



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA-UFRA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ-UFPA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**SOLANGE DA CUNHA FERREIRA**

**IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS ISOLADAS DE RAÍZES  
DE MANDIOCA (*Manihot esculenta* Crantz) COM POTENCIAL APLICAÇÃO  
NA AGRICULTURA**

**BELÉM**

**2020**

**SOLANGE DA CUNHA FERREIRA**

**IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS ISOLADAS DE RAÍZES  
DE MANDIOCA (*Manihot esculenta* Crantz) COM POTENCIAL APLICAÇÃO  
NA AGRICULTURA**

Tese apresentada à Universidade Federal Rural da  
Amazônia, como parte das exigências do Curso de  
Doutorado em Agronomia: Linha de pesquisa:  
Produção Vegetal em Sistemas Agrícolas, para  
obtenção do título de Doutora em Agronomia.

Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Cláudia Regina Batista de Souza

Co-orientadora: Dr<sup>a</sup>. Elisa Ferreira Moura Cunha

**BELÉM**

**2020**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Bibliotecas da Universidade Federal Rural da Amazônia  
Gerada automaticamente mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

Ferreira, Solange da Cunha

Identificação de bactérias endofíticas isoladas de raízes de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) com potencial aplicação na agricultura / Solange da Cunha Ferreira. - 2020.  
86 f. : il. color.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia (PPGA), Campus Universitário de Belém, Universidade Federal Rural Da Amazônia, Belém, 2020.

Orientador: Profa. Dra. Cláudia Regina Batista de Souza  
Coorientador: Profa. Dra. Elisa Ferreira Moura Cunha.

1. Bactérias endofíticas. 2. Promoção do crescimento de plantas. 3. Controle biológico. 4. *Phytophthium* sp.. 5. Bacteriose da mandioca. I. de Souza, Cláudia Regina Batista, *orient.* II. Título

---

CDD 630

**SOLANGE DA CUNHA FERREIRA**

**IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS ISOLADAS DE RAÍZES DE MANDIOCA (*Manihot esculenta* Crantz) COM POTENCIAL APLICAÇÃO NA AGRICULTURA**

Tese apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do Curso de Doutorado em Agronomia: área de concentração Agronomia, para obtenção do título de Doutora.

Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Cláudia Regina Batista de Souza

Co-orientadora: Dr<sup>a</sup>. Elisa Ferreira Moura Cunha

Data da aprovação: 13/02/2020

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dr<sup>a</sup>. Cláudia Regina Batista de Souza - Orientadora  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ- ICB/UFPA

---

Dr. Agenor Valadares Santos - 1º Examinador  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ- ICB/UFPA

---

Dr<sup>a</sup>. Alessandra Keiko Nakasone - 2º Examinador  
EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL

---

Dr. Ricardo Harakava - 3º Examinador  
INSTITUTO BIOLÓGICO DE SÃO PAULO- IBSP

---

Dr. Sávio Pinho dos Reis - 4º Examinador  
UNIVERSIDADE ESTADUAL DO PARÁ- UEPA

## INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS



**Fundação Amazônia Paraense de Amparo a Pesquisa – FAPESPA**



**Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- CAPES**



**Universidade Federal Rural da Amazônia – UFRA**



**Universidade Federal do Pará – UFPA**



**Programa de Pós Graduação em Agronomia – UFRA**



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Amazônia Oriental - Belém - PA**

## AGRADECIMENTOS

Mais uma fase foi vencida! Só tenho a agradecer, primeiramente, ao meu Deus por me permitir a cada dia vencer meus medos, ter sabedoria e persistência e acreditar que não seria fácil, mas que lutaria como guerreira até o fim...

Agradeço à Universidade Federal Rural da Amazônia e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia por me proporcionar a realização deste curso de doutorado.

A Universidade Federal do Pará e a EMBRAPA Amazônia Oriental por todo apoio dado à pesquisa.

A FAPESPA e a CAPES pelo financiamento do projeto de pesquisa e pela bolsa de estudo.

Aos professores pelos ensinamentos durante todo o curso de doutorado, em especial a Dr<sup>a</sup> Cláudia Regina Batista de Souza e a Dr<sup>a</sup> Elisa Ferreira Mouca Cunha, pela orientação, paciência, atenção e principalmente pela oportunidade de poder realizar este trabalho.

Agradeço a banca pela contribuição e pela participação.

Manifesto aqui a minha gratidão a Dr<sup>a</sup> Alessandra Keiko Nakasone, pelo carinho e pelos ensinamentos, e aos técnicos da EMBRAPA Amazônia Oriental, seu Nivaldo, Aline, Dona Ida e seu Emanuel por todo o apoio dado.

Aos meus amigos e amigas que vivenciaram comigo esta conquista, agradeço o apoio recebido e todos os ensinamentos. Em especial aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular da UFPA e Laboratório de Fitopatologia da EMBRAPA Amazônia Oriental.

Por fim, agradeço em especial aos meus pais, grandes guerreiros, Clara e Sebastião, pelo incentivo e amor incondicional, pois sem eles eu não teria chegado até aqui. As minhas irmãs pelo apoio. Muita gratidão por tudo que fizeram e fazem por mim.

Muito obrigada!

“Sua fé  
derruba seus piores medos  
e seus maiores gigantes.”

## RESUMO

A mandioca é uma cultura de grande importância para a agricultura brasileira e mundial, mas seu cultivo vem enfrentando graves problemas com doenças, como a bacteriose causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* e a podridão radicular ocasionada por *Phytophthium* sp. As bactérias endofíticas são microrganismos que habitam o interior da planta sem causar danos aparentes ao hospedeiro e exercem vários efeitos benéficos, como a supressão de doenças e a promoção do crescimento das plantas. O objetivo deste trabalho foi isolar bactérias endofíticas de raízes sadias de mandioca e caracterizar quanto ao potencial em promover o crescimento de plantas, assim como avaliar a atividade inibitória dessas bactérias contra *Phytophthium* sp. e *X. axonopodis* pv. *manihotis*. No total, foram obtidos 21 isolados de bactérias endofíticas de raízes sadias de mandioca, dos quais 95% produziram AIA em meio com acréscimo de L-triptofano, 33% solubilizaram fosfato inorgânico e 23,8% produziram sideróforos. Seis isolados, 19Y, 21Y, 23Y, 26Y, 29Y e 4W, apresentaram mais de 30% de atividade inibitória contra *Phytophthium* sp., e dois isolados, 26Y e 29Y, inibiram *X. axonopodis* pv. *manihotis*, *in vitro*. Seis isolados (15Y, 16Y, 23Y, 4W, 26Y e 29Y) foram ainda caracterizados em ensaios de inoculação de plantas de mandioca em casa de vegetação, visando o efeito desses isolados na redução da severidade da bacteriose da mandioca. Todos os isolados reduziram a severidade da doença em condições de casa de vegetação. Quatro isolados foram testados por análise de ensaios de inoculação em plantas de mandioca e dois em sementes de feijão-caupi. Todos os isolados testados promoveram o crescimento de plantas de mandioca e feijão-caupi. Com base no sequenciamento do gene 16S rRNA, os oito isolados endofíticos foram identificados como pertencentes a dois gêneros: *Bacillus* e *Klebsiella*. 16Y, 23Y e 4W pertencem à mesma espécie, *Bacillus aryabhatai*, 15Y a *Bacillus cereus* e 26Y e 29Y também pertencem à mesma espécie *Klebsiella pneumoniae*. *B. aryabhatai* foi relatado pela primeira vez como endófito de mandioca. As bactérias endofíticas isoladas de raízes saudáveis de mandioca constituem um importante recurso biológico para a agricultura moderna, devido aos efeitos benéficos dos endófitos no biocontrole de fitopatógenos e na promoção de crescimento de plantas.

**Palavras-chave:** Bactérias endofíticas; Promoção do crescimento de plantas; Controle biológico; *Phytophthium* sp; Bacteriose da mandioca.

## ABSTRACT

Cassava is a crop of great importance for Brazilian and world agriculture, but its cultivation has been facing serious problems with diseases, such as bacteriosis caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* and root rot caused by *Phytophthium* sp. Endophytic bacteria are microorganisms that inhabit the interior of the plant without causing apparent damage to the host and exert several beneficial effects, such as the suppression of diseases and the promotion of plant growth. The objective of this work was to isolate endophytic bacteria from healthy cassava roots and to characterize the potential to promote plant growth, as well as to evaluate the inhibitory activity of these bacteria against *Phytophthium* sp. and *X. axonopodis* pv. *manihotis*. In total, 21 isolates of endophytic bacteria from healthy cassava roots were obtained, of which 95% produced AIA in medium with addition of L-tryptophan, 33% solubilized inorganic phosphate and 23.8% produced siderophores. Six isolates, 19Y, 21Y, 23Y, 26Y, 29Y and 4W, showed more than 30% inhibitory activity against *Phytophthium* sp., and two isolates, 26Y and 29Y, inhibited *X. axonopodis* pv. *manihotis*, *in vitro*. Six isolates (15Y, 16Y, 23Y, 4W, 26Y and 29Y) were also characterized in inoculation tests of cassava plants in a greenhouse, aiming at the effect of these isolates in reducing the severity of cassava bacteriosis. All isolates reduced the severity of the disease under greenhouse conditions. Four isolates were tested by analyzing inoculation tests on cassava plants and two on cowpea seeds. All tested isolates promoted the growth of cassava and cowpea plants. Based on the sequencing of the 16S rRNA gene, the eight endophytic isolates were identified as belonging to two genera: *Bacillus* and *Klebsiella*. 16Y, 23Y and 4W belong to the same species, *Bacillus aryabhatai*, 15Y to *Bacillus cereus* and 26Y and 29Y also belong to the same species *Klebsiella pneumoniae* species. *B. aryabhatai* was first reported as an endophyte of cassava. Endophytic bacteria isolated from healthy cassava roots are an important biological resource for modern agriculture, due to the beneficial effects of endophytes on the biocontrol of phytopathogens and the promotion of plant growth.

**Keywords:** Endophytic bacteria; Plant Growth Promotion; Biological control; *Phytophthium* sp; Cassava bacteriosis.

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

**Figura 1.** Raízes saudáveis de seis acessos de mandioca, sendo três de polpa branca (A) e três amarelas (B), coletadas no Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA.

**Figura 2.** Isolados de bactérias endofíticas de raízes sadias de mandioca com a coloração da polpa amarela (A) e branca (B), cultivadas em meio TSA e analisadas por meio do gene 16S rRNA.

**Figura 3.** Ensaio de inibição do crescimento micelial de *Phytophthium* sp. por bactérias endofíticas de raízes sadias de mandioca em meio BDA com 3 dias após a incubação.

**Figura 4.** Curva padrão para determinação da concentração de AIA no teste colorimétrico.

**Figura 5.** Produção de AIA pelas bactérias endofíticas de mandioca com 24 e 48 horas de crescimento bacteriano em meio TSB, na presença de triptofano.

**Figura 6.** Maior produção de AIA, no período de 48 horas de crescimento bacteriano em meio TSB, na presença de triptofano, pelos isolados de bactérias endofíticas 4W, 23Y e 8W de raízes sadias de mandioca, em comparação ao tratamento controle.

**Figura 7.** Halos de solubilização formado pelos isolados de bactérias endofíticas 1Y, 7Y, 15Y, 16Y, 23Y, 25Y e 4W em meio NBRIP-ágar após 7 dias de incubação, em relação ao controle.

**Figura 8.** Curva padrão para determinação da concentração de fósforo solúvel ( $\mu\text{g/mL}$ ) produzido pelos isolados de bactérias endofíticas de mandioca em meio NBRIP.

**Figura 9.** Concentração de fósforo solúvel em  $\mu\text{g/mL}$  em meio NBRIP inoculado pelos isolados de bactérias endofíticas de mandioca 4W, 1Y, 7Y, 15Y, 16Y, 23Y e 25Y após 24 horas de cultivo, em relação ao tratamento controle.

**Figura 10.** Detecção da produção de sideróforos por isolados de bactérias endofíticas de mandioca, testados em dois meios pobres em ferro: LB 2% e TSB 0,6%, através de ensaios com reagente CAS (Cromo Azurol S).

**Figura 11.** Efeito da inoculação dos isolados de bactérias endofíticas 23Y e 4W na parte aérea (A) e na raiz (B) de plantas de feijão-caupi, em relação ao tratamento controle.

**Figura 12.** Efeito da inoculação, pelo método de irrigação do substrato (A) e pulverização foliar (B), dos isolados de bactérias endofíticas 15Y, 16Y, 23Y e 4W na parte aérea e na raiz em plantas de mandioca em relação ao tratamento controle.

**Figura 13.** Escala diagramática para a determinação da severidade da mancha angular do feijoeiro, usada para quantificar a bacteriose em plantas de mandioca, causada por *X. axonopodis* pv. *manihotis*, indicando níveis de 1, 5, 10, 20, 40 e 60% de severidade da doença.

**Figura 14.** Efeito dos isolados de bactérias endofíticas sobre o crescimento *in vitro* de *X. axonopodis* pv. *manihotis*.

**Figura 15.** Isolados de bactérias endofíticas 26Y e 29Y, identificados como *K. pneumoniae* cepa DSM 30104, inibindo o crescimento de *X. axonopodis* pv. *manihotis*, *in vitro*, em relação ao controle (sem halo de inibição).

**Figura 16.** Controle biológico de *X. axonopodis* pv. *manihotis* por bactérias endofíticas isoladas de raízes saudáveis de mandioca em casa de vegetação. Foram utilizados dois métodos de inoculação: (A) Irrigação do substrato e (B) Pulverização foliar.

**Tabela 1.** Sequências dos iniciadores utilizados para amplificação do gene 16S rRNA das bactérias endofíticas isoladas de raízes saudáveis de mandioca.

**Tabela 2.** Bactérias endofíticas obtidas de seis acessos de mandioca, sendo três com a coloração da polpa das raízes branca e três amarelas.

**Tabela 3.** Atividade antagônica de bactérias endofíticas de raízes saudáveis de mandioca contra *Phytophthium* sp., *in vitro*.

**Tabela 4.** Produção de AIA ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) por bactérias endofíticas isoladas de raízes saudáveis de mandioca, no período de 24 e 48 horas de crescimento bacteriano em meio TSB, na presença de triptofano.

**Tabela 5.** Índice de solubilização formado pelos isolados de bactérias endofíticas de mandioca, em meio NBRIP-ágar, após sete dias de incubação.

**Tabela 6.** Solubilização de fosfato ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e pH do meio NBRIP, após a inoculação de isolados de bactérias endofíticas de mandioca em diferentes intervalos de tempos.

**Tabela 7.** Efeito da inoculação dos isolados de bactérias endofíticas 23Y e 4W nos parâmetros de crescimento vegetativo de plantas de feijão-caupi.

**Tabela 8.** Efeito da inoculação de isolados de bactérias endofíticas na promoção de crescimento de plantas de mandioca, utilizando o método de inoculação por irrigação do substrato.

**Tabela 9.** Efeito da inoculação de isolados de bactérias endofíticas na promoção de crescimento de plantas de mandioca, utilizando o método de inoculação por pulverização da parte aérea das plantas.

**Tabela 10.** Análise comparativa de sequências parciais do gene 16S rRNA (fragmentos de aproximadamente 1500 pares de bases) de bactérias endofíticas isoladas de raízes saudáveis de mandioca com sequências contidas em bancos de dados no NCBI.

**Tabela 11.** Média dos halos de inibição formada pelos isolados de bactérias endofíticas de mandioca *in vitro* à *X. axonopodis* pv. *manihotis*.

**Tabela 12.** Efeito de seis isolados de bactérias endofíticas, na redução de sintomas da bacteriose da mandioca, em casa de vegetação, utilizando dois métodos de inoculação: irrigação e pulverização.

## LISTA DE ABREVIATURAS

BPCP	Bactérias Promotoras de Crescimento de Plantas
IPTG	Isopropiltiogalactosídeo
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
LB	Luria Bertani
TS	Triptona de Soja
M	Molar
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mV	Milivolt
ng	Nanogramas
pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
<i>M. esculenta</i> Crantz	<i>Manihot esculenta</i> Crantz
rpm	Rotações por minuto
SDS	Sulfato Dodecil de Sódio
µg	Micrograma
µL	Microlitro
BAG	Banco Ativo de Germoplasma
Y	Bactéria endofítica de raiz amarela de mandioca
W	Bactéria endofítica de raiz branca de mandioca

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b>	<b>7</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>8</b>
<b>1. CONTEXTUALIZAÇÃO</b>	<b>16</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>21</b>
<b>2. Isolamento e prospecção de bactérias endofíticas com potencial para a promoção de crescimento de plantas e biocontrole de <i>Phytophthium</i> sp.</b>	<b>26</b>
<b>RESUMO</b>	<b>26</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>27</b>
<b>2.1. INTRODUÇÃO</b>	<b>28</b>
<b>2.2. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>29</b>
<b>2.2.1. Material vegetal para o isolamento de bactérias endofíticas associadas à mandioca</b>	<b>29</b>
<b>2.2.2. Isolamento de bactérias endofíticas de raízes sadias de mandioca</b>	<b>30</b>
<b>2.2.3. Identificação molecular dos isolados de bactérias endofíticas</b>	<b>31</b>
<b>2.2.3.1. Extração de DNA genômico das bactérias endofíticas</b>	<b>31</b>
<b>2.2.3.2. Amplificação do gene 16S rRNA e análise da sequência</b>	<b>32</b>
<b>2.2.4. Seleção de bactérias endofíticas com potencial para controlar <i>Phytophthium</i> sp.</b>	<b>32</b>
<b>2.2.5. Seleção de bactérias endofíticas com potencial para a promoção de crescimento vegetal</b>	<b>33</b>
<b>2.2.5.1. Avaliação da capacidade das bactérias endofíticas em produzir o ácido indol acético (AIA)</b>	<b>33</b>
<b>2.2.5.2. Avaliação da capacidade das bactérias endofíticas em solubilizar o fosfato de cálcio, <i>in vitro</i></b>	<b>34</b>
<b>2.2.5.3. Avaliação da capacidade das bactérias endofíticas selecionadas em produzir sideróforos</b>	<b>35</b>

2.2.6. Efeito dos isolados de bactérias endofíticas no crescimento de plantas de feijão-caupi ( <i>Vigna unguiculata</i> )	36
2.2.7. Efeito dos isolados de bactérias endofíticas no crescimento de plantas de mandioca	37
2.2.8. Análise estatística	38
2.3. RESULTADOS	38
2.3.1. Identificação de bactérias endofíticas de mandioca	38
2.3.2. Biocontrole de <i>Phytophthium</i> sp. por bactérias endofíticas de mandioca	40
2.3.3. Seleção de bactérias endofíticas com potencial para a promoção de crescimento de plantas	44
2.3.3.1. Avaliação da capacidade das bactérias endofíticas em produzir o ácido indol acético (AIA)	44
2.3.3.2. Seleção de bactérias endofíticas com potencial para solubilizar fosfato inorgânico	47
2.3.3.2.1. Em meio NBRIP - Ágar	47
2.3.3.2.2. Análise quantitativa da solubilização de fosfato	49
2.3.3.3. Produção de sideróforos	52
2.3.4. Efeito dos isolados 23Y e 4W no crescimento de feijão-caupi	53
2.3.5. Resposta do crescimento de plantas de mandioca à inoculação com bactérias endofíticas	55
2.4. DISCUSSÃO	58
2.5. CONCLUSÃO	61
AGRADECIMENTOS	62
REFERÊNCIAS	63
3. Bactérias endofíticas como agentes de biocontrole de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i> em mandioca	69
RESUMO	69
ABSTRACT	70

<b>3.1. INTRODUÇÃO</b>	<b>71</b>
<b>3.2. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>72</b>
<b>3.2.1. Origem e preservação de <i>X. axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i></b>	<b>72</b>
<b>3.2.2. Efeito <i>in vitro</i> dos isolados de bactérias endofíticas de mandioca sobre o crescimento de <i>X. axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i></b>	<b>73</b>
<b>3.2.3. Bactérias endofíticas com potencial para controlar a bacteriose da mandioca em casa de vegetação</b>	<b>73</b>
<b>3.3. RESULTADOS</b>	<b>75</b>
<b>3.3.1. Efeito <i>in vitro</i> dos isolados de bactérias endofíticas de mandioca sobre <i>X. axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i></b>	<b>75</b>
<b>3.3.2. Bactérias endofíticas no controle de <i>X. axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i>, em casa de vegetação</b>	<b>78</b>
<b>3.4. DISCUSSÃO</b>	<b>81</b>
<b>3.5. CONCLUSÃO</b>	<b>83</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>84</b>

## 1. CONTEXTUALIZAÇÃO

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é um arbusto perene e lenhoso pertencente à família Euphorbiaceae, nativa da América do Sul, cultivada em áreas tropicais e subtropicais em todo o mundo, devido o uso de suas raízes amiláceas comestíveis (tubérculos), que são uma importante fonte de alimento no mundo em desenvolvimento, incluindo África, América do Sul e Oceania (NAYAK et al., 2017).

Na cultura da mandioca um dos principais motivos de perda na produção é a podridão radicular ocasionado por um complexo de fungos e oomicetos como *Phytophthium* sp. e a bacteriose causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. Assim, a podridão radicular vem se tornando um problema frequente, pois se trata de uma doença de alto impacto econômico e social no Brasil, com queda progressiva na produtividade e inviabilizando áreas de plantio ao longo dos ciclos da cultura (SERRA et al., 2009). Recentemente, Boari et al. (2018), identificaram pela primeira vez, o oomiceto *Phytophthium* sp, causando o apodrecimento mole de raízes de mandioca, na região norte do Brasil, em um plantio localizado em Ipixuna no Estado do Pará.

A podridão radicular é considerada a principal doença da mandioca no Estado do Pará, ocasionando perdas em torno de 60% na produção (LOZANO, 1992). Segundo Poltronieri et al. (1993), os agricultores na tentativa de reduzirem as perdas, antecipam a colheita e isso, conseqüentemente, reduz o rendimento em virtude das raízes não terem completado o seu ciclo de maturação.

Além desta doença, a mandioca é atacada *X. axonopodis* pv. *manihotis* que tem o potencial de reduzir a produção e inviabilizar novos cultivos, pois o patógeno pode ser disseminado a longas distâncias pelo próprio material propagativo (LÓPEZ & BERNAL, 2012), e em ataques severos, pode ocorrer a destruição da parte aérea da planta e decréscimo na produção de raízes (ALMEIDA et al., 2009).

Plantas infectadas por *X. axonopodis* pv. *manihotis* mostram a presença de manchas angulares típicas e de aparência aquosa, à medida que a doença se desenvolve em curto espaço de tempo, as folhas atacadas secam, os pecíolos murcham e se soltam até a morte da planta (ABDULAI et al., 2018).

O primeiro relato da doença no Estado do Pará foi feito por Deslandes (1994), em áreas produtoras de mandioca, sendo constatados apenas casos com a presença de manchas foliares. É de ocorrência comum em todas as regiões onde se cultiva a mandioca, sendo mais severa no período chuvoso (PEREIRA; ZAGATTO, 1967; LOZANO; SEQUEIRA, 1974; LOZANO, 1986; MIURA; MONTEIRO, 1997).

Assim, algumas doenças causadas por fitopatógenos comprometem a segurança alimentar e a estabilidade econômica em diversos países. Aliado a este cenário, acrescenta-se a vigente demanda por um manejo agrícola sustentável, priorizando o respeito ao meio ambiente em detrimento ao uso indiscriminado de defensivos agrícolas (DALLAGNOL et al., 2018). Nesse sentido, o uso de bactérias endofíticas tem sido muito estudado para o controle de doenças em plantas, atividades de promoção do crescimento e na biorremediação de áreas poluídas (NEWMAN & REYNOLDS, 2005, PEREIRA et al., 2016, LIOTTI et al., 2018, XU et al., 2019).

Bactérias endofíticas são microrganismos não patogênicos que residem no interior dos tecidos vivos das plantas saudáveis e são encontrados em folhas, ramos, raízes e sementes, sem causar danos aparentes a seus hospedeiros (HALLMANN et al., 1997, BACON & WHITE, 2000).

Com base nisso, quando as bactérias endofíticas são encontradas colonizando as raízes das plantas e podem promover o seu crescimento, através do aumento da absorção de nutrientes e água do solo, elas são denominadas de Bactérias Promotoras de Crescimento de Plantas (BPCPs).

