com agentes indutores, ou que o uso dos agentes indutores não desencadeia a expressão de um conjunto específico de genes relacionados à defesa, em condições de campo. Respondido isso, resta saber se o fato de as plantas já estarem induzidas compromete de alguma forma sua habilidade em adquirir ainda mais resistência por intermédio de agentes indutores. Para esclarecer essa dúvida, o estudo de HERMAN *et al.* (2007) é novamente mencionado, pois, apesar de não ser focado na questão da resistência induzida, fornece uma possível resposta: seus resultados mostram que o tratamento com indutores [no estudo foi utilizado o fungicida Acibenzolar-S-Metil (ASM)] aumenta a expressão de genes de defesa após a primeira aplicação, e que essa expressão gênica aumenta ainda mais após a segunda aplicação do tratamento. Tal achado sugere que a indução primária de resistência não compromete a habilidade da planta em responder a induções subsequentes. Apesar disso, o autor afirma que a pesquisa sobre o assunto ainda é escassa, de modo que estudos adicionais são necessários para avaliar questões como: o grau de indução das plantas no campo, se as plantas que já estão induzidas podem ser ainda mais induzidas e se tais efeitos podem ser influenciados, por exemplo, pelo genótipo das plantas.

A queima da bainha, doença que tem como agente causal o fungo *Rhizoctonia solani*, também incide sobre a cultura do arroz, ocasionando perdas de rendimento de grandes proporções. Em vista disso, várias formulações à base das PGPR têm sido avaliadas para o manejo sustentável da doença, dentre as quais aquelas à base de *Bacillus* spp. KUMAR *et al.* (2012) testaram diversas concentrações da formulação comercial líquida à base de *B. subtilis* cepa MBI 600, denominada “Integral”, para a supressão da queima da bainha e para o aumento do crescimento das plântulas em estufa, bem como a eficácia do produto contra a doença em ensaios de campo, e ainda o seu efeito em termos de rendimento de grãos de arroz. A cepa que serviu de matéria-prima para o formulado avaliado foi selecionada em estudos prévios dos mesmos autores por inibir o crescimento dos micélios e a germinação dos escleródios e, assim, reduzir os sintomas causados por *R. solani*, em laboratório, ao mesmo tempo em que se mostrou efetiva em promover o crescimento vegetal (por intermédio da produção de sideróforos e do aumento da germinação das sementes e do crescimento das plântulas), em laboratório e estufa. Ainda, a estirpe provou-se compatível com fungicidas químicos comumente utilizados nas lavouras de arroz, uma característica que pode ser benéfica no caso de se alternar o uso da formulação com o uso do fungicida, visando à redução da contaminação ambiental decorrente do uso exclusivo e excessivo de controle químico. Os resultados apontaram que o produto Integral®, na forma líquida e na concentração $2,2 \times 10^9$ UFC/mL, foi efetivo em inibir a queima da bainha e em promover o crescimento das plântulas de arroz, em estufa. No campo, também se mostrou efetivo na redução da severidade da doença, na

promoção do crescimento em termos de altura, no aumento do perfilhamento por planta e no rendimento de grãos, quando a técnica do tratamento das sementes foi usada em combinação com a da imersão das raízes das plântulas e da pulverização foliar. Em vista disso, uma das justificativas dada pelos autores para o manejo da doença da queima da bainha no estudo foi a aplicação do produto nas sementes e raízes, facilitando a colonização efetiva da raiz pela cepa e a subsequente inibição do patógeno inoculado na rizosfera, por meio da habilidade do agente de biocontrole em competir pela matéria orgânica em decomposição. Além do mais, segundo os pesquisadores, a eficácia observada do formulado Integral[®] em reduzir a doença pode ser atribuída à produção de sideróforos, antibióticos e enzimas líticas, como POX e PAL, quitinases, β -1-3 glucanases e fenóis. Finalmente, os autores ainda consideram a atividade antagonista direta, pela produção de uma série de metabólitos bacterianos e pela indução de resistência sistêmica, outro possível mecanismo de defesa contra o ataque do patógeno.

BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS VERSUS RIZOBACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO VEGETAL NO CONTROLE BIOLÓGICO DE FITOPATÓGENOS

As bactérias endofíticas, com caráter diazotrófico, possuem vantagem em relação às rizobactérias no que se refere ao estímulo do crescimento vegetal e ao controle biológico, à medida que parecem fornecer mais nitrogênio fixado às plantas hospedeiras do que as rizobactérias, pelo fato de a competição por nutrientes ser maior no ambiente rizosférico, além de exibirem características comuns ao grupo das bactérias promotoras de crescimento: produção de fito-hormônios, solubilização de fosfato, produção de sideróforos, inibição da biossíntese do etileno (hormônio vegetal responsável pelo amadurecimento) e indução da resistência a fitopatógenos (BALDOTTO *et al.*, 2010).

Conforme abordado, apesar de bons resultados poderem ser obtidos no que se refere ao controle biológico sob condições de laboratório, vários são os fatores ambientais capazes de afetar o crescimento das PGPR e das bactérias endofíticas promotoras do crescimento vegetal [*plant growth-promoting endophytic bacteria* (PGPE)] e de exercer seus efeitos sobre as plantas no campo, como o clima, as condições meteorológicas, as características do solo, a composição e/ou a atividade da microbiota nativa do solo. Por isso, tem se tornado cada vez mais necessário o desenvolvimento de cepas eficientes de PGPR e PGPE, tanto sob condições de laboratório como de campo. Com esse objetivo em mente, WANG *et al.* (2009) testaram a eficácia de controle biológico da cepa CHM1 de *Bacillus* sp. contra seis estirpes de fungos fitopatogênicos: *Fusarium*

oxysporum f. *niveum*, *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinereapers*, *Gibberella zeae*, *Dothiorella gregaria* e *Colleototrichum gossypii*, nas culturas de arroz e couve (rotação de culturas), em estufa. Além disso, avaliaram seu efeito na promoção do crescimento vegetal e suas características endofíticas. Os autores tinham por objetivo o desenvolvimento de um pesticida microbiano à base da cepa investigada. Os resultados indicaram que a cepa CHM1 de *Bacillus* sp. é, de fato, endofítica, devido a sua presença ter sido comprovada nos colmos das plantas de arroz, e possui efeito inibitório no crescimento dos fungos patogênicos, comprovado pelo crescimento anormal das hifas quando realizada a inoculação simultânea da cepa e dos fungos, além de promover significativamente o crescimento das plântulas de arroz e couve. De acordo com suas características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e moleculares (gene 16S rDNA), a cepa foi identificada como pertencente à espécie *B. licheniformis*. A partir disso, os autores puderam inferir que a estirpe endofítica em questão foi capaz de inibir o crescimento de um amplo espectro de fitopatógenos, pois suprimiu de maneira bem-sucedida os seis importantes fungos fitopatogênicos utilizados, e atribuíram tal desempenho à produção de peptídeos cíclicos, aminopolióis ou aminoglicosídeos e à indução de resistência sistêmica.