Os mecanismos de promoção de crescimento vegetal pelas BPCPs podem ser diretos ou indiretos. Os diretos podem ser a produção de fitohormônios, como o ácido indol acético (AIA), que influenciam no crescimento e desenvolvimento da planta (MACHADO et al., 2011), ou ainda suprimindo suas necessidades nutricionais pela solubilização de fosfatos (BEHERA et al., 2017) e produção de sideróforos (GLICK, 2012). Já os benefícios indiretos de promoção de crescimento podem ser através da ação das bactérias endofíticas controlando os fitopatógenos, através de competição de nutrientes, produção de substâncias antibióticas, parasitando o patógeno ou mesmo

induzindo a planta a desenvolver resistência às doenças (MENEZES, 2012, AKBABA et al., 2018).

As BPCPs podem induzir a resistência sistêmica (ISR) e essa resistência se desenvolve sistematicamente em resposta à colonização do sistema radicular principalmente por essas BPCPs sem provocar necrose, a qual é mediada por uma rota sensível ao ácido jasmônico (AJ) e ao etileno (ET) (PIETERSE et al., 2014). Porém, quando as plantas são expostas a indutores de resistência e ficam protegidas da ação de fitopatógenos não se pode necessariamente assumir que ocorreu a indução de resistência, uma vez que o agente indutor pode ser capaz de atuar diretamente sobre o patógeno.

Nesse ponto de vista, Steiner & Schonbeck (1995) apresentaram alguns critérios para determinar se a resistência mostrada pela planta foi realmente induzida ou se foi resultado de outros fatores que de algum modo contribuíram para a redução da severidade ou incidência da doença. Os critérios são: ausência de efeitos tóxicos do agente indutor sobre o patógeno desafiante; necessidade de tempo entre a exposição ao indutor e a manifestação da resistência e a ausência de relação entre o nível de expressão da resistência e incrementos na aplicação do agente indutor (STEINER; SCHONBECK, 1995).

As BPCPs podem promover o crescimento das plantas, assim, quanto à produção do fitohormônio, a síntese de auxinas, particularmente o ácido indol acético (AIA) promove o crescimento das raízes e a proliferação de pelos radiculares, o que pode melhorar a absorção de água e nutrientes do solo e, conseqüentemente, melhorar o crescimento e a produtividade da planta (CABALLERO-MELLADO et al., 2006). Vários estudos têm reportado que os microrganismos endofíticos estão ativamente envolvidos na síntese de auxinas, tanto em meio de cultura quanto no solo (LANA et al., 2017, CARVALHO FILHO, 2008).

O aminoácido L-triptofano tem sido usado como precursor fisiológico para a biossíntese de auxinas em plantas e microrganismos (KHALID et al., 2004). Os exsudados radiculares são fontes naturais de L-triptofano para a microbiota do solo, contribuindo para a síntese microbiana de AIA (LUM & HIRSCH, 2003).

Quanto à capacidade de solubilização de fosfatos, diversos microrganismos do solo, como fungos e bactérias, solubilizam diferentes formas de fosfatos inorgânicos. Esses microrganismos conseguem solubilizar o fosfato através da produção de ácidos orgânicos, inorgânicos e através da redução do pH. Quando inoculadas aumentam o crescimento e melhoram o rendimento das plantas (DAS et al., 2013). Assim, a utilização de microrganismos que possuem a capacidade de realizar este tipo de solubilização tem sido empregada como forma de substituir ou reduzir o uso de fertilizantes fosfáticos solúveis, pois dessa forma haverá melhor aproveitamento dos fosfatos naturais (SILVA FILHO et al., 2002).

Os sideróforos são moléculas sequestradoras de ferro de baixo peso molecular (500-1500 Daltons) (REICHARD, 2005; KHAN et al., 2017) e quando produzidos por microrganismos fornecem vários efeitos benéficos para as plantas, pois podem promover o seu crescimento, melhorar o seu rendimento através da absorção de ferro pelas plantas (GAMALERO & GLICK, 2011) e podem inibir o desenvolvimento de fitopatógenos (SHARMA & JOHRI, 2003, YU et al., 2011; AHMED & HOLMSTROM, 2014).

Técnicas moleculares baseada na amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento do gene 16S rRNA são ferramentas muito importantes usadas para a identificação de novas bactérias endofíticas (SCHLABERG et al., 2012). O gene 16S rRNA tem sido muito utilizado para avaliar a diversidade de bactérias endofíticas com excelente sucesso, pois é composto por aproximadamente 1500 pares de nucleotídeos sendo dotado de regiões altamente conservadas (BREDOW et al., 2015). Assim, entre as vantagens do uso do gene 16S rRNA está a sua universalidade, pois ele está presente em quase todas as bactérias, permitindo sua utilização na identificação (KEMBEL et al., 2012). O alto grau de conservação da sequência do gene 16S rRNA dentro das espécies é um importante fator para diferenciar organismos. Além de seu tamanho, é grande o suficiente para ser amplificado usando a PCR, e, portanto, pode ser usado em análises filogenéticas (WOO et al., 2008).

Assim, o potencial das bactérias endofíticas para uma produção agrícola sustentável é enorme, já que muitos endófitos podem atuar como promotores do crescimento de plantas e no controle biológico de fitopatógenos, oferecendo o mínimo

de riscos ao meio ambiente. Este trabalho teve como objetivo isolar, caracterizar, selecionar e identificar bactérias endofíticas de raízes sadias de mandioca com potencial para promover o crescimento de plantas e inibir o desenvolvimento de fitopatógenos como *Phytophthium* sp. e *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*, causadores de doenças em plantas de mandioca na Amazônia Oriental.

O trabalho teve como hipóteses: Primeiro artigo: 1. As bactérias endofíticas isoladas de raízes sadias de mandioca produzem alguns compostos entre eles AIA, sideróforos e solubilizam fosfato de cálcio; 2. As bactérias endofíticas isoladas de raízes sadias de mandioca inibem o crescimento micelial de *Phytophthium* sp., *in vitro* e do segundo artigo: 1. As bactérias endofíticas isoladas de raízes sadias de mandioca suprimem o crescimento de *X. axonopodis* pv. *manihotis*, *in vitro*; 2. As bactérias endofíticas isoladas de raízes sadias de mandioca reduzem a severidade da bacteriose em plantas de mandioca, em casa de vegetação.

## REFERÊNCIAS

- ABDULAI, M., BASIM, H., BASIM, E., BAKI, D., ÖZTÜRK, N. Detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*, the causal agent of cassava bacterial blight diseases in cassava (*Manihot esculenta*) in Ghana by polymerase chain reaction. **European Journal of Plant Pathology**, v.150, n.2, p.471-484, 2018.
- AHMED, E., HOLMSTROM, S.J.M. Siderophores in environmental research: roles and applications. **Microbial Biotechnology**, v.7, p. 196–208, 2014.
- AKBABA, M., OZAKTAN, H. Biocontrol of angular leaf spot disease and colonization of cucumber (*Cucumis sativus* L.) by endophytic bacteria. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v.28, n.1, p.14, 2018.
- ANSARY, W. R., PRINCE, F. R. K., HAQUE, E., SULTANA, F., WEST, H. M., RAHMAN, M., ISLAM, T. Endophytic *Bacillus* spp. from medicinal plants inhibit mycelial growth of *Sclerotinia sclerotiorum* and promote plant growth. **Zeitschrift für Naturforschung**, v.73, n.5-6, p.247-256, 2018.
- BACON, C. W. & WHITE, J. (Eds.). **Microbial endophytes**. CRC press, 2000.
- BEHERA, B. C., YADAV, H., SINGH, S. K., MISHRA, R. R., SETHI, B. K., DUTTA, S. K., THATOI, H. N. Phosphate solubilization and acid phosphatase activity of *Serratia* sp. isolated from mangrove soil of Mahanadi river delta, Odisha, India. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 15, n. 1, p.169-178, 2017.
- BOARI, A. J., QUADROS, A. F. F., CUNHA, E. M., FERNANDES, A. F., BARRETO, R. W. First report of *Phytophthium* sp. causing storage root rot and foliage blight of cassava in Brazil. **Plant Disease**, v. 102, n. 5, p. 1042-1042, 2018.
- BREDOW, C., AZEVEDO, J. L., PAMPHILE, J. A., MANGOLIN, C. A., RHODEN, S. A. In silico analysis of the 16S rRNA gene of endophytic bacteria, isolated from the aerial parts and seeds of important agricultural crops. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 3, p. 9703–9721, 2015.
- CABALLERO-MELLADO, J. Microbiología agrícola y interacciones microbianas con plantas. **Revista Latinoamericana de Microbiología**, México, v. 48, n. 2, p. 154-161, 2006.
- CARVALHO FILHO, M.R. *Trichoderma* spp. como agentes de biocontrole de *Cylindrocladium scoparium* e como promotores de crescimento de mudas de eucalipto. Brasília: Universidade de Brasília. 74p. Dissertação Mestrado, 2008.
- CUI, W., HE, P., MUNIR, S., HE, P., HE, Y., LI, X., HE, P. Biocontrol of soft rot of Chinese cabbage using an endophytic bacterial strain. **Frontiers in microbiology**, p.10, 2019.

DAS, A. J., KUMAR, M., KUMAR, R. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): an alternative of chemical fertilizer for sustainable, environment friendly agriculture. **Research Journal Agric of Forestry Sciences**, v. 1, n. 4, p. 21-23, 2013.

DESLANDES, J. A. Observações fitopatológicas na Amazônia. **Boletim Fitossanitário**, Rio de Janeiro, v. 1, p. 202-203, 1944.

GAMALERO, E., GLICK, B.R. Mechanisms used by plant growth- promoting bacteria. In *Bacteria in Agrobiolology: Plant Nutrient Management*. **Springer**, Berlin Heidelberg, p. 17-46, 2011.

GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. **Scientifica**, 2012.

HALMANN, J., KLOEPPER, J.W., RODRIGUEZ- KABANA, R. Application of the scholander pressure bomb to studies on endophytic bacteria of plants. **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, p.411-416, 1997.

KHALID, A., ARSHAD, M., ZAHIR, Z. A. Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, n. 3, p. 473-480, 2004.

KHAN, A., SINGH, P., SRIVASTAVA, A. Synthesis, nature and utility of universal iron chelator – siderophore: a review. **Microbiological research**, v. 212, p. 103-111, 2018.

KEMBEL, S.W., WU, M., EISEN, J.A., GREEN, J.L. Incorporating 16S gene copy number information improves estimates of microbial diversity and abundance. **PLoS Computational Biology**, v. 8, p. 100-743, 2012.

LANA, U. D. P., RIBEIRO, V., GOMES, E. PAIVA, C. Seleção em larga escala de bactérias produtoras do hormônio ácido indolacético (AIA), auxina associada à promoção de crescimento em plantas. **Embrapa Milho e Sorgo-Documents (INFOTECA-E)**, 2017.

LEITE, M. C. D. B. S., PEREIRA, A. P. D. A., SOUZA, A. J. D., ANDREOTE, F. D., FREIRE, F. J., SOBRAL, J. K. Bioprospection and genetic diversity of endophytic bacteria associated with cassava plant. **Revista Caatinga**, v. 31, n.2, p. 315-325, 2018.

LIOTTI, R.G., DA SILVA FIGUEIREDO, M.I., DA SILVA, G.F., DE MENDONÇA, E.A.F., SOARES, M.A. Diversity of cultivable bacterial endophytes in *Paullinia cupana* and their potential for plant growth promotion and phytopathogen control. **Microbiological research**, v.207, p.8-18, 2018.

LÓPEZ, C., BERNAL, A. Cassava bacterial blight: Using genomics for the elucidation and Management of an old Problem. **Tropical Plant Biology**, v.5, p.117-126, 2012.

LOZANO, J. C. Cassava bacterial blight: a manageable disease. **Plant Disease**, v. 70, n.11, p.1089-1093, 1986.

LOZANO, J. C. Outbreaks of cassava diseases and losses induced. **Fitopatologia Brasileira**, v.14, n. 1, p.7-11, 1989.

LOZANO, J. C., SEQUEIRA, L. Bacterial blight of cassava in Colombia: I. Etiology. **Phytopathology**, v.64, n. 1, p.74-82, 1974.

LUM, M.R., HIRSCH, A.M. Rots and their symbiotic microbes: Strategies to obtain nitrogen and phosphorus in a nutrient limiting environment. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 21, n. 4, p. 368-382, 2003.

MACHADO, R.G., SÁ, E.L.S., DAMASCENO, R.G., HAHN, L., ALMEIDA, D., MORAES, T., CAMARGO, F.A.O., REARTES, D.S. Promoção de crescimento de *Lotus corniculatus* L. e *Avena strigosa* Schreb pela inoculação conjunta de *Trichoderma harzianum* e rizóbio. **Ciência e Natura**, Santa Maria, v. 33, n. 2, p. 111-126, 2011.

MENEZES, T. S. A., SANTOS, T. C., DE FÁTIMA ARRIGONI-BLANK, M., BLANK, A. F. Embriogênese somática de variedades superiores de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). **Revista GEINTEC-Gestão, Inovação e Tecnologias**, v.2, n.1, p.32-41, 2012.

MIURA, L.; MONTEIRO, A. J. A. Mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) – Controle de doenças. In: VALE, F. X. R. do; ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Controle de doenças de plantas: grandes culturas**. Viçosa, MG: UFV, Departamento de Fitopatologia; Brasília – DF: Ministério da Agricultura e do Abastecimento. v. 2, p. 791-814, 1997.

NAYAK, S.; MUKHERJEE, A.; SAMANTA, S. Endophytic microorganisms of tropical tuber crops: Potential and perspectives. **Journal of Applied and Natural Science**, v. 9, n. 2, p. 860-865, 2017.

NASCIMENTO, S. B., LIMA, A. M., BORGES, B. N., DE SOUZA, C. R. B. Endophytic bacteria from *Piper tuberculatum* Jacq.: isolation, molecular characterization, and *in vitro* screening for the control of *Fusarium solani* f. sp *piperis*, the causal agent of root rot disease in black. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n.3, p.7567-7577, 2015.

NEILANDS, J. B., NAKAMURA, K. **Handbook of microbial iron chelates**. 1991.

NEWMAN, L.A., REYNOLDS, C.M. Bacteria and phytoremediation: new uses for endophytic bacteria in plants. **Trends in Biotechnology**, v.23, p.6-8, 2005.

PEREIRA, A. L. G., ZAGATTO, A. G. Etiology of angular leaf spot of cassava (*Manihot utilissima*). **Archivos do Instituto Biológico**, v. 34, p.153-160,1967.

PEREIRA, S.I.A., MONTEIRO, C., VEGA, A.L. CASTRO, P.M.L. Endophytic culturable bacteria colonizing *Lavandula dentata* L. plants: Isolation, characterization

and evaluation of their plant growth-promoting activities. **Ecological Engineering**, v. 87, p. 91–97, 2016.

POLTRONIERI, L. S., TRINDADE, D. R., CARDOSO, E. M. R. **Controle da podridão radicular da mandioca no Estado do Pará**. Belém, PA: EMBRAPA-CPATU,. 3p. (EMBRAPA-CPATU. Recomendações básicas, 24), 1993.

REICHARD, P.U. **Effects of microbial and plant siderophore ligands on the dissolution of iron oxides**. 2005.189 f. Dissertação de Doutorado em Ciências Naturais. Swiss Federal Institute of Technology, Zurich, 2005.

SERRA, I.M.R.S., SILVA, G.S., NASCIMENTO, F.S., LIMA, L. K. F. *Scybalidium lignicola* em mandioca: ocorrência no Estado do Maranhão e reação de acessos ao patógeno. **Summa Phytopathologica**, v. 35, p. 327-328, 2009.

SHARMA, A., JOHRI, B.N. Crescimento que promove a influência de cepas de *Pseudomonas* produtoras de sideróforo GRP3A e PRS9 em milho (*Zea mays* L.) em condições limitantes de ferro. **Pesquisa microbiológica** , v. 158, n. 3, p. 243-248, 2003.

SCHLABERG, R., SIMMON, K.E., FISHER, M.A. A systematic approach for discovering novel, clinically relevant bacteria. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, p. 422-430, 2012.

SHARMA, A., JOHRI, B.N. Crescimento que promove a influência de cepas de *Pseudomonas* produtoras de sideróforo GRP3A e PRS9 em milho (*Zea mays* L.) em condições limitantes de ferro. **Pesquisa microbiológica** , v. 158, n. 3, p. 243-248, 2003.

SILVA FILHO, G.N. & VIDOR, C. Solubilização de fosfato por microrganismos na presença de fontes de carbono. **Revista Brasileira de Ciencia do Solo**, v. 24, p. 311-319, 2000.

TEIXEIRA, M. A., DE MELO, I. S., VIEIRA, R. F., COSTA, F. E. C., HARAKAVA, R. Microrganismos endofíticos de mandioca de áreas comerciais e etnovarietades em três estados brasileiros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 1, p. 43-49, 2007.

XU, W., WANG, F., ZHANG, M., OU, T., WANG, R., STROBEL, G., XIE, J. Diversity of cultivable endophytic bacteria in mulberry and their potential for antimicrobial and plant growth-promoting activities. **Microbiological research**, v.229, p. 26328, 2019.

WELLER, D.M., RAAIJMAKERS, J.M., GARDENER, B.B.M., THOMASHOW, L.S. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v.40, p.309-348, 2002.

WOO, P. C. Y., LAU, S. K. P., TENG, J. L. L., TSE, H., YUEN, K. Y. Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identifications and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 14, p. 908-934, 2008.

YU, X., AI, C., XIN, L., ZHOU, G. The siderophore producing bacterium, *Bacillus subtilis* CAS15, has a biocontrol effect on *Fusarium* wilt and promotes the growth of pepper. **European Journal of Soil Biology**, v. 47, p. 138–145, 2011.

## ARTIGO I

### 2. Isolamento e prospecção de bactérias endofíticas com potencial para a promoção do crescimento de plantas e biocontrole de *Phytophthium* sp.

<sup>1,2</sup>Solange da Cunha Ferreira, <sup>3</sup>Alessandra Keiko Nakasone, <sup>3</sup>Elisa Ferreira Moura Cunha, <sup>1,2</sup>Danyllo Amaral de Oliveira, <sup>1</sup>Cláudia Regina Batista de Souza

<sup>1</sup>Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, PA, 66075-110, Brasil. <sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, PA, CEP 66077-530, Brasil. <sup>3</sup>Embrapa Amazônia Oriental, Trav. Dr. Enéas Pinheiro, s/n 66095-903, Belém, Pará, Brasil. \*Autor correspondente: bsouza@ufpa.br

### RESUMO

A mandioca é uma cultura de grande importância no cenário agrícola mundial, devido ao uso de suas raízes que se destacam como fonte de energia, sendo consumida por milhões de pessoas. Foi isolado um total de 21 bactérias endofíticas de raízes sadias de mandioca. Esses isolados foram caracterizados quanto ao potencial de promoção do crescimento de plantas e a atividade inibitória dessas bactérias contra *Phytophthium* sp. foi avaliado *in vitro*. Quatro destes isolados foram testados em ensaios de inoculação de mudas de mandioca e dois em feijão-caupi. 95 % dos isolados produziram AIA, 33% solubilizaram fosfato de cálcio e 42% produziram sideróforos. Seis isolados apresentaram efeito inibitório *in vitro* a *Phytophthium* sp. Com base no sequenciamento parcial do gene 16S rRNA, os seis antagonistas endofíticos foram identificados como pertencentes a dois gêneros: *Bacillus* e *Klebsiella*. O isolado 21Y (*Bacillus velezensis*) apresentou a maior atividade inibitória (60,7%). Os isolados 23Y e 4W, ambos identificados como *Bacillus aryabhattai*, promoveram o crescimento de plantas de feijão-caupi e mandioca. Todos os isolados testados, quando irrigados no substrato onde foram plantadas as manivas de mandioca, apresentaram melhores resultados em relação à promoção de crescimento de plantas de mandioca, melhorando tanto o comprimento da parte aérea quanto da raiz dessas plantas. As bactérias endofíticas isoladas de mandioca são importantes recursos na busca de inibidores específicos de fitopatógenos e na promoção de crescimento vegetal. Nós descrevemos, pela primeira vez, a identificação molecular da espécie *B. aryabhattai*, como bactéria endofítica de mandioca na região Amazônica.

**Palavras-chave:** Ácido Indol Acético; Solubilização de Fosfato; Sideróforos, *Phytophthium* sp., *Bacillus aryabhattai*, Bioinoculante.

## ABSTRACT

Cassava is a crop of great importance in the world agricultural scenario, due to the use of its roots that stand out as a source of energy, being consumed by millions of people. A total of 21 healthy cassava root endophytic bacteria were isolated. These isolates were characterized for their potential to promote plant growth and the inhibitory activity of these bacteria against *Phytophthium* sp. was evaluated *in vitro*. Four of these isolates were tested in cassava seedling inoculation assays and two in cowpea. 95% of the isolates produced IAA, 33% solubilized calcium phosphate and 42% produced siderophores. Six isolates showed *in vitro* inhibitory effect on *Phytophthium* sp. Based on the partial sequencing of the 16S rRNA gene, the six endophytic antagonists were identified as belonging to two genera: *Bacillus* and *Klebsiella*. Isolate 21Y (*Bacillus velezensis*) presented the highest inhibitory activity (60.70%). Isolates 23Y and 4W, both identified as *Bacillus aryabhatai*, promoted the growth of cowpea and cassava plants. All the isolates tested, when irrigated in the substrate where the cassava manures were planted, presented better results in relation to the growth promotion of cassava plants, improving both the shoot and root length of these plants. Cassava isolated endophytic bacteria are important resources in the search for specific phytopathogen inhibitors and in promoting plant growth. We describe for the first time the molecular identification of *B. aryabhatai* species as cassava endophytic bacteria in the Amazon region.

**Key-words:** Indole Acetic Acid, Phosphate Solubilization, Siderophores, *Phytophthium* sp., *Bacillus aryabhatai*, Bioinoculant.

## 2.1. INTRODUÇÃO

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma planta nativa do Brasil (CORDEIRO et al., 2017) que possui boas características nutritivas, sendo uma das principais fontes de energia consumida por milhões de pessoas que vivem em países em desenvolvimento. Suas raízes são ricas em carboidratos e têm sido usadas principalmente na produção de farinha para o consumo humano, onde deficiências calóricas e desnutrição são comuns (YANDIA et al., 2018).

No Brasil, a mandioca é cultivada em todas as regiões; no entanto, a podridão radicular dificultou sua produção principalmente na região amazônica (LIMA et al., 2018). A identificação de *Phytophthium* sp., como agente causal da doença da podridão radicular de raízes em plantas de mandioca coletadas em Ipixuna, Estado do Pará, foi relatada recentemente por Boari et al. (2018). Bactérias endofíticas, incluindo *Bacillus*, *Streptomyces*, *Enterobacter*, *Bradyrhizobium* têm sido isoladas de raízes de mandioca (TEIXEIRA et al., 2007; DE MELO et al., 2009; LEITE et al., 2018), entretanto, o antagonismo destas bactérias para *Phytophthium* sp. ainda não foi estudado.

Segundo Hallmann et al. (1997), os microrganismos associados às plantas são considerados endofíticos, quando habitam o interior da planta sem causar danos aparentes ao hospedeiro.

Vários são os exemplos da aplicação de microrganismos endofíticos na produção agrícola, onde a capacidade de estimular o crescimento vegetal apresentada pelos microrganismos tem sido atribuída a mecanismos indiretos como antagonismo a fitopatógenos e diretos, tais como a produção de sideróforos, produção de fitohormônio como ácido indol acético (AIA) e a solubilização de fosfatos inorgânicos, que proporcionarão uma maior resistência das plantas a condições de estresse (PEIXOTO NETO, AZEVEDO, ARAÚJO, 2002). Assim, esses microrganismos não só promovem o crescimento das plantas, mas também ajudam na sustentabilidade agrícola e proteção do meio ambiente (DAS et al., 2013).