Bactérias do gênero *Pseudomonas*, com as do gênero *Bacillus*, estão entre as mais bem estudadas quanto ao seu potencial como agentes de biocontrole. Com o objetivo de desenvolver inoculantes com propriedades de promoção de crescimento vegetal, LASLO *et al.* (2012) testaram a produção de sideróforos e atividade antifúngica contra *Fusarium oxysporum radialis-lycopersici*, *Sclerotium bataticola*, *Pythium ultimum*, *F. graminearum* e *Alternaria* spp., de bactérias do gênero *Pseudomonas*. Além disso, foi examinada a capacidade em produzir amônia e a solubilização de fosfato por parte dos isolados bacterianos. Baseando-se em critérios morfofisiológicos, foram utilizadas 47 culturas, sendo 12 provenientes da rizosfera, e 35, do solo. A produção de sideróforos foi detectada em 36,2% dos isolados, conferindo a estes vantagens competitivas como agentes de biocontrole e, conseqüentemente, contribuindo para a supressão de doenças devido à oferta limitada de minerais essenciais em habitats naturais. Quanto aos ensaios de efeito fungicida, entre os 47 isolados testados, quase todos exibiram efeito antagonico contra os fungos. A inibição máxima no crescimento dos micélios (100%) foi alcançada por uma das culturas contra *S. bataticola*. Em 9 dos isolados (8 originários do solo e 1 proveniente da rizosfera), a taxa de inibição contra os 5 fungos-alvo foi maior do que 80%; no caso de 5 isolados, a taxa de inibição foi maior do que 80%, contra 3 dos fungos estudados; para 20 culturas bacterianas foi detectada uma taxa de inibição maior do que 80%, contra 1 dos fungos. A habilidade das bactérias em produzir amônia, produto do metabolismo secundário de bactérias promotoras do crescimento vegetal e de grande importância em termos de efeito antagonico,

foi observada em 37 isolados. No que se refere à solubilização de fosfato, traço que denota potencial em contribuir para o crescimento vegetal, 30 dos 47 isolados demonstraram tal habilidade, enquanto as outras 6 culturas foram obtidas da rizosfera. Oito dos isolados bacterianos avaliados exibiram as três características benéficas (produção de sideróforos, produção de amônia e solubilização de fosfato), sendo seis deles originários do solo, e dois, da rizosfera. Os autores consideram que, após serem identificadas, as cepas bacterianas selecionadas serão viáveis para o desenvolvimento de inoculantes voltados à promoção do crescimento das plantas e/ou ao controle biológico.

Um estudo com enfoque semelhante foi conduzido visando avaliar o potencial antagonico de um exemplar endofítico diazotrófico contra a brusone, objetivo até então inédito; JOE *et al.* (2012) optaram pela espécie *Achromobacter xylosoxidans*, a qual possui cepas com atividades fertilizante e inseticida comprovadas em estudos prévios (BLAHA *et al.*, 2006; FORCHETTI *et al.*, 2007; JHA; KUMAR, 2009; SGROY *et al.*, 2009), mas ainda não avaliadas quanto ao seu potencial como agentes de biocontrole ou como indutoras de resistência sistêmica. Assim, foi avaliada a atividade antagonica da cepa AUM54 de *A. xylosoxidans* contra *Magnaporthe oryzae* e sua habilidade *in vivo* em estimular respostas de defesa nas plantas de arroz e em reduzir a incidência da doença e promover o crescimento de plantas sadias e infectadas, em estufa. Os resultados indicaram que a cepa endofítica diazotrófica testada foi capaz de inibir o crescimento dos micélios de *M. oryzae* e de melhorar o crescimento das plantas de arroz *in vitro*. Além disso, o isolado mostrou-se capaz de aumentar as respostas de defesa enzimática em plantas de arroz inoculadas com *M. oryzae*, e efetivo em reduzir o percentual de incidência da doença. Análises biométricas das plantas ainda revelaram um aumento no crescimento e no rendimento em plantas infectadas e não infectadas. Assim, os autores assumiram que *A. xylosoxidans* cepa AUM54 pode exercer um importante papel na redução da incidência da brusone do arroz.

As sementes são de particular interesse devido ao seu potencial como veículo de transmissão de bactérias benéficas (antagônicas) e deletérias (fitopatogênicas). Dentro desse contexto, COTYNN *et al.* (2009) desenvolveram um estudo buscando avaliar a diversidade fenotípica (pela caracterização em morfotipos de acordo com as similaridades das características celulares, da composição de ácidos graxos, e na aparência das colônias) e genética (por meio de BOX-PCR) de bactérias cultiváveis associadas às sementes de um cultivar de arroz irrigado e examinar seu potencial antagonico, *in vitro*, contra *Rhizoctonia solani* AG1, *Pyricularia grisea* PO6, *Fusarium moniliforme* e *Sarocladium oryzae*. Nenhum dos 498 isolados exibiu atividade fungicida contra *F. moniliforme* ou *S. oryzae*. Vinte isolados (4%) inibiram o crescimento de *P. grisea* PO6, 19 isolados (4%) inibiram o crescimento de *R. solani* AG1 e 41 isolados (8%) inibiram o crescimento de ambos os

fungos fitopatogênicos. Em suma, pode-se inferir que a atividade antagonica exercida pelas bactérias endofíticas isoladas, a partir das sementes, pode induzir as plântulas de arroz à resistência do ataque de fungos fitopatogênicos.

APLICAÇÃO DE RECOMBINANTES ENDOFÍTICOS NA AGROBIOTECNOLOGIA

Como uma alternativa às plantas transgênicas, a inoculação de microrganismos endofíticos geneticamente modificados pode propiciar um caminho para as plantas beneficiarem-se de genes exógenos, ou seja, os isolados endofíticos podem atuar como vetores para expressão de proteínas com atividade inseticida, por exemplo, levando ao aumento da resistência das plantas inoculadas a doenças e/ou insetos-praga.

Nesse contexto, as lectinas vegetais, como as aglutininas de *Pinellia ternata* (PTA) e as aglutininas de *Galanthus nivalis* (GNA), têm se mostrado de grande aplicabilidade, no sentido de apresentarem comprovada atividade inibitória contra pragas homópteras importantes da cultura do arroz (cigarrinhas e pulgões). De modo que o primeiro estudo envolvendo a transformação de lectinas vegetais, mais especificamente a transferência das PTAs para bactérias endofíticas e sua reinoculação como endofíticos recombinantes em plântulas de arroz, foi desenvolvido por ZHANG *et al.* (2011). No referido estudo, o controle das cigarrinhas da espécie *Sogatella furcifera* (WBPH), agente causal da doença conhecida como “queima por sucção”, foi realizado com sucesso pela expressão do gene da lectina vegetal na bactéria endofítica *Enterobacterium cloacae* cepa SJ-10, uma vez que as plântulas de arroz inoculadas com rSJ-10 (nome dado à bactéria transformada) adquiriram atividade inseticida contra a praga em questão, fazendo da utilização de endofíticos recombinantes para melhorar a resistência vegetal à cigarrinha WBPH um novo método de controle dessa importante praga da cultura do arroz. O estudo ressalta que a bactéria endofítica pode, assim, ser utilizada futuramente como um vetor vivo para expressão das PTAs no controle dessas cigarrinhas, o que traz importantes implicações para o controle de pragas sugadoras de seiva utilizando um endófito geneticamente modificado como biopesticida microbiano. Em contrapartida, os autores afirmam que, pelo fato de as lectinas vegetais coagularem hemácias de mamíferos, é preciso considerar a possível toxicidade das PTAs expressas por bactérias endofíticas. Apesar de as GNA comprovadamente não serem tóxicas para mamíferos, nem terem efeitos significativos no desenvolvimento, na sobrevivência e na fecundidade de insetos benéficos, novos estudos são necessários visando investigar se as plantas de arroz expressando as PTAs são tóxicas para mamíferos antes de a bactéria endofítica ser empregada no controle das cigarrinhas WBPH no campo.

Outro ponto que necessita ser esclarecido, segundo o estudo, é se a bactéria endofítica utilizada coloniza as sementes de arroz, uma vez que trabalhos anteriores (FAHEY, 1988; FAHEY *et al.*, 1991) mostraram a não disseminação de uma bactéria modificada, *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis*, para a progênie das plantas inoculadas. Os autores encerram afirmando que, se puder ser provado que a bactéria *E. cloacae* modificada não é transmitida à progênie, ela poderá ser considerada segura para utilização na produção comercial de arroz.