Estudos que avaliam a associação de microrganismos endofíticos em plantas de mandioca têm se tornado importante, uma vez que são utilizados no manejo dessa cultura. Apesar da importância, são poucos os trabalhos de endófitos em mandioca em comparação com outras culturas. Assim, bactérias endofíticas foram isoladas de muitas

espécies de plantas, como *Lycopersicon esculentum* (MUNIF et al., 2013), *Piper tuberculatum* (NASCIMENTO et al., 2015), *Beta vulgaris* (KHANAM et al., 2015), *Cucumis sativus* (AKBABA et al., 2018), *Simmondsia chinensis* (PEREZ-ROSALES et al., 2018) e *Manihot esculenta* (TEIXEIRA et al., 2007; DE MELO et al., 2009; LEITE et al., 2018).

Estudos com o objetivo de isolar bactérias endofíticas de plantas de mandioca foram relatados. Por exemplo, Teixeira et al. (2007) encontraram cerca de vinte e sete gêneros de microrganismos endofíticos associados a esta planta, assim como Leite et al. (2018) identificaram seis gêneros bacterianos de raízes e caules de mandioca, sendo eles *Acromobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Pantoea* e *Pseudomonas*, mostrando que as bactérias endofíticas isoladas destas apresentam potenciais características de promoção de crescimento de plantas.

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) é uma leguminosa de grande importância agrícola, por ser uma das principais fontes de proteína vegetal e contribuir de forma significativa para a geração de renda no campo, nas regiões Norte e Nordeste do Brasil (COSTA et al., 2013).

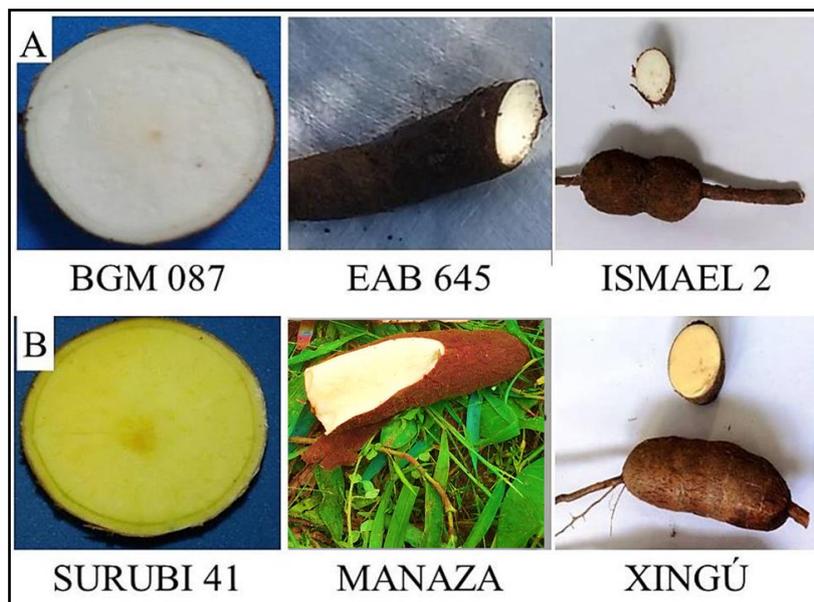
Com base nisso, a bioprospecção de isolados endofíticos com a capacidade de produzir AIA, sideróforos e solubilizar fosfatos inorgânicos pode auxiliar na compreensão dos mecanismos de interação entre bactéria-planta e, conseqüentemente, abrir novas portas no manejo dessa cultura. Além disso, face a importância da cultura da mandioca para o estado do Pará e considerando que a podridão radicular vem comprometendo a sua sobrevivência, este trabalho teve como objetivo isolar, selecionar e identificar bactérias endofíticas com potencial para controlar *Phytophthium* sp. e promover o crescimento de plantas de mandioca e feijão-caupi.

## **2.2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.2.1. Material vegetal para o isolamento de bactérias endofíticas associadas à mandioca**

Raízes sadias de mandioca foram coletadas no Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA (Figura 1). No total foram coletadas

raízes de seis acessos de mandioca, sendo três de coloração da polpa branca, pertencentes aos acessos BGM 087, EAB 645 e Ismael (Figura 1A), e as outras três de coloração da polpa amarela, pertencentes aos acessos Surubi, Manaza e Xingú (Figura 1B).



**Figura 1.** Raízes saudáveis de seis acessos de mandioca, sendo três de polpa branca (A) e três amarelas (B), coletadas no Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA.

### 2.2.2. Isolamento de bactérias endofíticas de raízes sadias de mandioca

O isolamento das bactérias endofíticas foi realizado conforme descrito por Nascimento et al. (2015). Raízes de plantas de mandioca aparentemente sadias foram coletadas e em seguida lavadas em água da torneira para remover o solo aderente. Depois foram submetidas à desinfestação superficial com etanol a 70% por 1 minuto, seguido de solução de hipoclorito de sódio a 2% por 6 minutos e em seguida, foram processadas cinco lavagens em água destilada estéril.

Para a confirmação de que apenas bactérias endofíticas foram isoladas, alíquotas da água da última lavagem foram inoculadas em placas de Petri, com meio de cultivo TSA (Ágar Tripton de Soja, Himedia, Índia), suplementado com o fungicida Benomyl (50 µg/mL) e incubadas a 28°C. Assim, não havendo crescimento bacteriano nessas placas, os isolados obtidos pela maceração dos tecidos foram considerados endofíticos.

Do material desinfestado foram retiradas as extremidades das raízes, e o restante foi cortado assepticamente em pequenos fragmentos e macerados com auxílio de cadinho e pistilo estéreis. O macerado foi misturado com tampão *Phosphate Buffered Saline*, PBS (1,44 g/L de Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,24 g/L de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,2 g/L de KCl, e 8,0 g/L de NaCl), transferido para um tubo falcon de 50 mL e incubado sob agitação de 70 rpm a 28°C durante 1 hora, para a difusão das bactérias endofíticas para a solução.

Após esse período, as suspensões bacterianas obtidas foram diluídas em tampão PBS e foram espalhadas em placas contendo meio de cultivo TSA suplementado com benomyl, para evitar possível crescimento de fungos. As placas foram mantidas em sala, com temperatura ambiente em torno de 28°C.

A avaliação do crescimento bacteriano teve início após 24 horas de incubação e prosseguiu por um período de uma semana para verificação das colônias isoladas. Depois do crescimento, as bactérias foram repicadas para outras placas com o mesmo meio de cultura. Por último, foi feita uma seleção visual das colônias crescidas, agrupando-as de acordo com características morfológicas, como cor, bordas regulares e irregulares, crescimento rápido e lento. Todos os grupos bacterianos isolados foram cultivados em meio TSB e armazenados a -20°C e -80°C na presença de glicerol a 33%, sendo posteriormente extraído o DNA genômico.

### **2.2.3. Identificação molecular dos isolados de bactérias endofíticas**

#### **2.2.3.1. Extração de DNA genômico das bactérias endofíticas**

A extração do DNA genômico foi realizada conforme metodologia descrito por Ausubel et al. (2003). Inicialmente as bactérias endofíticas foram inoculadas em meio caldo Triptona Soja (TSB) e incubadas com agitação a 28°C *overnight* para crescimento da cultura bacteriana. Em seguida, alíquotas de 1,5 mL de cultura bacteriana foram centrifugadas e os precipitados foram ressuspensos com 567 µL de TE (Tris 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM pH 8,0); 30 µL de dodecil sulfato de sódio (SDS) 10% e 3 µL de proteinase k 20 mg/mL. A mistura foi incubada por 1 hora a 37°C. Em seguida, foram adicionados 100 µL de NaCl 5 M e 80 µL de CTAB/NaCl (10% CTAB em 0,7 M de NaCl), a mistura foi então incubada a 65°C. Após a extração com clorofil (24 volume de

clorofórmio/1 volume de álcool isoamílico) e precipitação com isopropanol, o DNA foi lavado com 600 µL de Etanol a 70%. Por último, o DNA foi seco por meio de incubação à temperatura ambiente durante 30 minutos, ressuspendido em TE e armazenado a -20°C.

### 2.2.3.2. Amplificação do gene 16S rRNA e análise da sequência

O gene 16S rRNA foi amplificado por PCR utilizando os primers universais Y1F e Y3R (CRUZ et al., 2001), sendo que estes iniciadores flanqueiam um fragmento de aproximadamente 1500 pares de bases (Tabela 1).

As condições do ensaio de PCR foram as seguintes: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos (95°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto e 72°C por 4 minutos) e extensão final de 72°C por 20 minutos. Os produtos de PCR foram sequenciados na ACTGene Análises Moleculares Ltda, no Rio Grande do Sul. As sequências de nucleotídeos foram comparadas a um banco de dados usando o programa BLAST do NCBI (ALTSCHUL et al., 1990).

**Tabela 1.** Sequências dos iniciadores utilizados para amplificação do gene 16S rRNA das bactérias endofíticas isoladas de raízes saudáveis de mandioca.

Nome	Tamanho	Posição 16S rRNA em <i>E.coli</i>	Sequência (5' - >3')	Referência
Y1F	24	20-43	TGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGC	CRUZ et al., 2001
Y3R	26	1482-1507	TACCTTGTTACGACTTCACCCAGTC	CRUZ et al., 2001

### 2.2.4. Bactérias endofíticas com potencial para controlar *Phytophthium* sp.

O isolado *Phytophthium* sp. foi obtido na coleção de micologia da Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA. As bactérias endofíticas, isoladas de raízes sadias de mandioca foram testadas, *in vitro*, quanto à sua capacidade para inibir o crescimento micelial de *Phytophthium* sp. usando placas de Petri contendo o meio de cultura de batata-dextrose-água (BDA). Um disco de 8 mm de diâmetro, contendo o micélio do oomiceto, foi colocado no centro de placas de BDA e as colônias bacterianas foram riscadas a 2 cm a partir da borda das placas. Como controle negativo, foram usadas

placas de BDA contendo apenas o disco com o micélio de *Phytophthium* sp. sem a bactéria. Foram realizados 5 repetições por tratamento. As placas foram incubadas a 28°C durante 3 dias. Foi utilizado um paquímetro digital para mensurar o crescimento radial de inibição de *Phytophthium* sp. diariamente.

Para determinar as diferenças no crescimento radial entre os isolados de bactérias endofíticas e o controle (sem a bactéria endofítica), análises estatísticas foram realizadas utilizando o teste de Skott-Knott, para comparação das médias. A inibição relativa (IR) foi calculada com base no crescimento em placas controle como:

$$IR (\%) = \frac{\text{Crescimento radial do controle} - \text{crescimento radial da amostra}}{\text{Crescimento radial do controle}} \times 100$$

### **2.2.5. Bactérias endofíticas com potencial para a promoção de crescimento vegetal**

Os isolados de bactérias endofíticas foram analisados quanto ao potencial para produzir ácido indol acético e solubilizar fosfatos inorgânicos.

#### **2.2.5.1. Avaliação da capacidade das bactérias endofíticas em produzir o ácido indol acético (AIA)**

A capacidade de produção de AIA pelos isolados bacterianos foi estimada utilizando a metodologia colorimétrica descrita por Gordon & Weber (1951). Inicialmente, as bactérias foram crescidas em 3 mL de meio de cultura TSB. Posteriormente, uma alíquota de 100 µL do inóculo bacteriano foi adicionado em 10 mL de meio TSB suplementado com 5 mM do aminoácido L-triptofano e incubados sob agitação constante (180 rpm) a 28°C, na ausência de luz, por 24 e 48 horas. Após o tempo de incubação, a cultura foi centrifugada a 10.000 rpm durante 10 minutos. Em seguida, procedeu-se a avaliação da produção de AIA, através de um mix contendo 350 µL do sobrenadante e 700 µL do reagente de Salkowski (1,2% de FeCl<sub>3</sub> 0,5 M em 37% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Essa mistura foi incubada à temperatura ambiente no escuro, durante 15 minutos. Como controle, foi utilizado apenas meio TSB suplementado com L-triptofano. A produção de AIA foi avaliada por meio da presença de coloração róseo-avermelhada. A quantificação foi realizada através das leituras de absorvância das

amostras pela intensidade da cor, com auxílio do espectrofotômetro a 530 nm. O experimento foi realizado em triplicata.

#### **2.2.5.2. Avaliação da capacidade das bactérias endofíticas em solubilizar o fosfato de cálcio, *in vitro***

Para a solubilização de fosfato de cálcio, utilizou-se o meio de cultura NBRIP (*National Botanical Research Institute's phosphate*) contendo por litro: 10 g de glicose, 5 g de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , 5 g de  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0,25 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,2 g de KCl, 0,1 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e 15 g de ágar. O pH foi ajustado para 7,0 segundo metodologia proposta por Nautiyal (1999).

Para a avaliação da capacidade de solubilizar o fosfato, as bactérias endofíticas foram cultivadas em meio TSB por um período de 24 horas. Após, alíquotas de 50  $\mu\text{L}$  da cultura bacteriana foram colocadas em poços feitos em placas de Petri com meio de cultura NBRIP - ágar e foram incubadas a 28°C por 7 dias. No controle foi colocado apenas alíquotas de 50  $\mu\text{L}$  de meio TSB autoclavado.

O experimento foi realizado em triplicata, e os isolados que apresentaram formação de halos translúcidos ao redor das colônias, no meio NBRIP - ágar foram considerados positivos devido à solubilização de fosfato de cálcio. O diâmetro do halo de solubilização e da colônia bacteriana foi mensurado por meio do uso de paquímetro.

A avaliação do índice de solubilização de fosfato foi realizada no sétimo dia por meio da fórmula proposta por Berraquero et al. (1976):

$$IS (mm) = \frac{DTH}{DC}$$

Em que IS (mm) é o índice de solubilização, DTH é o diâmetro total do halo e o DC é o diâmetro da colônia de bactéria. O IS foi classificado de acordo com Hara & Oliveira (2005), em que baixa solubilização ( $IS < 2$ ), média solubilização ( $2 < IS < 3$ ) e alta solubilização ( $IS > 3$ ).

Para a avaliação quantitativa da solubilização de fosfato, os vinte e um isolados endofíticos foram inoculados em meio de cultura TSB e incubados a 28°C, sob agitação

constante (180 rpm). Após o período de incubação, 200 µL do sobrenadante de cada cultura foi adicionado em tubos falcon estéreis contendo 10 mL de meio NBRIP (NAUTIYAL, 1999) o pH do meio foi ajustado para 7,0 antes da autoclavagem. O controle constituiu-se de tubos com 10 mL de meio NBRIP sem o inóculo. Todos os tubos foram incubados por um período de 24, 72 e 120 horas a 28°C em agitação a 180 rpm.

Decorrido o tempo de incubação, 1 mL de cada amostra foi transferida para microtubos de 1,5 mL, que foram centrifugados a 10000 rpm por 5 minutos. A quantidade de fósforo solúvel foi analisada pela reação do sobrenadante com a solução do método *molybdenum blue* (MURPHY & RILEY, 1962), na proporção de 1:5. Após 10 minutos de reação o P solúvel foi quantificado em espectrofotômetro a 882 nm. Foi medido o pH do meio NBRIP inoculado com as bactérias endofíticas nos tempos determinados. Os experimentos foram realizados em triplicatas e o resultado positivo foi evidenciado pela diminuição da intensidade da cor azul.

### **2.2.5.3. Avaliação da capacidade das bactérias endofíticas selecionadas em produzir sideróforos**

Nove isolados foram submetidos à avaliação da produção de sideróforos, segundo Schwyn & Neilands (1987). Foram utilizadas placas de Petri contendo o meio de cromo azurol S (CAS), feito a partir de três soluções: a parte sólida do meio, a solução mãe do meio CAS e o meio MM9. Para o preparo da solução mãe são utilizadas três soluções: a solução I, composta por 60,5 mg de cromoazurol S, dissolvidos em 50 mL de água destilada autoclavada; a solução II, composta de 100µL de FeCl<sub>3</sub>. 6H<sub>2</sub>O a 100 mM em 9,9 mL de HCl a 10 mM preparado a partir de HCl comercial a 37% (FeCl<sub>3</sub>. 6H<sub>2</sub>O a 1 mM) e a solução III, composta por 40 mL da solução 10 mM de HDTMA. A parte sólida consiste em 3,01 g de tampão Pipes e 1,5 g de ágar bacteriológico aferidos para 80 mL em pH 6.8. Enquanto o meio MM9 é feito com: 1,28 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,3 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,05 g de NaCl, 0,1 g de NH<sub>4</sub>Cl ou 100µL de extrato de levedura a 10% e 20% de glicose filtrada.

Os nove isolados foram inoculados em dois meios de cultura diferentes: LB, Luria Bertani 2% e Triptona de soja, TSB 0,6%, que são meio pobres em ferro usados

para favorecer a produção de sideróforos por essas bactérias, seguido de incubação por 120 horas. Posteriormente, foram recolhidos 1 mL desse cultivo que foi centrifugado por 10 minutos a 10.000 rpm. Após, foi retirado 250 µL do sobrenadante bacteriano o qual foi inoculado em poços de 10 mm de diâmetro realizados nas placas CAS-Ágar. As placas foram cobertas com papel alumínio e incubadas a temperatura ambiente, por 72 horas, na ausência de luz. Ao redor dos poços foi observada a presença de halos de cor laranja, que indicam a produção de sideróforos. No controle foi utilizado apenas o meio TSB autoclavado.

#### **2.2.6. Efeito dos isolados de bactérias endofíticas no crescimento de plantas de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*)**

O feijão-caupi tem grande potencial para se tornar uma commodity, assim, tendo em vista a grande importância do feijão-caupi para o País e principalmente para o Estado do Pará, este trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade de dois isolados de bactérias endofíticas, 23Y e 4W, quanto ao potencial em promover o crescimento de plantas de feijão-caupi.

Antes da semeadura, as sementes de feijão-caupi foram desinfestadas superficialmente com álcool etílico a 70% durante 3 minutos e posteriormente foram imersas em hipoclorito de sódio a 2% por 10 minutos e em seguida foram lavadas cinco vezes em água destilada esterilizada para remoção do excesso de hipoclorito de sódio (HUNGRIA, ARAÚJO, 1994).

Para o preparo dos inoculantes, as estirpes bacterianas foram cultivadas em meio de cultura TSB, sob agitação constante, a 28°C. Em seguida, as suspensões bacterianas foram padronizadas em espectrofotômetro para  $DO_{600} = 0,1$ . As sementes de feijão-caupi foram submersas em suspensões dos isolados de bactérias endofíticas 23Y e 4W, durante 10 minutos, sob agitação manual. As sementes do tratamento controle foram submersas em TSB esterilizado sob as mesmas condições dos demais tratamentos. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com três tratamentos e cinco repetições.

Após a inoculação, as sementes foram semeadas em vasos (copos) com capacidade para 500 mL, contendo solo autoclavado, com o intuito de eliminar qualquer

tipo de biota nativa, em ambiente de laboratório, na Universidade Federal do Pará (Belém, Pará) sob fotoperíodo de 12 horas a temperatura ambiente. A irrigação foi realizada diariamente. As avaliações do comprimento da parte aérea e da raiz nas plantas de feijão-caupi foram realizadas 13 dias após a inoculação. Ao término das avaliações do comprimento da parte aérea e da raiz, as plantas foram separadas em parte aéreas e raízes. Em seguida, as partes aéreas foram pesadas em balança eletrônica e as raízes cuidadosamente lavadas em água corrente e em água destilada, secas com papel absorvente e pesadas.

### **2.2.7. Efeito dos isolados de bactérias endofíticas no crescimento de plantas de mandioca**

Mudas de mandioca, acesso “Milagrosa alta 11”, foram cultivadas em casa de vegetação em vasos de seis litros contendo substrato de fibra de coco estéril e em cada vaso foi irrigado 100 mL de solução nutritiva (MURASHIGE & SKOOG, 1962), dois dias antes de inocular as bactérias endofíticas.

Foram testados dois métodos de inoculação: irrigação de 100 mL da suspensão bacteriana no substrato contido nos vasos e pulverização de 100 mL da suspensão bacteriana em todas as folhas da planta, até o ponto de escorrimento. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado e os tratamentos foram organizados em esquema fatorial (5x2), sendo 4 isolados de bactérias endofíticas (15Y, 16Y, 23Y e 4W) e um controle não-inoculado; e dois métodos de inoculação: irrigação e pulverização.

Foram preparadas suspensões dos isolados de bactérias endofíticas em solução salina esterilizada a 0,8%, a partir de cultura com 24 horas de crescimento em meio MB1 (KADO & HESKETT, 1970). Essas suspensões foram ajustadas para uma  $DO_{570nm} = 0,52$  contendo  $2 \times 10^9$  UFC/mL (MARIANO et al., 2016). Estes isolados de bactéria endofítica foram selecionados com base nos resultados de produção de AIA, produção de sideróforos e solubilização de fosfato inorgânico, *in vitro*.

Quinze dias após a inoculação, com os isolados de bactérias endofíticas, foram realizadas as avaliações quanto ao comprimento da parte aérea e das raízes de todas as plantas e quanto ao peso da matéria fresca e seca da parte aérea e da raiz. A matéria

fresca da raiz (MFR) foi obtida pela pesagem das raízes das amostras, enquanto a matéria fresca da parte aérea (MFPA) foi obtida pela pesagem do caule e das folhas das plantas de mandioca.

Para a obtenção da matéria seca da parte aérea (MSPA), as folhas e caules das plantas de mandioca foram cuidadosamente acondicionados em sacos de papel e secas em estufa, a 70°C, até atingir peso constante. O mesmo procedimento de secagem foi empregado para as raízes (MFR). Depois foi feita a pesagem do material, tanto da parte aérea e das raízes.

### **2.2.8. Análise estatística**

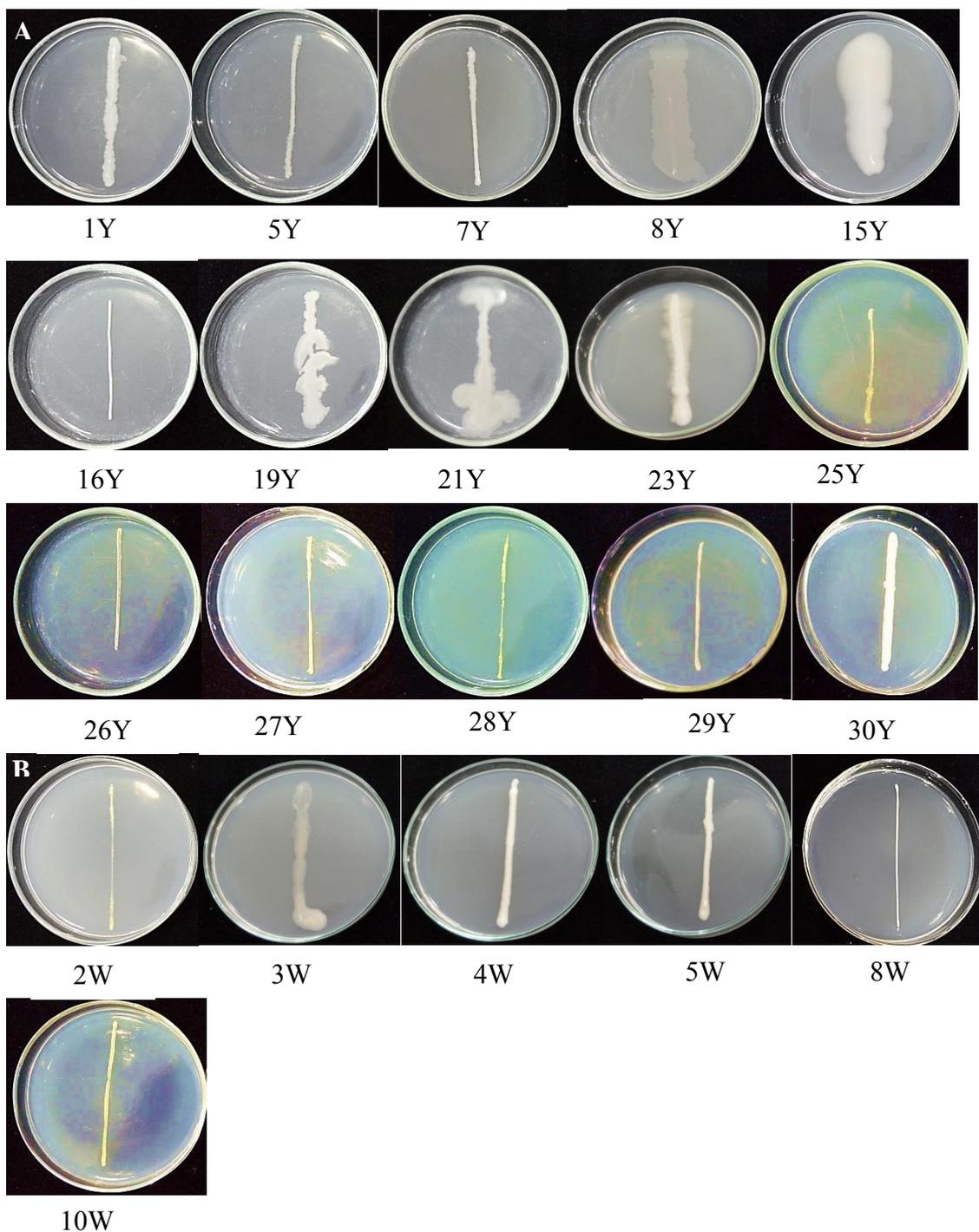
Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância, no programa SISVAR (FERREIRA, 2010). As médias foram comparadas pelo teste de Skott - Knott, a 5% de significância.