Qi *et al.* (2013) realizaram estudo semelhante: por intermédio da introdução de um gene PTA na cepa WH2 de *Bacillus subtilis*, endofítica isolada do arroz, avaliaram o uso da referida bactéria como vetor vivo para expressão das PTA no controle biológico da cigarrinha WBPH. Antes de abordar a questão da inibição desempenhada sobre a praga-alvo, é curioso notar o seguinte: tanto a estirpe WH2 selvagem quanto a estirpe WH2 recombinante foram inoculadas nas plântulas de arroz, e o que se viu foi que ambas promoveram o crescimento das plântulas após a inoculação: o peso, a altura e o comprimento das raízes das plântulas de arroz nos dois tratamentos foram maiores do que no grupo-controle. A diferença entre o peso fresco e o peso seco das plântulas do grupo-controle, em relação às plântulas dos grupos WH2 selvagem e WH2 recombinante, foi significativa. Com base nesses achados, os autores afirmam que ambas as cepas podem ser usadas como promotoras do crescimento vegetal. Já os resultados relativos à análise da atividade inseticida mostraram que a cepa WH2 recombinante reduziu significativamente a sobrevivência e a fecundidade das cigarrinhas WBPH que se alimentavam das plântulas de arroz inoculadas. A diferença entre o número de insetos do grupo-controle e dos outros dois grupos foi altamente significativa ($p < 0,001$). Tais resultados indicaram, portanto, que logo após a cigarrinha WBPH se alimentar da seiva das plantas inoculadas com a cepa WH2 recombinante, a proteína PTA pode ser absorvida e exercer sua atividade inseticida. Finalmente, os autores ressaltam que, além de atuarem como vetores para transportar genes estranhos para o interior das plantas, no intuito de controlar pragas, micro-organismos endofíticos, por si só, também podem fornecer proteção contra insetos. Tanto é que no estudo em questão a cepa WH2 selvagem também exibiu atividade inseticida quando inoculada no arroz, a qual foi atribuída a sua capacidade de promover o crescimento vegetal e a produção de metabólitos secundários. O que também foi constatado pelo estudo, embora não publicado, que é essa cepa, na sua forma selvagem, inibiu leveduras endossimbiontes (YLES) localizadas no trato intestinal das cigarrinhas WBPH, e que são de grande importância para o crescimento e a sobrevivência da praga hospedeira.

Outro aspecto relevante, além da comprovação do sucesso das bactérias endofíticas geneticamente modificadas em exercer o controle biológico, consiste na investigação do processo de colonização das plantas hospedeiras e/ou pragas-alvo por

parte desses micro-organismos. Assim, RAMPELOTTI-FERREIRA *et al.* (2010) elaboraram um estudo voltado a avaliar a colonização endofítica não só de plântulas de arroz, como também de larvas de *Spodoptera frugiperda*, pela bactéria transformada [marcada com a proteína verde fluorescente (*gfp*)] *Methylobacterium mesophilicum* cepa SR1.6/6, *in vitro*. Os resultados das análises de microscopia fluorescente revelaram que a bactéria inoculada por meio das raízes mostrou-se capaz de colonizar as plântulas e de ser, então, transferida das plântulas para as larvas durante a alimentação do inseto. Além disso, a bactéria não foi encontrada em amostras das cabeças e das fezes das larvas, sugerindo que, apesar de ser capaz de fixar-se no interior do inseto, não é liberada com as fezes. Ainda, essa estratégia pode ser utilizada no controle biológico de insetos que se alimentam de culturas economicamente importantes, uma vez que o gene *gfp* pode ser substituído por outros, como os genes *cry* de *Bacillus thuringiensis* e inibidores de proteases. Os autores concluem que a transferência da bactéria endofítica da planta para o inseto pode ser uma nova e importante estratégia de controle biológico, usando micro-organismos geneticamente modificados capazes de expressar toxinas dentro da planta e/ou do inseto.

CONSIDERAÇÕES E PERSPECTIVAS

Estudos focados na utilização de bactérias endofíticas como ferramentas para aumentar a produtividade da cultura de cereais, como a orizicultura, embora recentes, indicam um grande potencial para a aplicação desses procaríotos, seja como estimuladores do crescimento e/ou agentes de controle de fitopatógenos e pragas. Para que isso se torne uma realidade, alguns aspectos ainda precisam ser mais bem avaliados, tais como: os mecanismos envolvidos na interação entre as bactérias endofíticas e as plantas hospedeiras, a influência do genótipo dos cultivares de arroz na seleção de bactérias endofíticas, as interações entre as espécies de bactérias endofíticas e seus fitopatógenos e pragas.

No âmbito global, as atuais pesquisas sobre os micro-organismos endofíticos têm foco nas plantas hospedeiras tropicais, as quais representam um amplo e promissor campo de investigação científica. Essas bactérias e esses fungos que vivem associados aos vegetais devem desempenhar papéis importantes, como a própria proteção das plantas contra agentes bióticos e abióticos.

Quanto ao futuro nessa área, os autores do presente artigo destacam os clássicos pesquisadores nacionais que trabalham com micro-organismos endofíticos e seu potencial no controle biológico de doenças e de insetos, como AZEVEDO *et al.* (2000), os quais investigam o comportamento dos isolados endofíticos nas regiões tropicais e de clima temperado tanto em relação as novas formas de interações quanto aos novos metabólitos de importância biotecnológica.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem pela colaboração da equipe do Laboratório de Microbiologia e Toxicologia da UNISINOS e da Estação Experimental do IRGA. Também agradecemos