## **2.3. RESULTADOS**

### **2.3.1. Identificação de bactérias endofíticas de mandioca**

Os resultados obtidos neste estudo revelaram que nas placas de Petri do ensaio foi observado um crescimento diversificado de bactérias endofíticas após o período de 24 horas de incubação. Enquanto nas placas de Petri controle não foi observado crescimento de bactérias epifíticas que ocorrem na superfície externa das raízes, indicando que o processo de assepsia foi adequado para as raízes sadias de mandioca, confirmando, assim, que os isolados obtidos são endofíticos.

Após a avaliação das características morfológicas, foi obtido um total de vinte e um isolados de bactérias endofíticas de raízes sadias de mandioca, sendo quinze isolados de raízes com a coloração da polpa amarela e seis de raízes com a coloração da polpa branca (Figura 2, Tabela 2).



**Figura 2.** Isolados de bactérias endofíticas de raízes sadias de mandioca com a coloração da polpa amarela (Y-Yellow) (A) e branca (W-White) (B), cultivadas em meio TSA.

**Tabela 2.** Bactérias endofíticas obtidas de seis acessos de mandioca, sendo três com a coloração da polpa das raízes branca e três amarelas.

Isolado	Acesso de mandioca	Coloração da polpa da raiz
1Y	Surubi	Amarela
5Y	Surubi	Amarela
7Y	Surubi	Amarela
8Y	Surubi	Amarela
15Y	Manaza	Amarela
16Y	Manaza	Amarela
19Y	Manaza	Amarela
21Y	Manaza	Amarela
23Y	Manaza	Amarela
25Y	Xingú	Amarela
26Y	Xingú	Amarela
27Y	Xingú	Amarela
28Y	Xingú	Amarela
29Y	Xingú	Amarela
30Y	Xingú	Amarela
2W	BGM 087	Branca
3W	BGM 087	Branca
4W	EAB 645	Branca
5W	EAB 645	Branca
8W	Ismael 2	Branca
10W	Ismael 2	Branca

\* Isolados de bactéria endofítica obtidos de raiz de mandioca amarela (Y-Yellow) e branca (W-White).

### 2.3.2. Biocontrole de *Phytophthium* sp. por bactérias endofíticas de mandioca

Foi realizado um ensaio *in vitro* de antagonismo das bactérias endofíticas isoladas de raízes sadias de mandioca com potencial para inibir o crescimento micelial de *Phytophthium* sp., causador da podridão mole em raízes de mandioca na Amazônia Oriental. Para este ensaio, foram testados os vinte e um isolados de bactérias endofíticas (Figura 3).

Somente seis isolados, denominados 19Y, 21Y, 23Y, 4W, 26Y e 29Y, inibiram o crescimento micelial de *Phytophthium* sp. em 30,56%, 60,7%, 44,38%, 48,55%, 32,8% e 53,52% em comparação com o controle, respectivamente (Tabela 3). O isolado 21Y apresentou a maior inibição (60,7%).

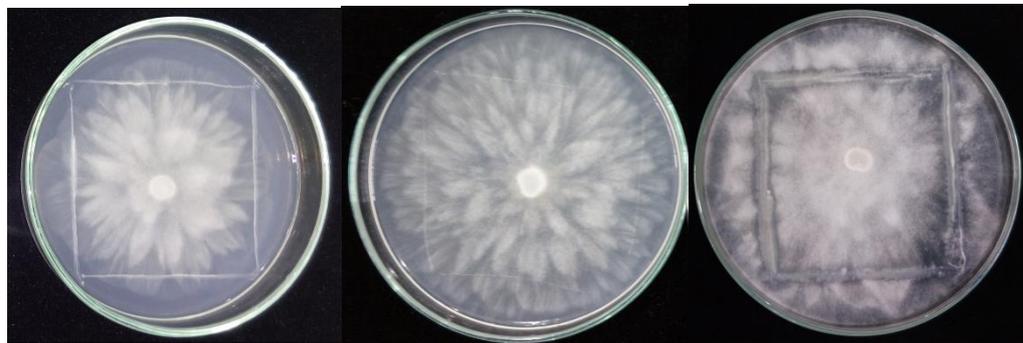
O crescimento micelial de *Phytophthium* sp. foi significativamente limitado por estes isolados. Isso foi mostrado através do tamanho reduzido da colônia do oomiceto em meio BDA com três dias após a incubação (Figura 3).



*Phytophthium* sp. (controle)

*Phytophthium* sp. + isolado 1Y

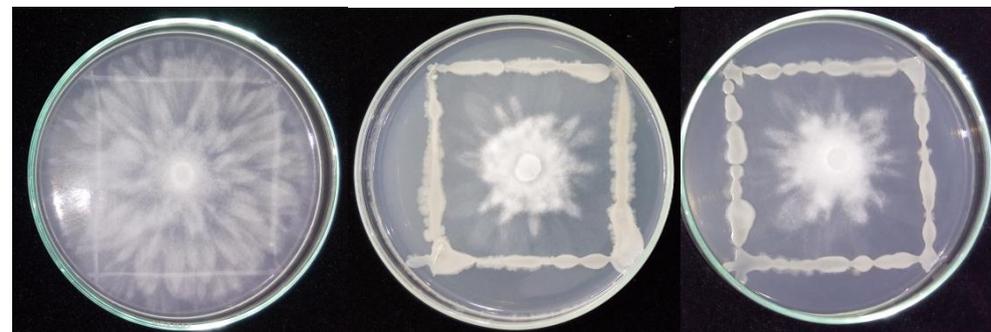
*Phytophthium* sp. + isolado 5Y



*Phytophthium* sp. + isolado 7Y

*Phytophthium* sp. + isolado 8Y

*Phytophthium* sp. + isolado 15Y



*Phytophthium* sp. + isolado 16Y

*Phytophthium* sp. + isolado 19Y

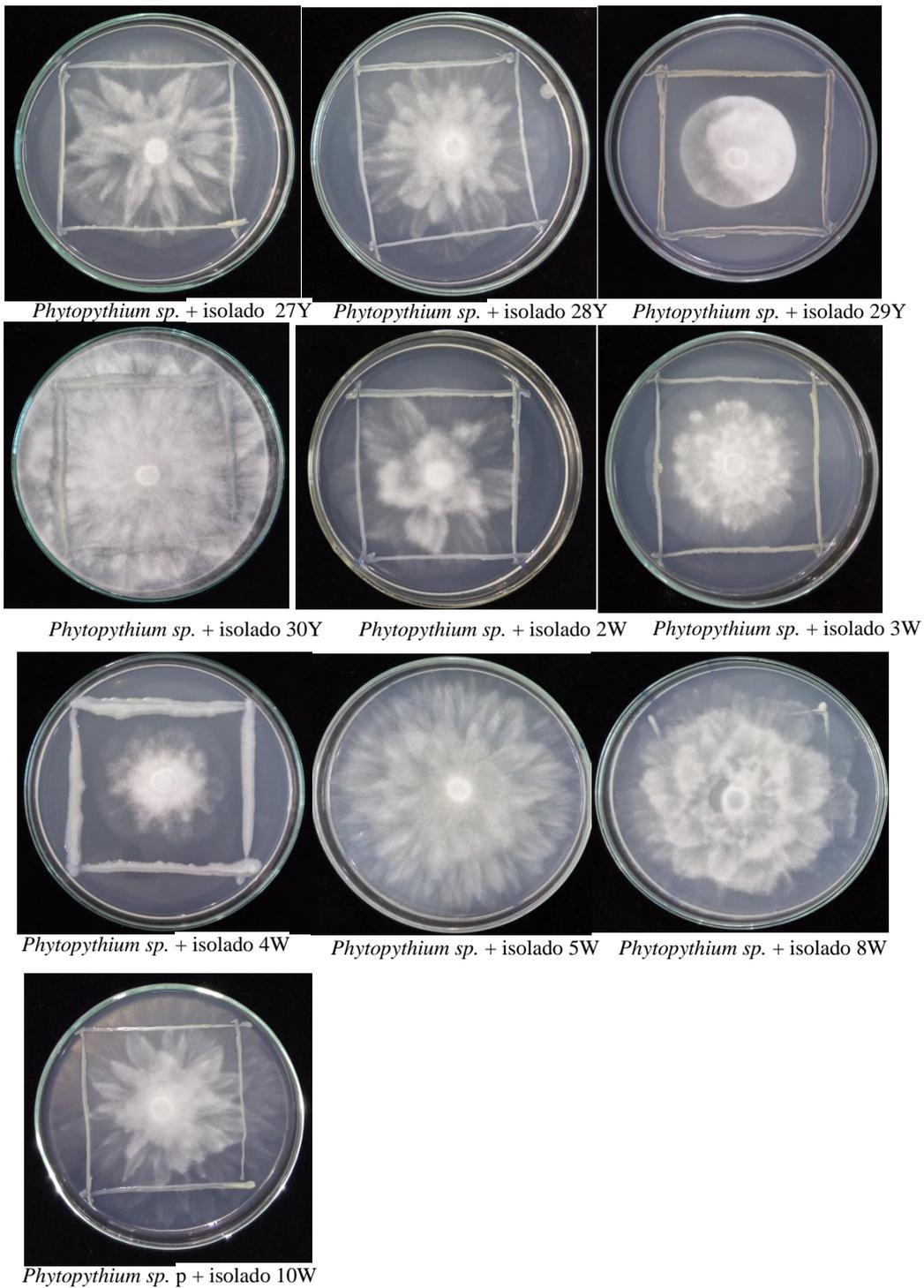
*Phytophthium* sp. + isolado 21Y



*Phytophthium* sp. + isolado 23Y

*Phytophthium* sp. + isolado 25Y

*Phytophthium* sp. + isolado 26Y



**Figura 3.** Ensaios de inibição do crescimento micelial de *Phytophthium sp.* por bactérias endofíticas de raízes sadias de mandioca em meio BDA com 3 dias após a incubação.\*Isolados de bactéria endofítica obtidos de raiz de mandioca amarela (Y-yellow) e branca (W-white).

**Tabela 3.** Atividade antagônica de bactérias endofíticas de raízes saudáveis de mandioca contra *Phytophthium* sp., *in vitro*.

Tratamentos	Crescimento radial (cm)*	Inibição Relativa- RI (%)
<i>Phytophthium</i> sp. (Controle)	90,00 d	0,00
<i>Phytophthium</i> sp.+ Isolado 1Y	90,00 d	0,00
<i>Phytophthium</i> sp.+ Isolado 5Y	90,00 d	0,00
<i>Phytophthium</i> sp.+ Isolado 7Y	90,00 d	0,00
<i>Phytophthium</i> sp.+ Isolado 8Y	90,00 d	0,00
<i>Phytophthium</i> sp.+ Isolado 15Y	90,00 d	0,00
<i>Phytophthium</i> sp.+ Isolado 16Y	90,00 d	0,00
<i>Phytophthium</i> sp. + Isolado 19Y	62,50 c	30,56
<i>Phytophthium</i> sp.+ Isolado 21Y	35,31 a	60,70
<i>Phytophthium</i> sp.+ Isolado 23Y	50,06 b	44,38
<i>Phytophthium</i> sp.+ Isolado 25Y	90,00 d	0,00
<i>Phytophthium</i> sp.+ Isolado 26Y	60,48 c	32,80
<i>Phytophthium</i> sp.+ Isolado 27Y	90,00 d	0,00
<i>Phytophthium</i> sp.+ Isolado 28Y	90,00 d	0,00
<i>Phytophthium</i> sp.+ Isolado 29Y	41,83 b	53,52
<i>Phytophthium</i> sp. + Isolado 30Y	90,00 d	0,00
<i>Phytophthium</i> sp.+ Isolado 2W	90,00 d	0,00
<i>Phytophthium</i> sp. + Isolado 3W	90,00 d	0,00
<i>Phytophthium</i> sp.+ Isolado 4W	46,31 b	48,55
<i>Phytophthium</i> sp.+ Isolado 5W	90,00 d	0,00
<i>Phytophthium</i> sp.+ Isolado 8W	90,00 d	0,00
<i>Phytophthium</i> sp.+ Isolado 10W	90,00 d	0,00

\*As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Os dados representam a média de três repetições. A Inibição Relativa (RI) foi calculada pela seguinte fórmula:  $RI (\%) = [(Crescimento\ radial\ do\ controle - crescimento\ radial\ da\ amostra) / Crescimento\ radial\ do\ controle] \times 100$ . \*Isolados de bactéria endofítica obtidos de raiz de mandioca amarela (Y-yellow) e branca (W-white).

### **2.3.3. Seleção de bactérias endofíticas com potencial para a promoção de crescimento de plantas**

As bactérias endofíticas, isoladas de raízes saudáveis de mandioca, foram avaliadas *in vitro* quanto ao potencial para promover o crescimento das plantas. O rastreio dos fatores de promoção de crescimento *in vitro* é considerado uma ferramenta eficaz na investigação de bactérias endofíticas que podem ser utilizadas como biofertilizantes. Estes testes são extremamente importantes porque permitem a seleção de microrganismos com melhor potencial agrônômico antes de testá-los em plantas (SZILAGYI-ZECCHIN et al., 2016).

#### **2.3.3.1. Avaliação da capacidade das bactérias endofíticas em produzir o ácido indol acético (AIA)**

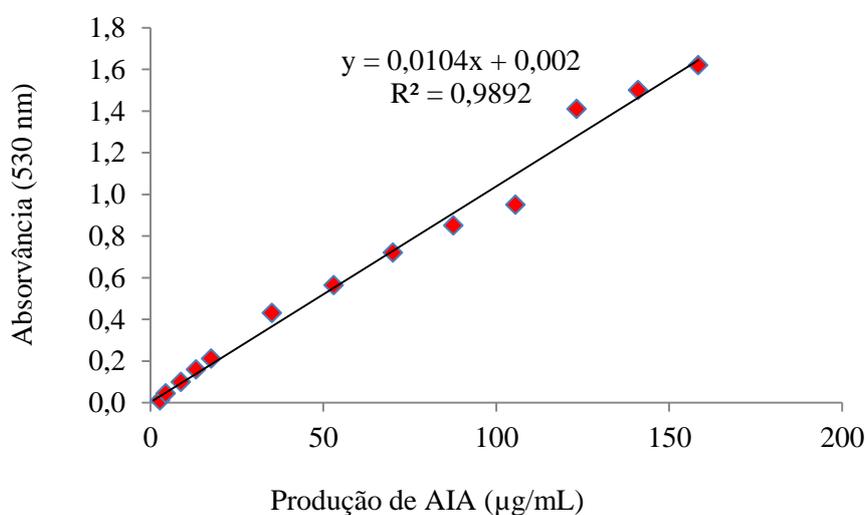
A análise da produção de AIA foi realizada com os vinte e um isolados de bactérias endofíticas de raízes sadias de mandioca. Para isso, foi feita uma reta padrão para a comparação da absorvância colorimétrica da quantidade de AIA produzido pelos isolados de bactéria endofítica e constou de concentrações conhecidas de AIA comercial (0, 5, 10, 15, 25, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 e 1000 µg/mL) que gerou a equação  $y = 0,0104x + 0,002$  ( $R^2 = 0,9892$ ), em que “y” representa a quantidade de AIA secretada na cultura líquida (µg/mL) e “x” é a absorvância obtida durante as leituras no espectrofotômetro (Figura 4).

O ensaio colorimétrico com o emprego da solução de *Salkowski* permitiu identificar e quantificar os isolados capazes de produzir a auxina pela manifestação de uma cor róseo-avermelhada variando de intensidade de acordo com a concentração de AIA presente no meio.

Nossos resultados demonstram que a produção de AIA foi observada em 95% dos isolados de bactérias endofíticas, sendo que essa produção foi avaliada no período de 24 e 48 horas de crescimento bacteriano em meio TSB suplementado com 5 mM do aminoácido L-triptofano. Assim, quanto ao período de 24 horas de crescimento bacteriano, a produção média deste fitohormônio foi de 0,3 – 19,61 µg/mL e no período

de 48 horas, houve uma maior produção deste fitohormônio por essas bactérias endofíticas, com produção média de 0,67 – 61,11 µg/mL (Tabela 4).

Os isolados 4W e 23Y, apresentaram a maior produção de AIA nos dois períodos avaliados, com produção média de 15,00 e 19,61 µg/mL, no período de 24 horas de crescimento bacteriano, respectivamente e produção média de 61,11 e 60,54 µg/mL, no período de 48 horas de crescimento bacteriano, respectivamente (Tabela 4, Figura 5 e 6). As concentrações obtidas de AIA, em nosso estudo, foram bastante variadas, o que pode beneficiar culturas com diferentes exigências.

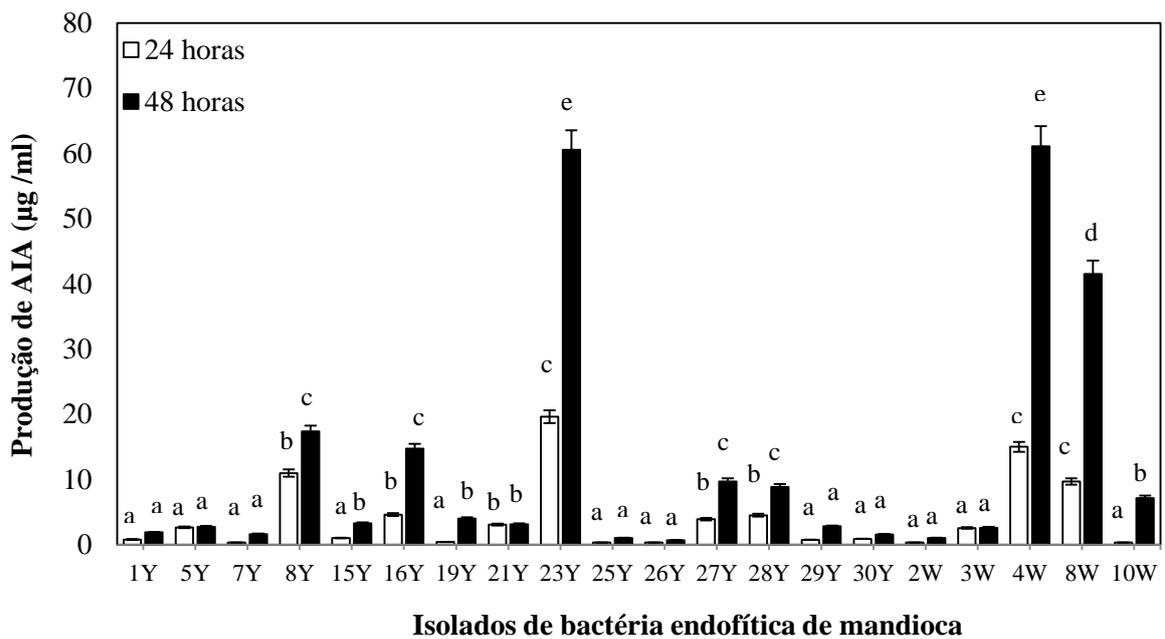


**Figura 4.** Curva padrão para determinação da concentração de AIA no teste colorimétrico.

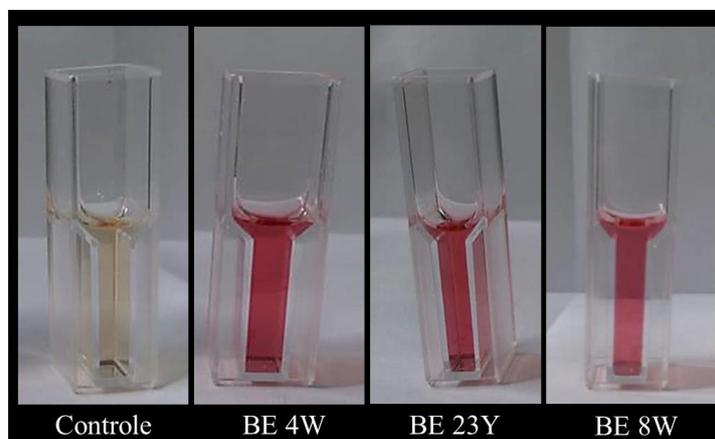
**Tabela 4.** Produção de AIA ( $\mu\text{g / mL}$ ) por bactérias endofíticas isoladas de raízes saudáveis de mandioca, no período de 24 e 48 horas de crescimento bacteriano em meio TSB, na presença de triptofano.

Tratamento	AIA ( $\mu\text{g / mL}$ )	
	24 horas	48 horas
Controle	0,00 a	0,00 a
Isolado 1Y	0,78 a	1,86 a
Isolado 5Y	2,64 a	2,74 a
Isolado 7Y	0,30 a	1,61 a
Isolado 8Y	10,90 b	17,39 c
Isolado 15Y	0,98 a	3,26 b
Isolado 16Y	4,60 b	14,70 c
Isolado 19Y	0,42 a	3,99 b
Isolado 21Y	3,05 b	3,10 b
Isolado 23Y	19,61 c	60,54 e
Isolado 25Y	0,30 a	0,98 a
Isolado 26Y	0,30 a	0,67 a
Isolado 27Y	3,90 b	9,68 c
Isolado 28Y	4,50 b	8,85 c
Isolado 29Y	0,73 a	2,79 a
Isolado 30Y	0,88 a	1,55 a
Isolado 2W	0,30 a	0,98 a
Isolado 3W	2,54 a	2,59 a
Isolado 4W	15,00 c	61,11 e
Isolado 5W	0,00 a	0,00 a
Isolado 8W	9,67 c	41,50 d
Isolado 10W	0,30 a	7,14 b

\*As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. \*Isolados de bactéria endofítica obtidos de raiz de mandioca amarela (Y-yellow) e branca (W-white).



**Figura 5.** Produção de AIA pelas bactérias endofíticas de mandioca com 24 e 48 horas de crescimento bacteriano em meio TSB, na presença de triptofano. As barras representam o erro padrão. TSB: Caldo Triptona de Soja. \*Isolados de bactéria endofítica obtidos de raiz de mandioca amarela (Y-yellow) e branca (W-white).



**Figura 6.** Maior produção de AIA, no período de 48 horas de crescimento bacteriano em meio TSB, na presença de triptofano, pelos isolados de bactérias endofíticas 4W, 23Y e 8W de raízes sadias de mandioca, em comparação ao tratamento controle.

### 2.3.3.2. Seleção de bactérias endofíticas com potencial para solubilizar fosfato inorgânico

#### 2.3.3.2.1. Em meio NBRIP - Ágar

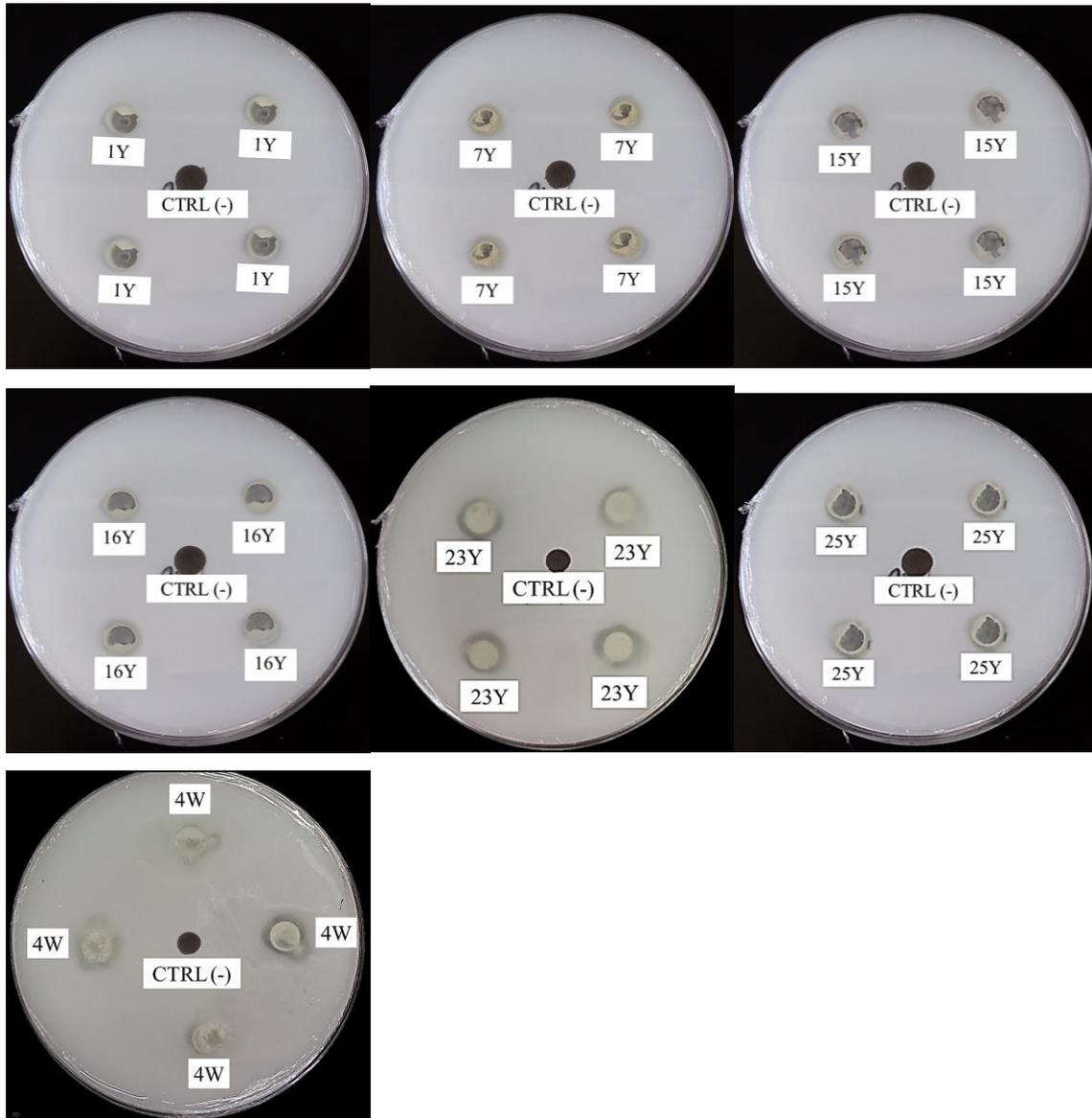
Dos vinte e um isolados de bactérias endofíticas testados, foram encontrados apenas sete com a capacidade de solubilizar o fosfato inorgânico: 1Y, 7Y, 15Y, 16Y, 23Y, 25Y e 4W, que foi confirmada pela presença de uma zona clara ao redor da colônia dos isolados de bactéria endofítica na placa de NBRIP-ágar do Instituto Nacional de Pesquisa Botânica. Em relação ao índice de solubilização, quatro isolados apresentaram uma baixa capacidade de solubilizar o fosfato inorgânico: 1Y, 15Y, 16Y e 25Y. Um isolado (7Y) apresentou uma média solubilização de fosfato e dois isolados 23Y e 4W, apresentaram uma alta capacidade de solubilizar o fosfato inorgânico (Tabela 5, Figura 7).

**Tabela 5.** Índice de solubilização formado pelos isolados de bactérias endofíticas de mandioca, em meio NBRIP-ágar, após sete dias de incubação.

Tratamento	Índice de solubilização (mm)	Capacidade de solubilização
Controle	0,00	-
Isolado 1Y	0,30	Baixa
Isolado 5Y	0,00	-
Isolado 7Y	2,70	Média
Isolado 8Y	0,00	-
Isolado 15Y	0,70	Baixa
Isolado 16Y	0,70	Baixa
Isolado 19Y	0,00	-
Isolado 21Y	0,00	-
Isolado 23Y	5,00	Alta
Isolado 25Y	1,00	Baixa
Isolado 26Y	0,00	-
Isolado 27Y	0,00	-
Isolado 28Y	0,00	-
Isolado 29Y	0,00	-
Isolado 30Y	0,00	-
Isolado 2W	0,00	-
Isolado 3W	0,00	-
Isolado 4W	5,70	Alta
Isolado 5W	0,00	-
Isolado 8W	0,00	-
Isolado 10W	0,00	-

\*As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Foram feitas 4 repetições para cada isolado.

\*Isolados de bactéria endofítica obtidos de raiz de mandioca amarela (Y-yellow) e branca (W-white).



**Figura 7.** Halos de solubilização formado pelos isolados de bactérias endofíticas 1Y, 7Y, 15Y, 16Y, 23Y, 25Y e 4W em meio NBRIP-ágar após 7 dias de incubação, em relação ao controle. Foram feitas 4 repetições para cada isolado. \*Isolados de bactéria endofítica obtidos de raiz de mandioca amarela (Y-yellow) e branca (W-white).

### 2.3.3.2.2. Análise quantitativa da solubilização de fósforo

A análise da solubilização de fósforo *in vitro* com os isolados de bactérias endofíticas de mandioca foi realizada com o objetivo de selecionar aquelas que mais solubilizam o fósforo insolúvel. Assim, foi feita uma curva padrão para quantificação do P solúvel a partir do fósforo de potássio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) e as concentrações foram calculadas em  $\mu\text{g/mL}$ . Os experimentos foram realizados em triplicatas e o

resultado positivo foi evidenciado pela diminuição da intensidade da cor azul. Os resultados obtidos em absorvância (valores de x) foram convertidos em concentração de P ( $\mu\text{g/mL}$ ) (y), por meio da equação  $y = 0,0182x + 0,2923$  (Figura 8).

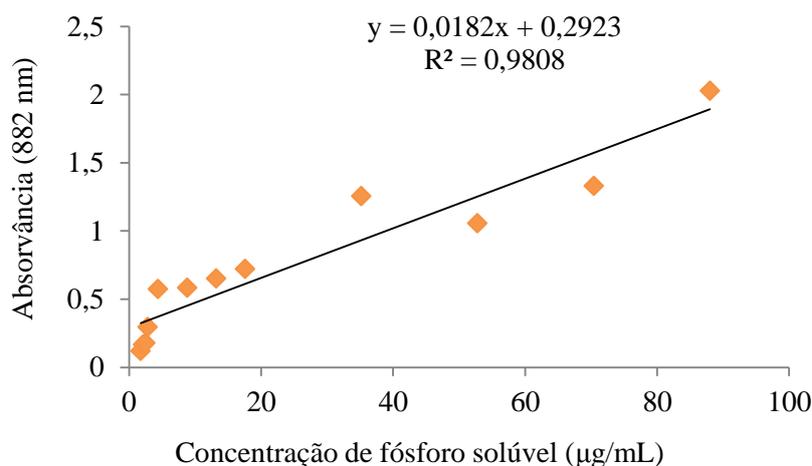
Na tabela 6 estão apresentados os resultados da análise quantitativa em  $\mu\text{g/mL}$ , da solubilização de fosfato em meio NBRIP nos períodos de 24, 72 e 120 horas de cultivo dos isolados que apresentaram halos de solubilização em meio NBRIP - ágar, como 23Y, 4W, 1Y, 7Y, 15Y, 16Y e 25Y.

Após 24 horas de crescimento bacteriano em meio NBRIP, a concentração de fósforo solúvel presente no meio variou de 0,01 a 88,13  $\mu\text{g/mL}$  entre os isolados, sendo que os isolados 23Y e 4W, apresentaram as maiores concentrações de fósforo solúvel nesse período, com 84,79 e 88,13  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente (Tabela 6).

No período de 72 horas de crescimento bacteriano em meio NBRIP, a concentração de fosfato solúvel presente no meio variou de 0,12 a 79,69  $\mu\text{g/mL}$ , enquanto no período de 120 horas de crescimento bacteriano em meio NBRIP, a concentração de fosfato solúvel no meio testado variou de 0,12 a 67,0  $\mu\text{g/mL}$ . Os isolados 23Y e 4W também solubilizaram as maiores concentrações de fosfato solúvel nesses períodos de tempo (Tabela 6).

Assim, os isolados 4W e 23Y apresentaram a melhor atividade de solubilização, uma vez que apresentaram a maior concentração de fosfato solúvel no meio de cultura NBRIP desde a primeira avaliação, com 24 h após o cultivo, mantendo esse padrão em 72 h e 120 h (Tabela 6, Figura 9).

Além disso, como se pode observar na tabela 6, no período de 24 horas os isolados 23Y e 4W apresentaram os menores valores de pH de 3,97 e 3,98, respectivamente, logo apresentaram os maiores valores de solubilização de fosfato nesse período de 84,79 e 88,13  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Assim, pode-se dizer que a acidificação do meio está ligada ao aumento da solubilização, pois os isolados 23Y e 4W tiveram a diminuição do pH em função da liberação de ácidos orgânicos no meio por essas bactérias (Tabela 6, Figura 9).



**Figura 8.** Curva padrão para determinação da concentração de fósforo solúvel ( $\mu\text{g/mL}$ ) produzido pelos isolados de bactérias endofíticas de mandioca em meio NBRIP.

**Tabela 6.** Solubilização de fosfato ( $\mu\text{g/mL}$ ) e pH do meio NBRIP, após a inoculação de isolados de bactérias endofíticas de mandioca em diferentes intervalos de tempos.

Tratamento	Concentração de fosfato solubilizado ( $\mu\text{g/mL}$ )			pH do meio NBRIP		
	24 horas	72 horas	120 horas	24 horas	72 horas	120 horas
Controle	0,00 a	0,00 a	0,00 a	7,00	7,00	7,00
Isolado 23Y	84,79 d	79,27 c	60,10 c	3,97	4,45	5,95
Isolado 4W	88,13 d	79,69 c	67,00 c	3,98	4,52	5,52
Isolado 1Y	14,50 c	0,12 a	0,12 a	5,95	5,18	5,40
Isolado 7Y	0,18 a	0,18 a	0,12 a	6,73	6,88	6,91
Isolado 15Y	2,53 b	0,15 a	0,12 a	6,80	6,39	6,20
Isolado 16Y	0,01 a	0,18 a	0,12 a	6,20	5,54	5,30
Isolado 25Y	0,18 a	2,45 b	2,30 b	6,04	5,15	5,00

\*As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. \*Isolados de bactéria endofítica obtidos de raiz de mandioca amarela (Y-yellow) e branca (W-white).



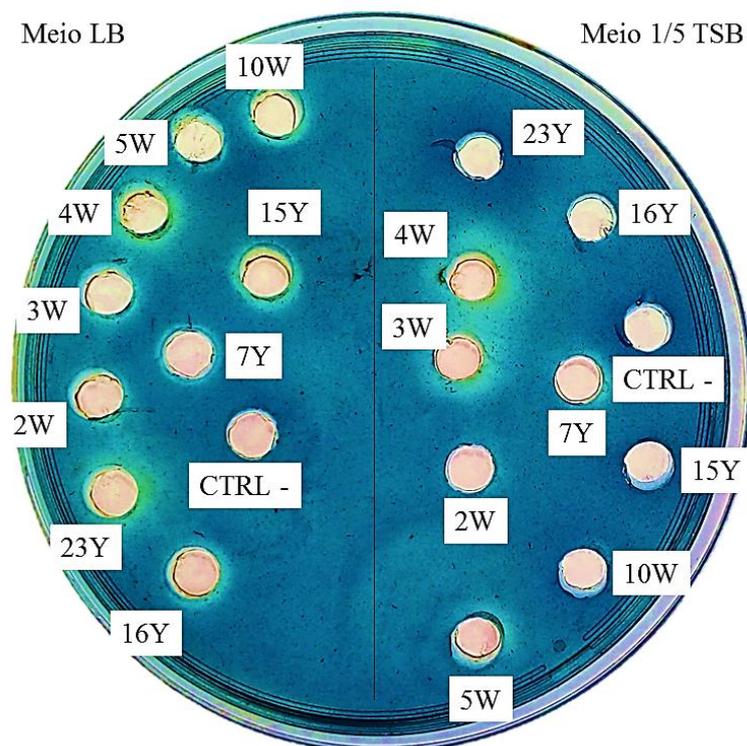
**Figura 9.** Concentração de fósforo solúvel em  $\mu\text{g/mL}$  em meio NBRIP inoculado pelos isolados de bactérias endofíticas de mandioca 4W, 1Y, 7Y, 15Y, 16Y, 23Y e 25Y após 24 horas de cultivo, em relação ao tratamento controle. \*Isolados de bactéria endofítica obtidos de raiz de mandioca amarela (Y-yellow) e branca (W-white).

### 2.3.3.3. Produção de sideróforos

Os sideróforos produzidos pelos isolados de bactérias endofíticas sequestram e complexa o Fe presente na solução CAS, liberando o corante, resultando em uma mudança da coloração do meio de cultura de azul para uma cor amarelo-alaranjado (ALEXANDER; ZUBERER, 1991).

Foram usados dois meios de cultura pobres em ferro como o objetivo de induzir a produção de sideróforos pelos isolados de bactérias endofíticas de mandioca, como o meio LB 2% e o meio TSB 0,6%. Foi realizado um “screening” de apenas nove isolados de bactérias endofíticas.

Uma zona de halo amarelo-alaranjado foi observada na placa de ágar cromo azurol S, indicando que todos os nove isolados de bactérias endofíticas testados (2W, 3W, 4W, 5W, 10W, 7Y, 15Y, 16Y e 23Y) produziram sideróforos em meio LB a 2% e apenas dois isolados (3W e 4W) produziram sideróforos em meio TSB a 0,6% (Figura 10). Com base nisso, o meio LB foi mais eficaz em induzir a produção de sideróforos pelos isolados de bactérias endofíticas testados (Figura 10).



**Figura 10.** Detecção da produção de sideróforos de nove isolados de bactérias endofíticas de mandioca, testados em dois meios pobres em ferro: LB a 2% e meio TSB a 0,6%, através de ensaios com reagente CAS (Cromo Azurol S). TSB: Caldo Triptona de Soja. Controle negativo (CTRL-). \*Isolados de bactéria endofítica obtidos de raiz de mandioca amarela (Y-yellow) e branca (W-white).

#### 2.3.4. Efeito dos isolados 23Y e 4W no crescimento de feijão-caupi

Como os isolados 23Y e 4W apresentaram várias propriedades de promoção de crescimento de plantas, o efeito desses isolados no crescimento de plantas de feijão-caupi foi avaliado, visto a importância desta cultura no cenário agrícola brasileiro.

As plantas de feijão-caupi inoculadas com os isolados 23Y e 4W tinham folhas e raízes bem desenvolvidas (Figura 11). Estes isolados aumentaram de forma significativa o comprimento das raízes, com incremento de 10,31% pelo isolado 23Y e de 32,38% pelo isolado 4W, e incremento da parte aérea de 122% pelo isolado 23Y e de 150% pelo isolado 4W, maiores que o controle (Tabela 7).

O peso fresco da parte aérea e da raiz dos isolados 4W e 23Y foi de, respectivamente, 0,97 e 0,37 g, não se diferenciando estatisticamente entre si, porém foram significativamente diferentes e maiores que o controle (0,37 e 0,3 g, respectivamente).

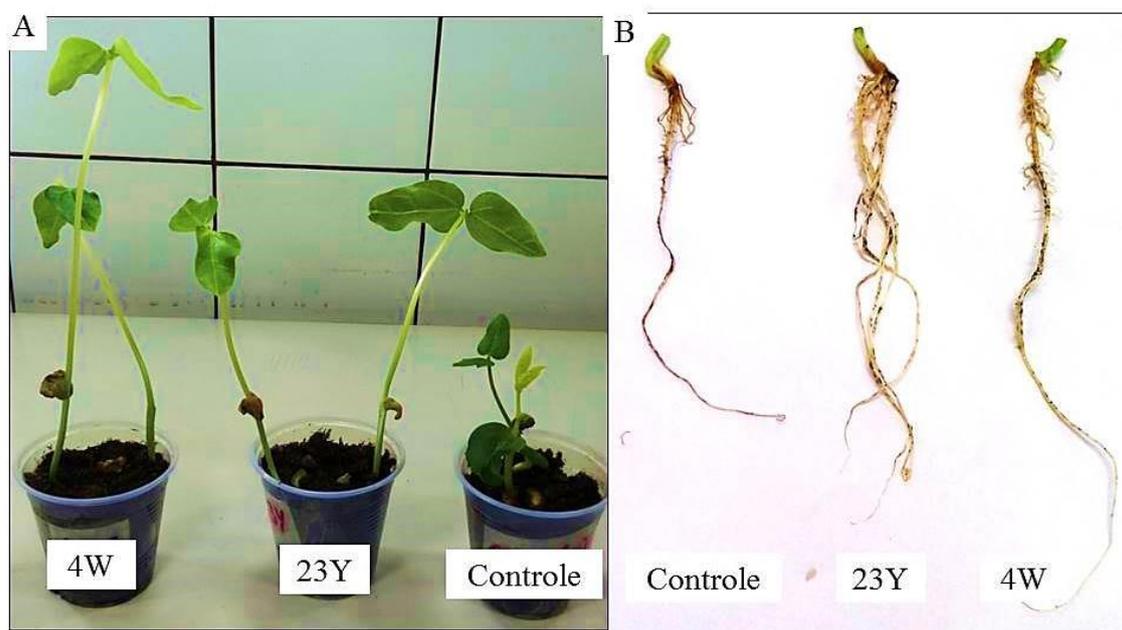
Na presença destes isolados, as mudas de feijão-caupi apresentaram maior biomassa (Tabela 7).

O tratamento de sementes de feijão-caupi com os isolados 23Y e 4W melhorou significativamente o crescimento de mudas de feijão-caupi, tanto da raiz quanto da parte aérea, mostrando que esse isolados exibiram efeitos promotores de crescimento em mudas de feijão-caupi (Tabela 7; Figura 11).

**Tabela 7.** Efeito da inoculação dos isolados de bactérias endofíticas 23Y e 4W nos parâmetros de crescimento vegetativo de plantas de feijão-caupi.

Tratamentos	Comprimento da raiz (cm)	Comprimento da parte aérea (cm)	Peso fresco da raiz (g)	Peso fresco da parte aérea (g)
Controle	13,00 a	6,00 a	0,30 a	0,37 a
Isolado 23Y	14,34 b	13,33 b	0,37 b	0,97 b
Isolado 4W	17,21 c	15,00 c	0,37 b	0,97 b

\*As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. \*Isolados de bactéria endofítica obtidos de raiz de mandioca amarela (Y-yellow) e branca (W-white).



**Figura 11.** Efeito da inoculação dos isolados de bactérias endofíticas 23Y e 4W na parte aérea (A) e na raiz (B) de plantas de feijão-caupi, em relação ao tratamento controle. \*Isolados de bactéria endofítica obtidos de raiz de mandioca amarela (Y-yellow) e branca (W- white).

### **2.3.5. Resposta do crescimento de plantas de mandioca à inoculação com bactérias endofíticas**

Os isolados 15Y, 16Y, 23Y e 4W apresentaram várias propriedades para a promoção do crescimento de plantas. Assim, o efeito destes isolados no crescimento de plantas de mandioca foi avaliado testando dois métodos de inoculação: irrigação do substrato e pulverização foliar.

Quando utilizado o método de inoculação por irrigação, nós observamos que as plantas de mandioca inoculadas com os isolados 15Y, 16Y, 23Y e 4W, apresentaram a parte aérea e as raízes bem desenvolvidas (Figura 8A), mostrando que as plantas de mandioca, inoculadas por estes isolados, apresentaram maior biomassa (Tabela 8).

No entanto, nas raízes, os isolados 23Y e 4W apresentaram os melhores resultados, com um incremento de 29% maior, que o controle (Figura 12A, Tabela 8). Na parte aérea, os isoados 16Y e 4W apresentaram os melhores resultados, proporcionando um acréscimo de respectivamente, 56% e 50% maior que o controle. Com base nos valores de matéria fresca total (MFT) e matéria seca total (MST), as bactérias 16Y e 4W foram os melhores tratamentos, apresentando um aumento significativo de, respectivamente, 81% e 76% para MFT e de 124,32% e 392% de MST maiores, do que o controle (Tabela 8).

Por outro lado, quando utilizado o método de inoculação por pulverização, nós observamos que apenas as plantas de mandioca inoculadas com os isolados 15Y e 16Y tinham as raízes e a parte aérea bem desenvolvida; com incremento em suas raízes de, respectivamente, 29% e 41%, e na parte aérea de, respectivamente, 81% e 58%, maiores que o controle (Figura 8B). Além disso, estes isolados apresentaram os maiores valores para o peso de matéria fresca total (MFT), com incremento de, respectivamente, 49% e 41%, maior que o controle (Tabela 9).

No entanto, os tratamentos com os isolados 23Y e 4W não aumentou o comprimento da raiz, apenas da parte aérea dessas plantas apresentando um incremento de, respectivamente, 31% e 39%, maiores que o controle (Tabela 9).

Em relação à matéria seca total (MST), os isolados 15Y, 16Y e 4W não se diferiram estatisticamente entre si, apresentando um incremento da MST de 88% maior que o controle (Tabela 9).

**Tabela 8.** Efeito da inoculação de isolados de bactérias endofíticas na promoção de crescimento de plantas de mandioca, utilizando o método de inoculação por irrigação do substrato.

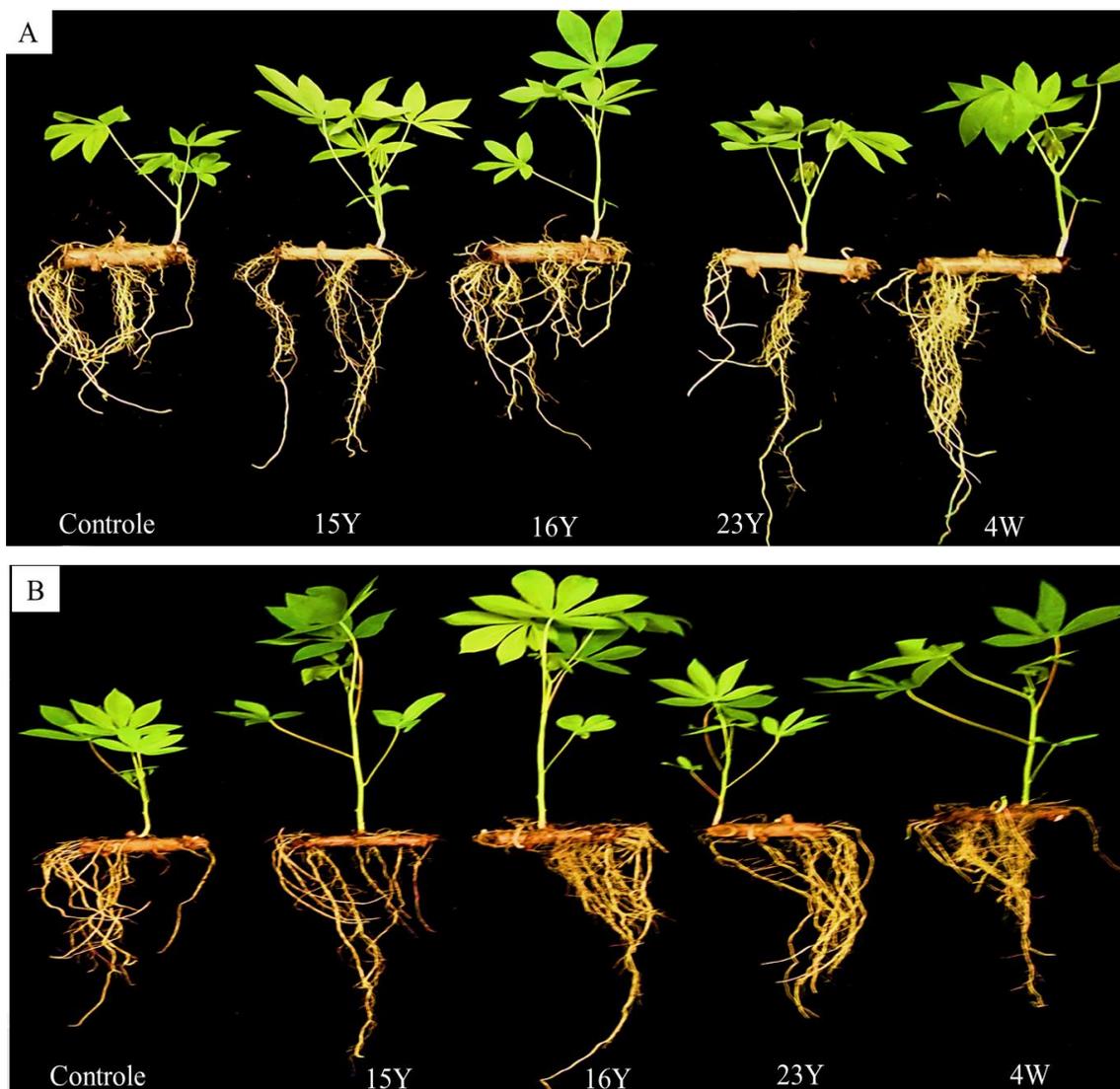
Tratamento	Comprimento da raiz (cm)	Comprimento da parte aérea (cm)	MFR (g)	MFPA (g)	MFT (g)	MSR (g)	MSPA (g)	MST (g)
Controle	24,00 a	17,00 a	0,64 a	1,88 a	2,52 a	0,08 a	0,29 a	0,37 a
Isolado 15Y	27,25 c	20,50 b	1,46 d	2,61 c	4,07 c	0,13 c	0,48 c	0,61 c
Isolado 16Y	25,00 b	26,50 e	1,35 c	3,20 e	4,55 e	0,14 d	0,69 e	0,83 d
Isolado 23Y	31,00 d	21,00 c	0,92 b	2,50 b	3,42 b	0,11 b	0,43 b	0,54 b
Isolado 4W	31,00 d	25,50 d	1,63 e	2,80 d	4,43 d	1,15 e	0,67 d	1,82 e

Matéria Fresca da Raiz (MFR); Matéria Fresca da Parte Aérea (MFPA); Matéria Fresca Total (MFT); Matéria Seca da Raiz (MSR); Matéria Seca da Parte Aérea (MSPA) e Matéria Seca Total (MST). \*As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. \*Isolados de bactéria endofítica obtidos de raiz de mandioca amarela (Y-yellow) e branca (W-white).