pelo apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

REFERÊNCIAS

- AZEVEDO, J.A.; MACCHERONI JR, W.; PEREIRA, J.O.; ARAÚJO, W.L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. *EJB Electronic Journal of Biotechnology*, v. 3, p. 40-65, 2000.
- BAIS, H.P.; WEIR, T.L.; PERRY, L.G.; GILROY, S.; VIVANCO, J.M. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Review of Plant Biology*, v. 57, p. 233-266, 2006.
- BALDOTTO, L.E.B.; BALDOTTO, M.A.; OLIVARES, F.L.; VIANA, A.P.; BRESSAN-SMITH, R. Seleção de bactérias promotoras de crescimento no abacaxizeiro cultivar Vitória durante a aclimatização. *Revista Brasileira Ciência do Solo*, v. 34, p. 349-360, 2010.
- BERG, G. Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 84, p. 11-18, 2009.
- BLAHA, D.; PRIGENT-COMBARET, C.; SAJJAD MIRZA, M.; MOËNNE-LOCCOZ, Y. Phylogeny of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase-encoding gene *acdS* in phytobeneficial and pathogenic proteobacteria and relation with strain biogeography. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 56, p. 455-470, 2006.
- CHITHRASHREE, A.C.; UDAYASHANKAR, S.; NAYAKA, C.; REDDY, M.S.; SRINIVAS, C. Plant growth-promoting rhizobacteria mediate induced systemic resistance in rice against bacterial leaf blight caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Biological Control*, v. 59, p. 114-122, 2011.
- COMPANT, S.; CLÉMENT, C.; SESSITSCH, A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 42, n. 5, p. 669-678, 2010.
- COMPANT, S.; MITTER, B.; COLLI-MULL, J.G.; GANGL, H.; SESSITSCH, A. Endophytes of grapevine flowers, berries, and seeds: identification of cultivable bacteria, comparison with other plant parts, and visualization of niches of colonization. *Microbial Ecology*, v. 62, p. 188-197, 2011.
- COTTYN, B.; DEBODE, J.; REGALADO, E.; MEW, T.W.; SWINGS, J. Phenotypic and genetic diversity of rice seed-associated bacteria and their role in pathogenicity and biological control. *Journal of Applied Microbiology*, v. 107, p. 885-897, 2009.
- DJORDJEVIC, M.A.; GABRIEL, D.W.; ROLFE, B.G. Rhizobium – the refined parasite of legumes. *Annual Review of Phytopathology*, v. 25, p. 145-168, 1987.
- FAHEY, J.W. Endophytic bacteria for the delivery of agrochemicals to plants. In: CUTLER, H.O. (Ed.). *Biologically Active Natural Products*. Washington: American Chemical Society, 1988. chap.9. p. 120-128.
- FAHEY, J.W.; DIMOCK, M.B.; TOMASINO, S.F.; TAYLOR, J.M.; CARISON, P.S. Genetically engineered endophytes as biocontrol agents: a case study from industry. In: ANDREWS, J.H.; HIRANO, S.S. (Ed.). *Microbial ecology of leaves*. New York: Springer-Verlag, 1991. p. 401-411.
- FILIPPI, M.C.C.; SILVA, G.B.; SILVA-LOBO, V.L.; CÔRTEZ, M.V.C.B.; MORAES, A.J.G.; PRABHU, A.S. Leaf blast (*Magnaporthe oryzae*) suppression and growth promotion by rhizobacteria on aerobic rice in Brazil. *Biological Control*, v. 58, p. 160-166, 2011.
- FORCHETTI, G.; MASCIARELLI, O.; ALEMANO, S.; ALVAREZ, D.; ABDALA, G. Endophytic bacteria in sunflower (*Helianthus annuus* L.): isolation characterization, and production of jasmonates and abscisic acid in culture medium. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 76, p. 1145-1152, 2007.
- GILBERT, B.; AEMUS, B.; HARTMANN, A.; FRENZEL, P. *In situ* localization of two methanotrophic strains in the rhizosphere of rice plants. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 25, p. 117-118, 1998.
- GIRI, R.; DUDEJA, S.S. Root Colonization of Root and Nodule Endophytic Bacteria in Legume and Non Legume Plants Grown in Liquid Medium. *Journal of Microbiology Research and reviews*, v. 1, n. 6, p. 75-82, 2013.
- HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFE, W.F.; KLOEPPER, J.W. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 43, p. 895-914, 1997.
- HARDOIM, P.L.; HARDOIM, C.P.C.; OVERBEEK, L.S.V.; ELSAS, J.D.V. Dynamics of Seed-Borne Rice Endophytes on Early Plant Growth Stages. *PLoS ONE*, v. 7, n. 2, p. 30438, 2012.
- HARDOINHERMAN, M.B.A.; RESTREPO, S.; SMART, C.D. Defense gene expression patterns of three SAR-induced tomato cultivars in the field. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v. 71, p. 192-200, 2007.
- JHA, P.; KUMAR, A. Characterization of novel plant growth promoting endophytic bacterium *Achromobacter xylosoxidans* from wheat plant. *Microbial Ecology*, v. 58, p. 179-188, 2009.
- JHA, P.N.; GUPTA, G.; JHA, P.; MEHROTRA, R. Association of Rhizospheric/Endophytic Bacteria with Plants: A Potential Gateway to Sustainable Agriculture Greener. *Journal of Agricultural Sciences*, v. 3, n. 2, p. 73-84, 2013.