**Tabela 9.** Efeito da inoculação de isolados de bactérias endofíticas na promoção de crescimento de plantas de mandioca, utilizando o método de inoculação por pulverização da parte aérea das plantas.

Tratamento	Comprimento da raiz (cm)	Comprimento da parte aérea (cm)	MFR (g)	MFPA (g)	MFT (g)	MSR (g)	MSPA (g)	MST (g)
Controle	22,00 a	20,25 a	1,50 a	2,80 a	4,30 a	0,15 a	0,37 a	0,52 a
Isolado 15Y	28,50 b	36,75 e	1,90 c	4,50 e	6,4 e	0,17 b	0,81 c	0,98 c
Isolado 16Y	31,00 c	32,00 d	2,35 d	3,90 d	6,05 d	0,21 c	0,77 b	0,98 c
Isolado 23Y	22,00 a	26,50 b	1,80 b	3,00 b	4,80 b	0,17 b	0,37 a	0,54 b
Isolado 4W	22,00 a	28,25 c	1,80 b	3,70 c	5,72 c	0,17 b	0,81 c	0,98 c

Matéria Fresca da Raiz (MFR); Matéria Fresca da Parte Aérea (MFPA); Matéria Fresca Total (MFT); Matéria Seca da Raiz (MSR); Matéria Seca da Parte Aérea (MSPA) e Matéria Seca Total (MST). \*As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.



**Figura 12.** Efeito da inoculação, irrigação do substrato (A) e pulverização foliar (B), dos isolados de bactérias endofíticas 15Y, 16Y, 23Y e 4W em relação ao tratamento controle. \*Isolados de bactéria endofítica obtidos de raiz de mandioca amarela (Y-yellow) e branca (W-white).

### 2.3.7 Identificação molecular dos isolados de bactérias endofíticas selecionadas

Na tabela 10 constam os dados da análise comparativa de seqüências parciais do gene 16S rRNA das bactérias endofíticas isoladas de raízes saudáveis de mandioca com seqüências contidas em bancos de dados do NCBI. De acordo com esta análise comparativa, os resultados encontrados neste trabalho mostraram alta homologia com seqüências do gene 16S rRNA de várias bactérias conhecidas. Assim, a análise mostrou que os oito isolados endofíticos pertenciam a dois gêneros: *Bacillus* e *Klebsiella*, como

mostrado na tabela 10, sendo que o gênero *Bacillus* foi encontrado com maior frequência em raízes de mandioca.

Os isolados 4W, 23Y e 16Y apresentaram 98,23%, 97,66% e 99,35% de similaridade com a espécie *Bacillus aryabhatai* cepa B8W22 (NR11595.3). 15Y apresentou 98,48% de similaridade com *Bacillus cereus* cepa CCM 2010 (NR115714). 19Y e 21Y apresentaram similaridade de 99,12% e 99,47% com *Bacillus velezensis* cepa FZB42 (NR075005.2) e 26Y e 29Y apresentaram 98,95% e 99,48% de similaridade com *Klebsiella pneumoniae* cepa DSM 30104 (NR117686.1), respectivamente (Tabela 10).

**Tabela 10.** Análise comparativa de sequências parciais do gene 16S rRNA (fragmentos de aproximadamente 1500 pares de bases) de bactérias endofíticas isoladas de raízes saudáveis de mandioca com sequências contidas em bancos de dados no NCBI.

Isolados	Gene 16S rRNA (pb)	Identificação mais próxima no banco de dados NCBI*	IS (%)**	E-value***
29Y	960	<i>Klebsiella pneumoniae</i> strain DSM 30104 (NR117686.1)	99,48	0.0
21Y	960	<i>Bacillus velezensis</i> strain FZB42 (NR075005.2)	99,47	0.0
16Y	960	<i>Bacillus aryabhatai</i> strain B8W22 (NR11595.3)	99,35	0.0
19Y	960	<i>Bacillus velezensis</i> strain FZB42 (NR075005.2)	99,12	0.0
26Y	960	<i>Klebsiella pneumoniae</i> strain DSM 30104 (NR117686.1)	98,95	0.0
15Y	960	<i>Bacillus cereus</i> strain CCM 2010 (NR11571.4)	98,48	0.0
4W	960	<i>Bacillus aryabhatai</i> B8W22 (NR11595.3)	98,23	0.0
23Y	960	<i>Bacillus aryabhatai</i> strain B8W22 (NR11595.3)	97,66	0.0

\*National Center for Biotechnology Information (NCBI); \*\* Índice de Similaridade (IS): 0-100%; \*\*\*O valor de E-value sugere que quanto mais próximo de zero, mais confiável é o alinhamento das sequências. \*Isolados de bactéria endofítica obtidos de raiz de mandioca amarela (Y-yellow) e branca (W-white).

## 2.4. DISCUSSÃO

A mandioca é uma cultura de grande importância para agricultura brasileira e mundial, no entanto a sua produção vem sendo ameaçada por algumas doenças. Neste estudo, foi identificado bactérias endofíticas associadas a raízes de mandioca com potencial para promover o crescimento de plantas e para controlar *Phytophthium* sp., que causa a doença da podridão mole em raízes de mandioca na região amazônica, destruindo inúmeros mandiocais, e conseqüentemente, causando uma queda progressiva

na produção agrícola, afetando, assim, a economia brasileira. O uso de BPCPs fornece uma das estratégias de controle mais eficientes na agricultura. Neste estudo, foram isolados vinte e uma bactérias endofíticas de raízes sadias de mandioca, sendo que destes, seis isolados identificados como *B. velezensis* cepa FZB42 (19Y e 21Y), *B. aryabhatai* cepa B8W22 (23Y e 4W) e *K. pneumoniae* cepa DSM 30104 (26Y e 29Y) apresentaram forte antagonismo à *Phytophthium* sp. O isolado 21Y (*B. velezensis* cepa FZB42) apresentou a maior inibição, de 60,7% deste fitopatógeno.

Várias espécies de *Bacillus* têm sido muito utilizadas no controle biológico de diversas doenças de plantas. Como por exemplo, em um estudo recente de Cheffi et al. (2019) identificaram em seu trabalho uma cepa de *Bacillus velezensis* OEE1, isolada de raízes de *Olea europaea*, com forte atividade inibitória contra fitopatógenos oomicetos e fungos. Os autores observaram, em seu trabalho, que esta cepa foi capaz de inibir o crescimento de *Fusarium solani* em 82,42%. Além disso, a estirpe OEE1 mostrou vários graus de inibição dos fitopatógenos estudados, sendo que a porcentagem de inibição variou de 40 a 75% com os oomicetos, do gênero *Phytophthora*, e de 25 a 40% em *Pythium* e *Phytophthium*. Até o momento, *B. velezensis* foi relatado promovendo o crescimento de plantas (MENG et al., 2016), controlando fitopatógenos (CHEFFI et al., 2019; CUI et al., 2020) e como poluentes degradantes (BAFANA et al., 2008). Em um estudo recente foi relatado que *B. aryabhatai* pode atuar no biocontrole de nematóides (ZHAO et al., 2020) e na promoção do crescimento de plantas (KAVAMURA et al., 2013; SHEN et al., 2019).

Bactérias do gênero *Klebsiella*, são endófitos comuns de plantas (DONG et al., 2003) e tem sido encontradas no interior de plantas de milho, trigo, videira, arroz e também de mandioca (BELL et al., 1995; ELBELTAGY et al., 2000; CHELIUS & TRIPLETT, 2000; TEIXEIRA et al, 2007; DE MELO et al., 2009). Além disso, foi relatado que a bactéria *K. pneumoniae* protege o arroz da queima da bainha, causada por *Rhizoctonia solani* (JI et al., 2014), atua no biocontrole de nematóides (LIU et al., 2018) e promove o crescimento das plantas através da fixação de nitrogênio (INIGUEZ et al., 2004), produção de ácido indol acético (SACHDEV et al., 2009), sideróforos e solubilização de fosfato (JI et al., 2004).

O tratamento de sementes de feijão-caupi com *B. aryabhatai* cepa B8W22 (isolados 23Y e 4W) melhorou significativamente o crescimento de mudas de feijão-

caupi, e além disso, estes isolados quando irrigados no substrato apresentaram efeitos promotores de crescimento em plantas de mandioca, principalmente o da raiz.

Os tratamentos com os isolados 15Y (*B. cereus*) e 16Y (*B. aryabhatai*) melhoraram de forma significativa o crescimento em plantas de mandioca, utilizando os dois métodos de inoculação testados: irrigação do substrato e pulverização foliar. No entanto, o método de inoculação via pulverização foliar foi mais eficiente para estes isolados, os quais apresentaram um maior incremento da raiz e principalmente da parte aérea de plantas de mandioca inoculadas por estes isolados. A forma como as bactérias endofíticas colonizam a planta vem sendo fonte de estudo visando entender se o local de inoculação afeta, e como afeta, a eficiência da associação microrganismo / planta.

Vários mecanismos podem contribuir para o aumento da biomassa de plantas inoculadas por BPCPs. Os dados do nosso estudo mostraram que estes isolados produziram AIA, em meio de TS suplementado com o aminoácido L-triptofano. *B. aryabhatai* é conhecido por sua capacidade de produzir AIA e fixar nitrogênio (KARTHIK et al., 2017; SHEN et al., 2019). Quando *B. aryabhatai* foi aplicado em arroz, aumentou o seu crescimento (SHEN et al., 2019). Além disso, alguns estudos relatam que este microrganismo é conhecido por sua utilização na tolerância ao estresse contra a seca e alta temperatura de plantas (PARK et al., 2017; LEE et al., 2018; SHEN et al., 2019). As raízes de feijão-caupi e mandioca tratadas com *B. aryabhatai* cepa B8W22 (23Y e 4W) foram maiores que as do controle. As BPCPs afetam a morfologia radicular, aumentando a área de superfície das raízes (LARRABURU et al., 2007; WANG et al., 2015) e o peso (ISLAM et al., 2016; SINGH et al., 2017), melhorando a absorção de água e nutrientes do solo. O fósforo também é um elemento essencial para as plantas. *B. aryabhatai* (23Y e 4W) pode converter o fosfato tricálcico em uma forma que esteja disponível para as plantas. Alguns estudos, como o de Figueiredo et al. (2017) que caracterizaram cento e quinze isolados de bactérias endofíticas de plantas de milho quanto a sua eficiência de solubilizar o fosfato em meio NBRIP-ágar, observaram que a maioria das espécies endofíticas pertencentes ao gênero *Bacillus* foram as mais eficientes em solubilizar o fosfato de cálcio. No trabalho de Zhang et al. (2018), isolaram 57 endófitos de plantas de gengibre, e eles observaram que os endófitos do gênero de *Bacillus* sp. apresentavam uma solubilização do fósforo inferior a 100 µg/mL, assim como observado em nosso trabalho. O estudo de bactérias solubilizadoras de

fosfato de cálcio é de extrema importância, já que pode fornecer a quantidade de fósforo requerida pela planta. *B. aryabhatai* cepa B8W22 (23Y e 4W) também produziu sideróforos, que inibem o crescimento de fitopatógenos quelando o  $\text{Fe}^{+3}$  e agem também como um dos principais determinantes da resistência sistêmica induzida (ISR) (RAMAMOORTHY et al., 2001). Nossos dados indicaram que as cepas de *B. aryabhatai* B8W22 (23Y e 4W) produziram AIA, sideróforos e solubilizaram o fosfato de cálcio, mostrando que estes isolados podem fornecer uma nutrição adicional às plantas e esta nutrição pode ser uma razão pela qual as plantas de feijão-caupi e mandioca, tratadas com estes isolados, apresentaram maior biomassa e resistência a *Phytophthium* sp., sugerindo a sua utilidade como bioinoculante.

Este estudo é o primeiro a relatar o potencial de cepas de *B. velezensis* cepa FZB42 (19Y e 21Y), *K. pneumoniae* cepa DSM 30104 (26Y e 29Y) e *B. aryabhatai* cepa B8W22 (23Y e 4W) como agente de biocontrole para controlar a podridão mole em raízes de mandioca na Amazônia Oriental.

## 2.5. CONCLUSÃO

Nossos resultados mostram que plantas de mandioca cultivadas na Amazônia Oriental apresentam interação com bactérias endofíticas em suas raízes, do gênero *Bacillus* e *Klebsiella*, sendo descrito, pela primeira vez, em nosso estudo, o isolamento de duas espécies como endofíticas de mandioca: *B. aryabhatai* cepa B8W22 e *B. velezensis* cepa FZB42.

Os isolados 23Y e 4W (*B. aryabhatai* cepa B8W22) apresentaram propriedades notáveis para promover o crescimento de plantas, e quando inoculados promoveram o crescimento em plantas de mandioca e feijão-caupi, sugerindo sua utilidade como bioinoculante.

Este estudo é o primeiro a relatar o potencial de seis isolados de bactérias endofíticas: *B. aryabhatai* cepa B8W22 (23Y e 4W), *B. velezensis* cepa FZB42 (19Y e 21Y) e *K. pneumoniae* cepa DSM 30104 (26Y e 29Y) no biocontrole de *Phytophthium* sp., responsável pela podridão mole em raízes de mandioca na Amazônia Oriental.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradecemos a Fundação Amazônia de Amparo a Estudos e Pesquisas do Pará (FAPESPA) e a Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa e apoio financeiro; a Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), Universidade Federal do Pará (UFPA) e a Embrapa Amazônia Oriental pela infraestrutura.

## REFERÊNCIAS

- AKBABA, M., OZAKTAN, H., 2018. Biocontrol of angular leaf spot disease and colonization of cucumber (*Cucumis sativus* L.) by endophytic bacteria. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 28, n. 1, p. 14.
- ALTSCHUL, S. F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E. W., LIPMAN, D. J., 1990. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, 215, 403–410.
- AUSUBEL, F. M., ROGER, B., KINGSTON, R. E., MOORE, D. D., SEIDMAN, J. G., SMITH, J. A., KEVIN, S., 2003. **Current protocols in molecular biology**, ringbou ed.
- BAFANA, A., CHAKRABARTI, T., DEVI, S. S. Azoreductase and dye detoxification activities of *Bacillus velezensis* strain AB. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 77, n. 5, p. 1139-1144, 2008.
- BELL, C. R., DICKIE, G. A., HARVEY, W. L. G., CHAN, J. W. Y. F., 1995. Endophytic bacteria in grapevine. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 46-53.
- BERRAQUEIRO, F.R., BAYA, A.M., AND CORMENZANA, A.R., 1976. Establecimiento de índices para el estudio de la solubilización de fosfatos por bacterias del suelo. **ARS Pharmaceutica**, n. 17, p. 399–406.
- BOARI, A. D. J., CUNHA, E. M., QUADROS, A. F. F., BARRETO, R. W., FERNANDES, A. F., 2018. First report of *Phytophthora* sp. causing storage root rot and foliage blight of cassava in Brazil. **Plant disease**, v. 102, n. 5, p. 1042-1042.
- CHEFFI, M., CHENARI BOUKET, A., ALENEZI, F. N., LUPTAKOVA, L., BELKA, M., VALLAT, A., BELBAHRI, L., 2019. *Olea europaea* L. root endophyte *Bacillus velezensis* OEE1 counteracts oomycete and fungal harmful pathogens and harbours a large repertoire of secreted and volatile metabolites and beneficial functional genes. **Microorganisms**, v.7, n.9, p.314.
- CHELIUS, M. K., TRIPLETT, E. W., 2000. Immunolocalization of Dinitrogenase Reductase Produced by *Klebsiella pneumoniae* in Association with *Zea mays* L. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 2, p. 783-787.
- CORDEIRO, T; SECCO, R.; SILVA, M. J. DA; SODRÉ, R. C.; MARTINS, M. L. L. *Manihot* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB17600>. Acesso em: 22 Jun. 2017.
- COSTA, E. M. D., NÓBREGA, R. S. A., CARVALHO, F. D., TROCHMANN, A., FERREIRA, L. D. V. M., MOREIRA, F. M. D. S., 2013. Promoção do crescimento vegetal e diversidade genética de bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, n. 9, p. 1275-1284.

- CRUZ, L. M., DE SOUZA, E. M., WEBER, O. B., BALDANI, J. I., DÖBEREINER, J., & DE OLIVEIRA PEDROSA, F., 2001. 16S ribosomal DNA characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from banana (*Musa* spp.) and pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merrill). **Applied Environmental Microbiology**, v. 67, n. 5, p.2375-2379
- CUI, L., YANG, C., WEI, L., LI, T., CHEN, X., 2020. Isolation and identification of an endophytic bacteria *Bacillus velezensis* 8-4 exhibiting biocontrol activity against potato scab. **Biological Control**, v. 141, p. 104156.
- DAS, A. J., KUMAR, M., & KUMAR, R., 2013. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): an alternative of chemical fertilizer for sustainable, environment friendly agriculture. **Research Journal of Agricultura and Forestry Sciences**, v. 1, n.4, p.21-23.
- DE MELO, F. M. P. D., FIORE, M. F., MORAES, L. A. B. D., SILVA-STENICO, M. E., SCRAMIN, S., TEIXEIRA, M. D. A., & MELO, I. S. D., 2009. Antifungal compound produced by the cassava endophyte *Bacillus pumilus* MAIIM4A. **Scientia Agricola**, v. 66, n. 5, p. 583-592.
- DONG, Y., INIGUEZ, A. L., TRIPLETT, E. W., 2003. Quantitative assessments of the host range and strain specificity of endophytic colonization by *Klebsiella pneumoniae* 342. **Plant Soil**, v. 257, n. 1, p. 49-59.
- ELBELTAGY, A., NISHIOKA, K., SATO, T., SUZUKI, H., YE, B., HAMADA, T., MINAMISAWA, K., 2000. Endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp. isolated from wild rice species. **Applied Environmental Microbiology**, v. 67, n. 11, p. 5285-5293.
- FERREIRA, D.F., 2010. **SISVAR, Sistema de análise de variância**. Versão 5.3. Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- FIGUEIREDO, J. E., OLIVEIRA, C. A., DOS, V. S., GOMES, E. A., RIBEIRO, V. P., BARROS, B. A, MARRIEL, I. E., 2017. Maize endophytic bacteria as mineral phosphate solubilizers. **Genetics and Molecular Research**, v. 16, n. 1.
- GORDON, S. A., & WEBER, R. P., 1951. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. **Plant physiology**, v. 26, n. 1, p. 192.
- HALLMANN, J., QUADT-HALLMANN, A., MAHAFFEE, W. F., KLOEPPER, J.W., 1997. Endófitos bacterianos em culturas agrícolas. **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, n.10, p.895-914.
- HARA, F. A. D. S., & OLIVEIRA, L. A. D., 2005. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos de Iranduba, Amazonas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 7, p. 667-672.

HUNGRIA, M., & ARAUJO, R. S., 1994. **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: Embrapa-Serviço de Produção e Informação.

INIGUEZ, A. L., DONG, Y., TRIPLETT, E. W., 2004. Nitrogen fixation in wheat provided by *Klebsiella pneumoniae* 342. **Molecular Plant-Microbe**, v. 17, n. 10, p. 1078-1085.

ISLAM, S., AKANDA, A. M., PROVA, A., ISLAM, M. T., HOSSAIN, M. M., 2016. Isolation and identification of plant growth promoting rhizobacteria from cucumber rhizosphere and their effect on plant growth promotion and disease suppression. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1360.

JI, S. H., GURURANI, M. A., CHUN, S. C., 2014. Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic diazotrophic bacteria from Korean rice cultivars. **Microbiological Research**, v. 169, n. 1, p. 83-98.

JI, G., WEI, Y., JIANG, G., GUAN, X., YU, S., LIU, C., 2004. Preliminary identification of bacterial strain causing Anthurium bacterial blight. **Acta phytopathologica**, v. 34, n. 2, p. 107-111.

KADO, C. I., HESKETT, M. G., 1970. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, v. 60, n. 6, p. 969-976.

KARTHIK, M., PUSHPAKANTH, P., KRISHNAMOORTHY, R., SENTHILKUMAR, M., 2017. Endophytic bacteria associated with banana cultivars and their inoculation effect on plant growth. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 92, n. 6, p. 568- 576.

KAVAMURA, V. N., SANTOS, S. N., DA SILVA, J. L., PARMA, M. M., ÁVILA, L. A., VISCONTI, A., DE MELO, I. S., 2013. Screening of Brazilian cacti rhizobacteria for plant growth promotion under drought. **Microbiological Research**, v. 168, n. 4, p. 183-191.

KHANAM, B. U. S. H. R. A., CHANDRA, R. A. M. E. S. H., 2015. Isolation and identification of endophytic bacteria producing bright red pigment from the dye yielding plant *Beta vulgaris* L. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 7, n. 5, p. 220-4.

LARRABURU, E. E., CARLETTI, S. M., CÁCERES, E. A. R., LLORENTE, B. E., 2007. Micropropagation of photinia employing rhizobacteria to promote root development. **Plant cell Reports**, v. 26, n. 6, p. 711-717.

LEE, Y. H., JANG, S. J., HAN, J. H., BAE, J. S., SHIN, H., PARK, H. J., HONG, J. K., 2018. Enhanced Tolerance of Chinese Cabbage Seedlings Mediated by *Bacillus*

*aryabhatai* H26-2 and *B. siamensis* H30-3 against High Temperature Stress and Fungal Infections. **The Plant Pathology Journal**, v. 34, n. 6, p. 555.

LEITE, M. C. D. B. S., PEREIRA, A. P. D. A., SOUZA, A. J. D., ANDREOTE, F. D., FREIRE, F. J., SOBRAL, J. K., 2018. Bioprospection and genetic diversity of endophytic bacteria associated with cassava plant. **Revista Caatinga**, v. 31, n. 2, p. 315-325.

LIMA, A. M., MOURA, E. F., ISHIDA, A. K. N., DA COSTA PEREIRA, A. C., DOS REIS, S. P., DE SOUZA, C. R. B., 2018. Expression profiles of defense genes in cassava storage roots upon exposure to *Phytophthium* sp., causal agent of soft root rot disease. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 104, p. 23-30.

LIU, D., CHEN, L., ZHU, X., WANG, Y., XUAN, Y., LIU, X., DUAN, Y., 2018. *Klebsiella pneumoniae* SnebYK mediates resistance against *Heterodera glycines* and promotes soybean growth. *Frontiers in Microbiology*, v. 9, p. 1134.

MARIANO, R. D. L. R., SOUZA, E. B., 2016. **Manual de práticas em fitobacteriologia**. Recife: UFRPE.

MENG, Q., JIANG, H., HAO, J. J., 2016. Effects of *Bacillus velezensis* strain BAC03 in promoting plant growth. **Biological Control**, v. 98, p. 18-26.

MUNIF, A., HALLMANN, J., SIKORA, R. A., 2013. Isolation of root endophytic bacteria from tomato and its biocontrol activity against fungal diseases. **Microbiology Indonesia**, v. 6, n. 4, p.2.

MURASHIGE, T., & SKOOG, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497.

MURPHY, J. A. M. E. S., & RILEY, J. P., 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. **Analytica chimica acta**, v. 27, p. 31-36.

NASCIMENTO, S. B., LIMA, A. M., BORGES, B. N., SOUZA, C. R. B., 2015. Endophytic bacteria from *Piper tuberculatum* Jacq.: isolation, molecular characterization, and in vitro screening for the control of *Fusarium solani* f. sp *piperis*, the causal agent of root rot disease in black pepper (*Piper nigrum* L.). **Genetics and Molecular Research**, v.14, p. 7567-7577.

NAUTIYAL, C. S., 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS microbiology Letters**, v. 170, n. 1, p. 265-270.

PARK, Y. G., MUN, B. G., KANG, S. M., HUSSAIN, A., SHAHZAD, R., SEO, C. W., LEE, I. J., 2017. *Bacillus aryabhatai* SRB02 tolerates oxidative and nitrosative stress and promotes the growth of soybean by modulating the production of phytohormones. **PLoS One**, v. 12, n. 3.

- PEIXOTO NETO, P. D. S., AZEVEDO, J. L., & ARAÚJO, W. D., 2002. Microrganismos endofíticos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 29, p. 62-77.
- PEREZ-ROSALES, E., MELENDEZ, L. A., PUENTE, M. E., JUAREZ, R. V., GUZMAN, E. Q., SAVIN, T. Z., BOJORQUEZ, E. M., 2017. Isolation and characterization of endophytic bacteria associated with roots of jojoba (*Simmondsia chinensis* (Link) Schneid). **Current Science**.
- RAMAMOORTHY, V., VISWANATHAN, R., RAGUCHANDER, T., PRAKASAM, V., SAMIYAPPAN, R., 2001. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. **Crop Protection**, v. 20, n. 1, p. 1-11.
- SACHDEV, D. P., CHAUDHARI, H. G., KASTURE, V. M., DHAVALE, D. D., CHOPADE, B. A., 2009. Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing *Klebsiella pneumoniae* strains from rhizosphere of wheat (*Triticum aestivum*) and their effect on plant growth.
- SCHWYN, B., & NEILANDS, J. B., 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. **Analytical biochemistry**, v. 160, n. 1, p. 47-56.
- SHEN, F. T., YEN, J. H., LIAO, C. S., CHEN, W. C., CHAO, Y. T., 2019. Screening of Rice Endophytic Biofertilizers with Fungicide Tolerance and Plant Growth-Promoting Characteristics. **Sustainability**, v.11, n.4, p.1133.
- SINGH, R. P., JHA, P., JHA, P. N., 2017. Bioinoculation of plant growth-promoting rhizobacterium *Enterobacter cloacae* ZNP-3 increased resistance against salt and temperature stresses in wheat plant (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Plant Growth Regulation*, v. 36, n. 3, p. 783-798.
- TEIXEIRA, M. A., MELO, I. S., VIEIRA, R. F., COSTA, F. E. C., HARAKAVA, R., 2007. Microrganismos endofíticos de mandioca de áreas comerciais e etnovarietades em três estados brasileiros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, p. 43 - 49.
- ZHANG, Y., KANG, X., LIU, H., LIU, Y., LI, Y., YU, X., CHEN, Q., 2018. Endophytes isolated from ginger rhizome exhibit growth promoting potential for *Zea mays*. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 64, n. 9, p. 1302-1314.
- ZHAO, J., LIU, D., WANG, Y., ZHU, X., CHEN, L., DUAN, Y., 2020. Evaluation of *Bacillus aryabhatai* Sneb517 for control of *Heterodera glycines* in soybean. **Biological Control**, v. 142, p. 104147.
- WANG, B., MEI, C., SEILER, J. R., 2015. Early growth promotion and leaf level physiology changes in Burkholderia phytofirmans strain PsJN inoculated switchgrass. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 86, p. 16-23.

YANDIA, S. P., GANDONOU, C. B., SILLA, S., ZINGA, I., TOUKOUROU, F., 2018. Response of four cultivars of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) plantlets free of cassava mosaic virus to micropropagation in different media. **African Journal of Biotechnology**, v. 17, n. 1, p. 9-16.

## ARTIGO II

### 3. Bactérias endofíticas como agentes de biocontrole de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* em mandioca

Solange da Cunha Ferreira<sup>1,2</sup>, Elisa Ferreira Moura Cunha<sup>3</sup>, Alessandra Keiko Nakasone<sup>3</sup>, Cláudia Regina Batista de Souza<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, PA, 66075-110, Brasil. <sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, PA, CEP 66077-530, Brasil. <sup>3</sup>Embrapa Amazônia Oriental, Trav. Dr. Enéas Pinheiro, s/n 66095-903, Belém, Pará, Brasil\*Autor correspondente: bsouza@ufpa.br

#### RESUMO

A bacteriose da mandioca, causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*, é uma das doenças mais importantes da cultura, que pode levar a morte das plantas. O objetivo deste trabalho foi selecionar as bactérias endofíticas de raízes saudáveis de mandioca com potencial para inibir *X. axonopodis* pv. *manihotis*, *in vitro*. Na sequência, avaliou-se por meio de dois ensaios, em casa de vegetação, o efeito dos isolados 16Y, 23Y, 4W (*Bacillus aryabhattai*), 15Y (*B. cereus*), 26Y e 29Y (*Klebsiella pneumoniae*) na redução da severidade da bacteriose da mandioca, utilizando dois métodos de inoculação: irrigação do substrato e pulverização da parte aérea da planta. A severidade foi quantificada a partir das observações das lesões nos tecidos foliares com o emprego de escala diagramática. Dois isolados (26Y e 29Y) inibiram *X. axonopodis* pv. *manihotis*, *in vitro*. Todos os isolados reduziram significativamente a severidade da bacteriose da mandioca, quando previamente irrigados no substrato e apenas os isolados 15Y, 16Y, 26Y e 29Y promoveram uma redução significativa da severidade da bacteriose, quando previamente pulverizados nas folhas de mandioca. Este estudo é o primeiro a relatar o potencial de bactérias endofíticas como agentes de biocontrole para a bacteriose de mandioca na Amazônia Oriental

**Palavras-chave:** Bactérias endofíticas; *Bacillus aryabhattai*; *Klebsiella pneumoniae*; Bacteriose da mandioca; Biocontrole, Inoculação.

### ABSTRACT

Cassava bacteriosis, caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*, is one of the most important diseases in the crop, which can lead to the death of plants. The objective of this work was to select the endophytic bacteria from healthy cassava roots with the potential to inhibit *X. axonopodis* pv. *manihotis*, *in vitro*. Then, the effect of isolates 16Y, 23Y, 4W (*Bacillus aryabhattai*), 15Y (*B. cereus*), 26Y and 29Y (*Klebsiella pneumoniae*) was evaluated by means of two trials in a greenhouse. Severity of cassava bacteriosis, using two inoculation methods: irrigation of the substrate and spraying of the aerial part of the plant. Severity was quantified from the observation of lesions in leaf tissues using a diagrammatic scale. Two isolates (26Y and 29Y) inhibited *X. axonopodis* pv. *manihotis*, *in vitro*. All isolates significantly reduced the severity of cassava bacteriosis, when previously irrigated in the substrate. Only isolates 15Y, 16Y, 26Y and 29Y promoted a significant reduction in the severity of bacteriosis, when previously sprayed on cassava leaves. This study is the first to report the potential of endophytic bacteria as biocontrol agents for cassava bacteriosis in the Eastern Amazon

**Key words:** Endophytic bacteria; *Bacillus aryabhattai*; *Klebsiella pneumoniae*; Cassava bacteriosis; Biocontrol; Inoculation.

### 3.1. INTRODUÇÃO

A mandioca é uma das culturas mais importantes na África, Ásia e América Latina, onde milhões de pessoas dependem de suas raízes de armazenamento de amido como sua principal fonte de energia (PARMAR et al., 2017). No Brasil, a mandioca é cultivada em todas as regiões; no entanto, em determinadas condições ambientais e dependendo da susceptibilidade da variedade ou cultivar, vem sendo severamente afetada pela bacteriose, causada por *X. axonopodis* pv. *manihotis* (LÓPEZ & BERNAL, 2012). Em ataques severos, pode ocorrer a destruição de parte aérea da planta e redução na produção de suas raízes (ALMEIDA et al., 2009).

No Brasil, a doença encontra-se mais expressiva nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste, onde pode possuir caráter altamente destrutivo. No estado do Pará, a bacteriose está presente nos municípios de Acará, Ananindeua, Capanema, Capitão Poço, Castanhal, Igarapé-Açu, Moju, Santa Isabel do Pará, São Francisco do Pará e Tracuateua, onde apenas os sintomas foliares da doença foram encontrados (ISHIDA et al., 2016).

Devido à sua rápida propagação, dificuldades de manejo, problemas com controle químico e severidade das perdas das plantações afetadas, *X. axonopodis* pv. *manihotis* é um obstáculo difícil para a agricultura em todo o mundo (MARIN et al., 2019).

Uma alternativa mais sustentável para combater essa doença é o controle de *X. axonopodis* pv. *manihotis* por microrganismos endofíticos, direta ou indiretamente, através do uso de seus metabólitos secundários envolvidos no biocontrole (TEOTIA et al., 2017; MARIN et al., 2019). Microrganismos endofíticos, como fungos e bactérias, existem no interior de tecidos vegetais sem causar sintomas de doenças para as plantas hospedeiras (HALLMANN et al., 1997). Muitas bactérias endofíticas foram relatadas como agentes eficazes no biocontrole de fitopatógenos (NASCIMENTO et al., 2015; SOARES et al., 2016; DAUNGFU et al., 2019). Assim, as bactérias endofíticas habitam um nicho ecológico semelhante àqueles ocupados por fitopatógenos, podendo controlá-los por competição de nutrientes, produção de substâncias antibióticas, parasitando o patógeno ou mesmo induzindo a planta a desenvolver resistência às doenças (HALLMANN et al., 1997; HOLTSMARK et al., 2008).

O mecanismo mais importante no controle biológico de doenças pelos endófitos é a indução à resistência sistêmica (ISR). Este tipo de mecanismo pode ser sistematicamente induzido pela presença de microrganismos benéficos que colonizam o sistema radicular das plantas, principalmente por bactérias promotoras do crescimento (BPCPs) (PIETERSE et al., 2014). Neste tipo de mecanismo não há a provocação de necrose e é mediado pelas rotas do ácido jasmônico (AJ) e etileno (ET) (PIETERSE et al., 2014; VRYZAS, 2016).

O estudo da resistência de plantas induzidas por bactérias endofíticas, para o controle de doenças, tem mostrado resultados promissores em várias culturas como em arroz (CHITHRASHREE et al., 2011), pimenta (CHOI et al., 2014) e tomate (HYAKUMACHI et al., 2013); e contra fungos, bactérias, vírus e nematóides (JI et al., 2014; LIU et al., 2018). Além do fator ambiental, com a utilização de produtos menos tóxicos ao meio ambiente, a proteção contra fitopatógenos faz da resistência induzida uma opção adicional ao agricultor (ISHIDA et al., 2008).

Assim, face à importância da cultura da mandioca para o estado do Pará e considerando que a bacteriose da mandioca vem comprometendo a sua sobrevivência, este trabalho tem como objetivo avaliar o efeito das bactérias endofíticas no crescimento *in vitro* de *X. axonopodis* pv. *manihotis* e no controle da bacteriose da mandioca em casa de vegetação.

## **3.2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.2.1. Origem e preservação de *X. axonopodis* pv. *manihotis***

O isolado de *X. axonopodis* pv. *manihotis* P225, proveniente do município de Moju, Estado do Pará, utilizado no presente trabalho, pertence ao Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Amazônia Oriental. Para a realização do experimento, o isolado foi repicado para o meio de cultura MB1 (KADO & HESKETT, 1970) pelo método de estrias paralelas e incubados a 28°C, por 48 horas.

### **3.2.2. Efeito *in vitro* dos isolados de bactérias endofíticas de mandioca sobre o crescimento de *X. axonopodis* pv. *manihotis***

Neste ensaio, foram testados vinte e um isolados de bactérias endofíticas, obtidas do tecido interno das raízes saudáveis de mandioca amarela e branca contra o isolado de bactéria fitopatogênica *X. axonopodis* pv. *manihotis*. O teste de antagonismo baseou-se na metodologia de Mariano et al. (2016).

A bactéria fitopatogênica foi repicada para placas de Petri contendo meio de cultura MB1 (KADO & HESKETT, 1970) e foram incubadas a 28°C/48 horas. Após o período de incubação, foi preparada uma suspensão bacteriana de *X. axonopodis* pv. *manihotis* com concentração ajustada em espectrofotômetro para  $DO_{600} = 0,3$  contendo  $10^8$  UFC/mL, onde 0,1 mL foi espalhado com o auxílio de uma alça de drigalski em placas contendo o meio de cultura MB1. Em seguida, foi colocado nessas placas, em quatro pontos equidistantes, discos de papel filtro esterilizados contendo 10 µL da suspensão bacteriana endofítica a ser testada com a concentração já ajustada para  $DO_{570nm} = 0,52$  (MARIANO et al., 2016) contendo  $2 \times 10^9$  UFC/mL. No tratamento controle foi colocado apenas discos de papel filtro esterilizados contendo solução salina a 0,8%. Após 48 horas foi feita a avaliação pela medição do halo de inibição, quando presente.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições por tratamento, e as médias foram submetidas à análise de variância, sendo que as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de significância.

### **3.2.3. Bactérias endofíticas com potencial para controlar a bacteriose da mandioca em casa de vegetação**

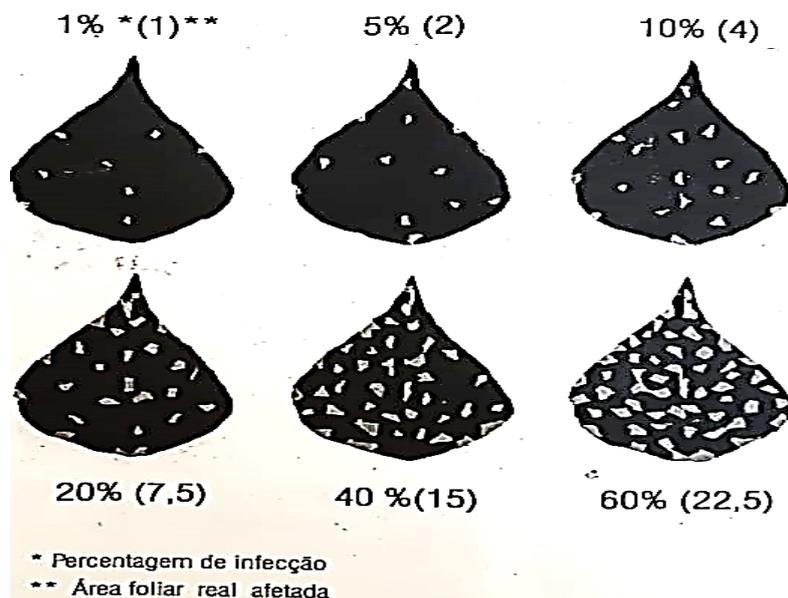
Nos experimentos foram utilizadas plantas obtidas a partir de estacas sadias de mandioca do acesso Milagrosa alta 11, provenientes do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da Embrapa Amazônia Oriental. As manivas foram plantadas em vasos de seis litros de capacidade contendo substrato de fibra de coco estéril. As mesmas foram

dispostas em bancadas e mantidas em casa de vegetação. Após a emergência, as plantas foram regadas com 100 mL de solução nutritiva segundo Murashige & Skoog (1962).

Para o preparo da suspensão bacteriana dos isolados de bactérias endofíticas de mandioca a serem testadas: 16Y, 23Y, 4W (*Bacillus aryabhatai*), 15Y (*B. cereus*), 26Y e 29Y (*Klebsiella pneumoniae*), as colônias bacterianas foram diluídas em solução salina a 0,8% e a concentração ajustada para  $DO_{570nm} = 0,52$  contendo  $2 \times 10^9$  UFC / mL (MARIANO et al., 2016). Foram testados dois métodos de inoculação para as bactérias endofíticas: irrigação do substrato e pulverização da parte aérea da planta. As inoculações com as bactérias endofíticas foram realizadas uma semana antes da inoculação do fitopatógeno com 100 mL da suspensão bacteriana. As bactérias endofíticas foram inoculadas uma semana antes em plantas de mandioca, para que elas pudessem se estabelecer e iniciar a colonização.

A inoculação de *X. axonopodis* pv. *manihotis* foi realizada pulverizando-se as folhas das plantas de mandioca utilizando uma suspensão bacteriana com concentração ajustada em espectrofotômetro para  $DO_{600} = 0,3$  contendo  $10^8$  UFC / mL. Com isso, as copas das plantas de mandioca foram pulverizadas até o ponto de escorrimento. Foi utilizada também uma testemunha inoculada apenas com o fitopatógeno. As plantas foram mantidas em casa de vegetação.

As avaliações foram realizadas com 2, 5, 7, 9, 12 e 14 dias após a inoculação com o fitopatógeno, através da determinação da severidade da doença, utilizando-se uma escala de notas de Azevedo (1977), com notas variando de 1 a 60% (Figura 13), os quais indicam os níveis de severidade da doença. Os valores obtidos de severidade serviram de base para o cálculo da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), proposta por Shaner & Finney (1977). O experimento foi inteiramente casualizado e os tratamentos foram organizados em esquema fatorial (7 x 2), sendo seis isolados endofíticos e um controle inoculado apenas com o fitopatógeno; e dois métodos de inoculação: irrigação e pulverização, com quatro repetições. Os dados do ensaio foram submetidos à análise da variância, com uso do programa SISVAR (FERREIRA, 2000). Os efeitos dos tratamentos foram comparados pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. Os dados obtidos pela comparação com o tratamento controle servirão para a escolha dos melhores antagonistas.



**Figura 13.** Escala diagramática para a determinação da severidade da mancha angular do feijoeiro, usada para quantificar a bacteriose em plantas de mandioca, causada por *X. axonopodis* pv. *manihotis*, indicando níveis de 1, 5, 10, 20, 40 e 60% de severidade da doença. Fonte: Azevedo (1997).

### 3.3. RESULTADOS

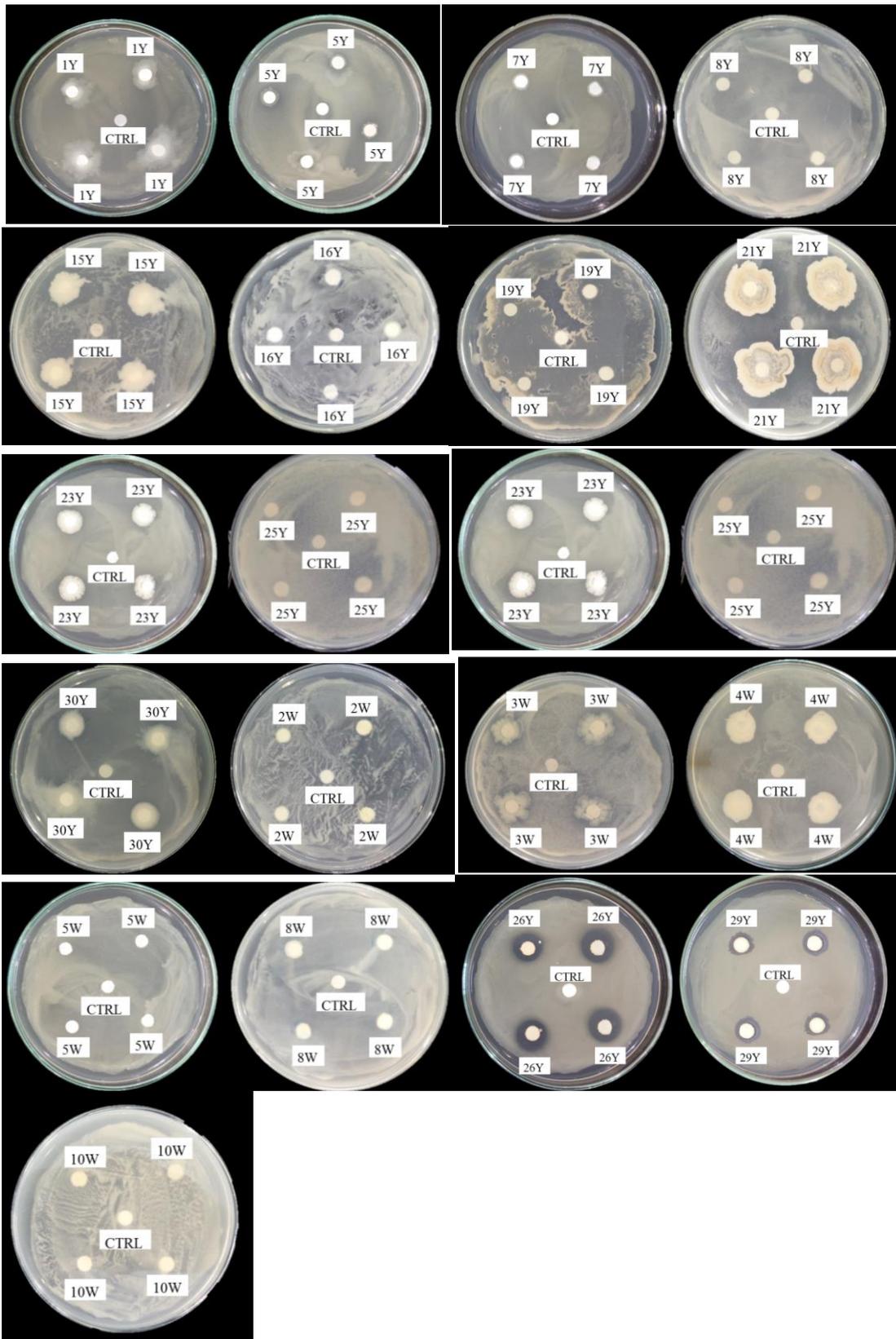
#### 3.3.1. Efeito *in vitro* dos isolados de bactérias endofíticas de mandioca sobre *X. axonopodis* pv. *manihotis*

De acordo com os nossos resultados, verificou-se que dos vinte e um isolados de bactérias endofíticas testados, apenas dois, no caso 26Y e 29Y (*K. pneumoniae*), apresentou efeito inibidor sobre *X. axonopodis* pv. *manihotis*, apresentando halos de inibição de 19,31 e 8,85 mm, respectivamente (Tabela 11, Figura 14 e 15), indicando que esses isolados possuem potencial para uso no controle biológico da bacteriose da mandioca.

**Tabela 11.** Média dos halos de inibição formada pelos isolados de bactérias endofíticas de mandioca *in vitro* à *X. axonopodis* pv. *manihotis*.