- JOE, M.M.; ISLAM, M.R.; KARTHIKEYAN, B.; BRADEEPA, K.; SIVAKUMAAR, P.K.; SA, T. Resistance responses of rice blast fungus after seed treatment with the endophytic *Achromobacter xylosoxidans* AUM54 strains. *Crop Protection*, v. 42, p. 141-148, 2012.
- KUMAR, K.V.K.; YELLAREDDYGARI, S.K.R.; REDDY, M.S.; KLOEPPER, J.W.; LAWRENCE, K.S.; ZHOU, X.G.; SUDINI, H.; GROTH, D.E.; RAJU, S.K.; MILLER, M.E. Efficacy of *Bacillus subtilis* MBI 600 against sheath blight caused by *Rhizoctonia solani* and on growth and yield of rice. *Rice Science*, v. 19, n. 1, p. 55-63, 2012.
- LASLO, E.; GYÖRGY, E.; MARA, G.; TAMÁS, E.; ÁBRAHÁM, B.; LÁNYI, S. Screening of plant growth promoting rhizobacteria as potential microbial inoculants. *Crop Protection*, v. 40, p. 43-48, 2012.
- LINDOW, S.E.; LEVEAU, J.H.J. Phyllosphere microbiology. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 13, p. 238-243, 2002.
- LUCAS, J.A.; SOLANO, B.R.; MONTES, F.; OJEDA, J.; MEGIAS, M.; GUTIERREZ MAÑERO, F.J. Use of two PGPR strains in the integrated management of blast disease in rice (*Oryza sativa*) in Southern Spain. *Field Crops Research*, v. 114, p. 404-410, 2009.
- PASQUER, F.; ISIDORE, E.; ZARN, J.; KELLER, B. Specific patterns of changes in wheat gene expression after treatment with three antifungal compounds. *Plant Molecular Biology*, v. 57, p. 693-707, 2005.
- QI, G.; ZHANG, X.; ZHAO, X. Endophytic *Bacillus subtilis* WH2 containing *Pinellia ternata* agglutinin showed insecticidal activity against whitebacked planthopper *Sogatella furcifera*. *BioControl*, v. 58, p. 233-246, 2013.
- RAMPELOTTI-FERREIRA, F.T.; FERREIRA, A.; VENDRAMIM, J.D.; LACAVA, P.T.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Colonization of rice and *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae) larvae by genetically modified endophytic *Methylobacterium mesophilicum*. *Neotropical Entomology*, v. 39, n. 2, p. 308-310, 2010.
- REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T. Living inside plants: bacterial endophytes. *Curr Opin Plant Biol.*, v. 14, n. 4, p. 435-443, 2011.
- ROSENBLUETH, M.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Bacterial Endophytes and Their Interactions with Hosts. *MPMI*, v. 19, n. 8, p. 827-837, 2006.
- SGROY, V.; CASSÁN, F.; MASCIARELLI, O.; DEL PAPA, M.F.; LAGARES, A.; LUNA, V. Isolation and characterization of endophytic plant growth-promoting (PGPB) or stress homeostasis-regulating (PSHB) bacteria associated to the halophyte *Prosopis strombulifera*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 85, p. 371-381, 2009.
- SOUZA, R.; BENEDEZI, A.; AMBROSINI, A.; COSTA, P.B.; MEYER, J.; VARGAS, L.K.; SCHOENFELD, R.; PASSAGLIA, L.M.P. The effect of plant growth-promoting rhizobacteria on the growth of rice (*Oryza sativa* L.) cropped in southern Brazilian fields. *Plant and Soil*, v. 366, p. 585-603, 2013.
- WALTER, D.R. Are plants in the field already induced? Implications for practical disease control. *Crop Protection*, v. 28, p. 459-465, 2009.
- WANG, H.; WEN, K.; ZHAO, X.; WANG, X.; LI, A.; HONG, H. The inhibitory activity of endophytic *Bacillus* sp. strain CHM1 against plant pathogenic fungi and its plant growth-promoting effect. *Crop Protection*, v. 28, p. 634-639, 2009.
- WHIPPS, J.M. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, v. 52, p. 487-511, 2001.
- ZHANG, X.; LI, J.; QI, G.; WEN, K.; LU, J.; ZHAO, X. Insecticidal effect of recombinant endophytic bacterium containing *Pinellia ternata* agglutinin against white backed planthopper, *Sogatella furcifera*. *Crop Protection*, v. 30, p. 1478-1484, 2011.