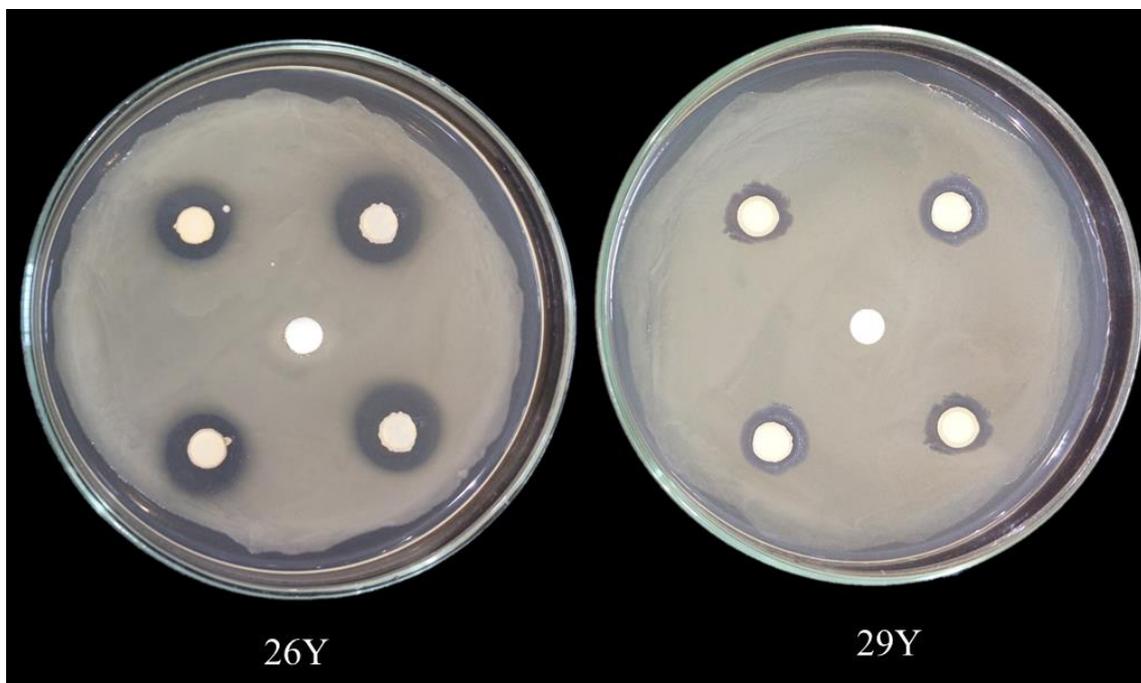
Tratamento	Halos de Inibição	Médias dos Halos de inibição (mm)
Controle	-	0 a
Isolado 1Y	-	0 a
Isolado 5Y	-	0 a
Isolado 7Y	-	0 a
Isolado 8Y	-	0 a
Isolado 15Y ( <i>B. cereus</i> )	-	0 a
Isolado 16Y ( <i>B. aryabhatai</i> )	-	0 a
Isolado 19Y ( <i>B. velezensis</i> )	-	0 a
Isolado 21Y ( <i>B. velezensis</i> )	-	0 a
Isolado 23Y ( <i>B. aryabhatai</i> )	-	0 a
Isolado 25Y	-	0 a
Isolado 26Y ( <i>K. pneumoniae</i> )	+	19,31 c
Isolado 27Y	-	0 a
Isolado 28Y	-	0 a
Isolado 29Y ( <i>K. pneumoniae</i> )	+	8,85 b
Isolado 30Y	-	0 a
Isolado 2W	-	0 a
Isolado 3W	-	0 a
Isolado 4W ( <i>B. aryabhatai</i> )	-	0 a
Isolado 5W	-	0 a
Isolado 8W	-	0 a
Isolado 10W	-	0 a

\*Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott Knott, em nível de 5% de significância. (+): Presença de halo de inibição; (-): Ausência de halo de inibição. \* Isolados de bactéria endofítica obtidos de raiz de mandioca amarela (Y-yellow) e branca (W-white).



**Figura 14.** Efeito dos isolados de bactérias endofíticas sobre o crescimento *in vitro* de *X. axonopodis* pv. *manihotis*. Foram realizadas quatro repetições para cada tratamento.

Controle (CTRL). \*Isolados de bactéria endofítica obtidos de raiz de mandioca amarela (Y-yellow) e branca (W-white).



**Figura 15.** Isolados de bactérias endofíticas 26Y e 29Y, identificados como *K. pneumoniae* cepa DSM 30104, inibindo o crescimento de *X. axonopodis* pv. *manihotis*, *in vitro*, em relação ao controle (sem halo de inibição). \*Isolados de bactéria endofítica obtidos de raiz de mandioca amarela (Y-yellow) e branca (W-white).

### 3.3.2. Bactérias endofíticas no controle de *X. axonopodis* pv. *manihotis*, em casa de vegetação

Para este experimento, foram testados os isolados 26Y e 29Y (*K. pneumoniae*) que apresentaram efeito inibidor sobre *X. axonopodis* pv. *manihotis*; e quatro isolados 15Y (*B. cereus*), 16Y, 23Y e 4W (*B. aryabhattai*) que apresentaram boas características de propriedades promotoras de crescimento de plantas.

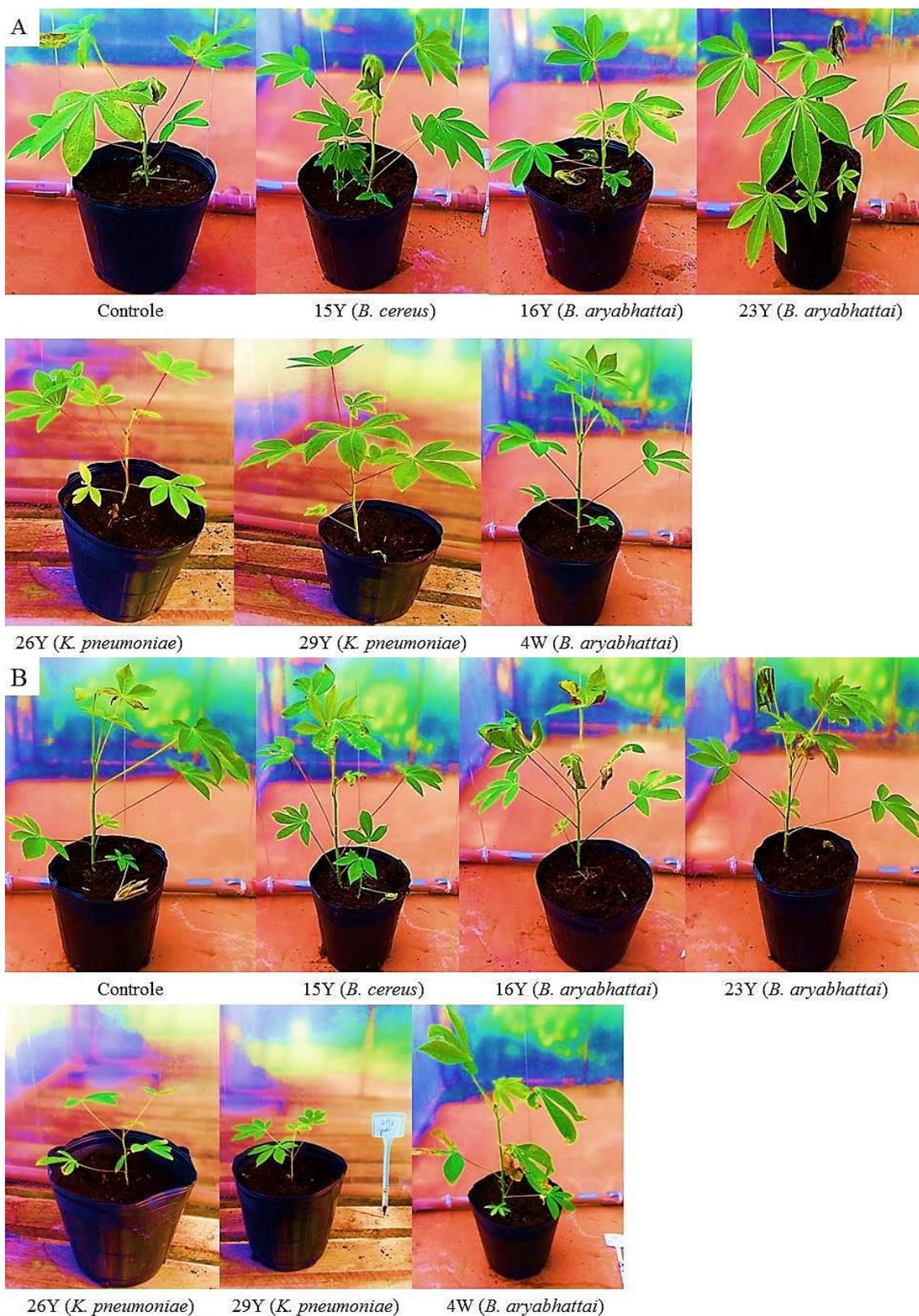
Na tabela 12, nós podemos observar que quando utilizado o método de inoculação por irrigação do substrato, os seis isolados de bactérias endofíticas testados reduziram a severidade da bacteriose da mandioca, diferindo significativamente do tratamento controle. No entanto, destacaram-se os isolados 15Y (*B. cereus*), 23Y, 4W (*B. aryabhattai*), 26Y e 29Y (*K. pneumoniae*), os quais proporcionaram controle acima de 40%, em relação ao tratamento controle (Tabela 12, Figura 16A).

No entanto, quando utilizado o método de inoculação por pulverização da parte aérea da planta, dos seis isolados de bactérias endofíticas testados, apenas quatro reduziram a severidade da bacteriose, diferindo significativamente do tratamento controle. No entanto, destacaram-se os isolados 15Y (*B. cereus*), 26Y e 29Y (*K. pneumoniae*), os quais proporcionaram controle acima de 40%, em relação ao tratamento controle (Tabela 12, Figura 16B). Por outro lado, os tratamentos com os isolados 23Y e 4W (*B. aryabhatai*) não foram eficaz no controle desta doença, utilizando este tipo de inoculação (Tabela 12, Figura 16B).

**Tabela 12.** Efeito de seis isolados de bactérias endofíticas, na redução de sintomas da bacteriose da mandioca, em casa de vegetação, utilizando dois métodos de inoculação: irrigação do substrato e pulverização foliar.

Tratamentos	AACPD <sup>1</sup>		Porcentagem de controle em relação à testemunha	
	Irrigação	Pulverização	Irrigação	Pulverização
15Y ( <i>B. cereus</i> )	142,30 c	87,35 b	41,90	42,31
16Y ( <i>B. aryabhatai</i> )	180,80 c	116,70 c	26,19	23,08
23Y ( <i>B. aryabhatai</i> )	93,33 b	151,60 d	61,90	0,00
4W ( <i>B. aryabhatai</i> )	70,95 b	151,70 d	70,95	0,00
26Y ( <i>K. pneumoniae</i> )	1,75 a	15,18 a	99,52	90,00
29Y ( <i>K. pneumoniae</i> )	1,75 a	12,83 a	99,52	91,54
Controle	245,00 d	151,80 d	0,00	0,00
C.V.	41,18	11,52	-	-

<sup>1</sup>AACPD- área abaixo da curva do progresso da doença. \*Médias seguidas por letras distintas nas colunas diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade. \*Isolados de bactéria endofítica obtidos de raiz de mandioca amarela (Y-yellow) e branca (W-white).



**Figura 16.** Controle biológico de *X. axonopodis* pv. *manihotis* por bactérias endofíticas de raízes sadias de mandioca. Foram utilizados dois métodos de inoculação: **(A)**

Irrigação do substrato e (B) Pulverização foliar. \*Isolados de bactéria endofítica obtidos de raiz de mandioca amarela (Y-Yellow) e branca (W-White).

### 3.4. DISCUSSÃO

A mandioca é cultivada em todas as regiões do Brasil, assumindo grande importância na alimentação humana e animal. A bacteriose causada por *X. axonopodis* pv. *manihotis* é uma das doenças mais importante da cultura que pode levar a morte das plantas. O uso de bactérias endofíticas é uma das estratégias de controle de fitopatógenos mais eficientes na agricultura atual (CIANCIO et al., 2019).

Os dados coletados em nosso trabalho demonstraram que dois isolados de bactérias endofíticas, 26Y e 29Y (*K. pneumoniae*), apresentaram forte atividade antagonista *in vitro* contra *X. axonopodis* pv. *manihotis*, agente causal da bacteriose em mandioca, e o seu potencial contra esse fitopatógeno foi confirmado na planta.

Foram testados dois métodos de inoculação, irrigação do substrato e pulverização foliar, para os isolados de bactérias endofíticas: 15Y (*B. cereus*), 16Y, 23Y, 4W (*B. aryabhatai*), 26Y e 29Y (*K. pneumoniae*), com o objetivo de conhecer a melhor forma de colonização dessas bactérias na planta de mandioca. Nós observamos que os isolados 26Y e 29Y (*K. pneumoniae*), se destacaram nos dois métodos de inoculação testados, os quais proporcionaram controle da bacteriose acima de 90%, em relação ao tratamento controle, mostrando que a redução da severidade da bacteriose em plantas de mandioca, proporcionadas por estes isolados, foi obtida por antagonismo direto.

Por outro lado, os isolados 15Y (*B. cereus*), 16Y, 23Y e 4W (*B. aryabhatai*) não apresentaram efeito inibidor, *in vitro*, sobre *X. axonopodis* pv. *manihotis*, no entanto, reduziram a severidade da bacteriose, em casa de vegetação, principalmente quando utilizado o método de inoculação por irrigação do substrato. A redução da severidade da bacteriose da mandioca, proporcionada por estes isolados em casa de vegetação, não foi obtida por antagonismo direto, podendo estar relacionada à resistência sistêmica induzida (ISR) na planta por estes antagonistas.

Steiner & Schonbeck (1995) propuseram alguns critérios para determinar se a resistência exibida pela planta foi de fato induzida, entre estes critérios está à ausência de efeitos tóxicos do agente indutor sobre o patógeno desafiante; a necessidade de

tempo entre a exposição ao indutor e a manifestação da resistência e a ausência de relação entre o nível de expressão de resistência e incremento na aplicação do agente indutor.

Os isolados 15Y (*B. cereus*), 16Y, 23Y e 4W (*B. aryabhatai*) podem ser chamadas de BPCPs, pois promoveram o crescimento em plantas de mandioca e além disso, produziram AIA, sideróforos e solubilizaram o fosfato de cálcio, *in vitro*. Os sideróforos podem inibir o desenvolvimento de fitopatógenos e também podem agir como um dos principais determinantes da ISR (HIIFTE et al., 1994; RAMAMOORTHY et al., 2001).

O controle biológico relacionado à indução de resistência já foi comprovado por BPCPs (JI et al., 2014; LIU et al., 2018; MATES et al., 2019; ). As BPCPs mais estudadas na ISR pertencem ao gênero *Pseudomonas* e *Bacillus* (DE VLEESSCHAUWER; HOFTE, 2009; KLOEPPER et al., 2004). Mates et al. (2019) verificaram a ocorrência da ISR em tomate contra *Xanthomonas perforans*, utilizando um isolado de *Bacillus*. Assim como, Halfeld-Vieira et al. (2006) também verificaram em seu trabalho, a ocorrência de ISR em tomateiro contra *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* utilizando um isolado de *B. cereus* proveniente do filoplano de tomateiro sadio. Além disso, Kloepper et al. (2004) observaram que várias espécies de *Bacillus* spp. induziram a resistência sistêmica em plantas de tomate, pimentão, melão, melancia, beterraba, abóbora e pimenta, promovendo a proteção contra fungos e bactérias fitopatogênicas. De acordo com Van Lonn et al. (1998) na situação de resistência sistêmica induzida (ISR), proporcionada por bactérias endofíticas, supõe-se que o microrganismo produza um sinal translocável que induz proteção em tecidos distantes da raiz onde o antagonista foi introduzido.

Por outro lado, os isolados endofíticos pertencentes ao gênero *Klebsiella* (26Y e 29Y) inibiram o crescimento de *X. axonopodis* pv. *manihotis*, *in vitro*, e em casa de vegetação proporcionaram um controle da doença acima de 90% nos dois métodos de inoculação testados. Ji et al. (2014) verificaram que isolados de *Klebsiella* atuaram no controle biológico de doenças fúngicas em plantas de arroz, reduzindo a severidade da queima da bainha causada por *Rhizoctonia solani* Kuhn, além de promover o crescimento nestas espécies.

Embora, a melhor maneira de controlar a doença da bacteriose seja a utilização de variedades resistentes de mandioca, os endófitos utilizados em nosso estudo foram considerados eficazes. Contudo, a inoculação por irrigação do substrato com os agentes de biocontrole testados mostrou-se mais eficiente. Este tipo de inoculação favorece a colonização radicular por estes isolados e a subsequente inibição do fitopatógeno.

### **3.5. CONCLUSÃO**

Nossos resultados mostraram que os isolados de *B. cereus* (15Y), *B. aryabhatai* (23Y e 4W) e *K. pneumoniae* (26Y e 29Y) podem ser usados como um potencial agente de biocontrole para *X. axonopodis* pv. *manihotis*. Até onde sabemos, este estudo é o primeiro a relatar o isolamento de bactérias endofíticas de raízes sadias de mandioca com o potencial de controlar a bacteriose da mandioca na Amazônia Oriental.

### **AGRADECIMENTOS**

Agradecemos a Fundação Amazônia de Amparo a Estudos e Pesquisas do Pará (FAPESPA) e a Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa e apoio financeiro; a Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), Universidade Federal do Pará (UFPA) e a Embrapa Amazônia Oriental pela infraestrutura.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, C. O.; FUKUDA, W. M. G.; CARDOSO, C. E. L.; FUKUDA, C.; SOUZA, J. S.; VASCONCELOS, O. L., 2009. Avaliação preliminar de impacto social de cultivar de mandioca resistente à bacteriose: o caso da Formosa no Estado da Bahia. **Revista Raízes e Amidos Tropicais**, Botucatu, v. 5, p.1020-1025.
- AZEVEDO, L.A.S., 1997. **Manual de quantificação de doenças de plantas**. São Paulo: Luiz Antonio Siqueira de Azevedo, p. 114.
- CHITHRASHREE, A. C., NAYAKA, S. C., REDDY, M. S., & SRINIVAS, C., 2011. Plant growth-promoting rhizobacteria mediate induced systemic resistance in rice against bacterial leaf blight caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **Biological Control**, v. 59, n. 2, p. 114-122.
- CHOI, H. K., SONG, G. C., YI, H. S., & RYU, C. M., 2014. Field evaluation of the bacterial volatile derivative 3-pentanol in priming for induced resistance in pepper. **Journal of chemical ecology**, v. 40, n. 8, p. 882-892.
- CIANCIO, A., PIETERSE, C. M., & MERCADO-BLANCO, J., 2019. Harnessing Useful Rhizosphere Microorganisms for Pathogen and Pest Biocontrol—Second Edition. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p.1935.
- DAUNGFU, O., YOUNPENSUK, S., LUMYONG, S., 2019. Endophytic Bacteria Isolated from Citrus Plants for Biological Control of Citrus Canker in Lime Plants. **Tropical life sciences research**, v.30, n.1, p.73.
- DE VLEESSCHAUWER, D., & HÖFTE, M., 2009. Rhizobacteria-induced systemic resistance. **Advances in botanical research**, v. 51, p. 223-281.
- FERREIRA, D.F., 2010. **SISVAR, Sistema de análise de variância**. Versão 5.3. Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- HALFELD-VIEIRA, B. D. A., VIEIRA JÚNIOR, J. R., ROMEIRO, R. D. S., SILVA, H. S. A., BARACAT-PEREIRA, M. C., 2006. Induction of systemic resistance in tomato by the autochthonous phylloplane resident *Bacillus cereus*. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 41, n. 8, p. 1247-1252.
- HALLMANN, J., QUADT-HALLMANN, A., MAHAFFEE, W. F., KLOEPPER, J.W., 1997. Endófitos bacterianos em culturas agrícolas. **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, n.10, p.895-914.
- HIIFTE, M., VANDE WOESTYNE, M., & VERSTRAETE, W., 1994. Role of siderophores in plant growth promotion and plant protection by fluorescent pseudomonads. **Biochemistry of Metal Micronutrients in the Rhizosphere**, p. 81-92.
- HOLTSMARK, I., EIJSINK, V. G., & BRURBERG, M. B., 2008. Bacteriocins from plant pathogenic bacteria. **FEMS microbiology letters**, v. 280, n. 1, p. 1-7.

HYAKUMACHI, M., NISHIMURA, M., ARAKAWA, T., ASANO, S., YOSHIDA, S., TSUSHIMA, S., TAKAHASHI, H., 2013. *Bacillus thuringiensis* suppresses bacterial wilt disease caused by *Ralstonia solanacearum* with systemic induction of defense-related gene expression in tomato. **Microbes and environments**, ME12162.

ISHIDA, A., CARDOSO, S., ALMEIDA, C., NORONHA, A. D. S., CUNHA, E., 2016. Incidência da bacteriose da mandioca (*Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*) no Estado do Pará. **Embrapa Amazônia Oriental-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento** (INFOTECA-E).

ISHIDA, A. K. N., SOUZA, R. M. D., RESENDE, M. L. V. D., ZACARONI, A. B., VILAS BÔAS, C. H., & SOUZA, J. T. D., 2008. Rizobactérias no controle da mancha angular do algodoeiro. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 1, p. 149-156.

JI, S. H., GURURANI, M. A., CHUN, S. C., 2014. Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic diazotrophic bacteria from Korean rice cultivars. **Microbiological Research**, v. 169, n. 1, p. 83-98.

KADO, C. I., HESKETT, M. G., 1970. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, v. 60, n. 6, p. 969-976.

KLOPPER, J. W., RYU, C. M. AND ZHANG, S., 2004. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. **Phytopathology**, v. 94, p. 1259-1266.

LIU, Y., ZHU, A., TAN, H., CAO, L., ZHANG, R., 2019. Engineering banana endosphere microbiome to improve *Fusarium* wilt resistance in banana. **Microbiome**, v. 7, n. 1, p. 74.

LIU, D., CHEN, L., ZHU, X., WANG, Y., XUAN, Y., LIU, X., DUAN, Y., 2018. *Klebsiella pneumoniae* SnebYK mediates resistance against *Heterodera glycines* and promotes soybean growth. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1134.

LÓPEZ, C., BERNAL, A., 2012. Cassava bacterial blight: Using genomics for the elucidation and Management of an old Problem. **Tropical Plant Biology**, v.5, p.117–126.

MARIANO, R. D. L. R., SOUZA, E. B., 2016. **Manual de práticas em fitobacteriologia**. Recife: UFRPE.

MARIN, V. R., FERRAREZI, J. H., VIEIRA, G., SASS, D. C., 2019. Recent advances in the biocontrol of *Xanthomonas* spp. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 5, p. 72.

MATES, A. D. P. K., DE CARVALHO PONTES, N., DE ALMEIDA HALFELD-VIEIRA, B., 2019. *Bacillus velezensis* GF267 as a multi-site antagonist for the control of tomato bacterial spot. **Biological Control**, v. 137, p. 104013.

MURASHIGE, T., SKOOG, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-479.

NASCIMENTO, S. B., LIMA, A. M., BORGES, B. N., SOUZA, C. R. B., 2015. Endophytic bacteria from *Piper tuberculatum* Jacq.: isolation, molecular characterization, and in vitro screening for the control of *Fusarium solani* f. sp *piperis*, the causal agent of root rot disease in black pepper (*Piper nigrum* L.). **Genetics and Molecular Research**, v.14, p.7567-7577.

PARMAR, A., STURM, B., HENSEL, O., 2017. **Culturas que alimentam o mundo: produção e aprimoramento de mandioca para alimentos, rações e usos industriais.** **Segurança Alimentar**, v. 9, n. 5, p. 907-927.

PIETERSE, C.M.J., ZAMIOUDIS, C., BERENDSEN, R.L., WELLER, D.M., VAN WEES, S.C.M., BAKKER, P.A.H.M., 2014. Induced systemic resistance by beneficial microbes. **Annual Review of Phytopathology**.

RAMAMOORTHY, V., VISWANATHAN, R., RAGUCHANDER, T., PRAKASAM, V., & SAMIYAPPAN, R., 2001. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. **Crop protection**, v. 20, n. 1, p. 1-11.

SHANER, G., & FINNEY, R. E., 1977. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. **Phytopathology**, v. 67, n. 8, p. 1051-1056.

SOARES, M. A., LI, H., BERGEN, M., SILVA, J. M., KOWALSKI, K. P., WHITE, J. F., 2016. Functional role of an endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* in enhancing growth and disease protection of invasive English ivy (*Hedera helix* L.). **Plant and Soil**, v.405, n.1–2, p.107–123.

STEINER, U., & SCHÖNBECK, F., 1995. Induced disease resistance in monocots. In *Induced resistance to disease in plants* (pp. 86-110). **Springer**, Dordrecht.

TEOTIA, P., KUMAR, M., PRASAD, R., SHARMA, S., KUMAR, V., 2017. Endophytic Probiotics and plant health: toward a balanced accost. In: KUMAR, A. et al. *Probiotics plant health*. USA: **Springer** International, p.383-399.