

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO - UEMA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROECOLOGIA
CURSO DE DOUTORADO EM AGROECOLOGIA

PEDRO IVO MENEZES BITU

***Pseudomonas aeruginosa*: FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO, PROMOÇÃO
DE CRESCIMENTO, SANIDADE E PRODUÇÃO DE ARROZ DE TERRAS ALTAS
NO ESTADO DO MARANHÃO**

São Luís - MA
2020

PEDRO IVO MENEZES BITU

Engenheiro Agrônomo

Mestre em Agroecologia

***Pseudomonas aeruginosa*: FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO, PROMOÇÃO
DE CRESCIMENTO, SANIDADE E PRODUÇÃO DE ARROZ DE TERRAS ALTAS
NO ESTADO DO MARANHÃO**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Agroecologia da Universidade Estadual do Maranhão, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Agroecologia.

Orientadora: Prof^a. Dr.^a. Antônia Alice Costa Rodrigues

São Luís – MA
2020

Bitu, Pedro Ivo Menezes.

Pseudomonas aeruginosa: fixação biológica do nitrogênio, promoção de crescimento, sanidade e produção de arroz de terras altas no estado do Maranhão / Pedro Ivo Menezes Bitu. – São Luís, 2020.

96 f

Tese (Doutorado) – Curso de Agroecologia, Universidade Estadual do Maranhão, 2020.

Orientador: Profa. Dra. Antônia Alice Costa Rodrigues.

1.Oryza sativa. 2.Assimilação de nitrogênio. 3.Bactérias diazotróficas.
I.Título

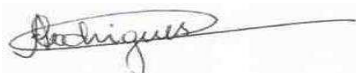
***Pseudomonas aeruginosa*: FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO, PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO, SANIDADE E PRODUÇÃO DE ARROZ DE TERRAS ALTAS NO ESTADO DO MARANHÃO**

PEDROIVO MENEZES BITU

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Agroecologia da Universidade Estadual do Maranhão, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Agroecologia.

Aprovado na defesa em: 25/ 05/ 2020

BANCA EXAMINADORA



Prof.ª. Dr.ª. Antônia Alice Costa Rodrigues (Orientadora)
Universidade Estadual do Maranhão- UEMA



Dr.ª. Erlen Keila Candido e Silva
Universidade Estadual do Maranhão- UEMA



Prof.ª. Dr.ª. Thais Roseli Corrêa
Universidade Estadual do Maranhão- UEMA



Prof. Dr. Altamiro Souza de Lima Ferraz Junior
Universidade Estadual do Maranhão- UEMA



Prof.ª. Dr.ª. Ivaneide de Oliveira Nascimento
Universidade Estadual do Maranhão- UEMA

DEDICO

Aos meus queridos pais, Júlio Bastos Bitu e Ana Maria Menezes Bitu e minha irmã Juliana Menezes Bitu, que com amor, carinho, e dedicação me proporcionam dias melhores.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela oportunidade.

Aos meus pais Júlio Bastos Bitu e Ana Maria Alves Menezes Bitu e minha irmã Juliana Menezes Bitu, por todo apoio e incentivo durante esta etapa.

A todo corpo docente do Programa de Pós Graduação em Agroecologia, em especial à minha orientadora Antônia Alice Costa Rodrigues por toda dedicação e orientação de fato. Estendo os agradecimentos à secretária do curso, Rayane, por sua compreensão e disponibilidade.

A minha noiva Larissa de Paula Viana da Silva por toda compreensão apoio e auxílio durante o processo.

Aos amigos do laboratório de Fitopatologia, em especial, Leonardo Gois pelo auxílio na identificação molecular, Rafael Ribeiro pelo auxílio laboratorial e Francisco de Assis pelo apoio em campo.

A toda turma do curso de Doutorado 2016.

A todos que direta e indiretamente contribuíram para o desenvolvimento da pesquisa.

*“Grandes coisas fez o Senhor por nós, pelas
quais estamos alegres”.*

Salmos 123:3

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE SIGLAS.....	xii
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
Capítulo 1.....	15
1.INTRODUÇÃO GERAL.....	16
2.REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
2.1. A Cultura do Arroz.....	17
2.1.1. Importância socioeconômica do arroz.....	18
2.2.2. As principais doenças do arroz.....	19
2.2. Interação Planta Microrganismo.....	21
2.2.1 Fixação biológica do nitrogênio (FBN).....	23
2.2.2. Promoção de crescimento vegetal.....	25
2.2.3. Microrganismos como agentes de biocontrole de doenças.....	27
2.3. Aspectos Gerais do Gênero <i>Pseudomonas</i>.....	28
REFERÊNCIAS.....	30
Capítulo 2.....	36

POTENCIAL DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i> NA ATIVIDADE DA NITROGENASE E PRODUÇÃO DE ÁCIDO INDOL ACÉTICO	36
Sumário.....	37
Introdução.....	37
Resultados e discussão.....	39
<i>Identificação molecular de isolados.....</i>	<i>39</i>
<i>Atividade de redução do acetileno (ARA).....</i>	<i>40</i>
Isolamento e armazenamento de bactérias obtidas de folhas e raízes de arroz (<i>Oryza sativa</i> L.).....	39
<i>Identificação molecular de isolados.....</i>	<i>44</i>
<i>Extração do DNA.....</i>	<i>44</i>
<i>Amplificação, purificação e sequenciamento do gene 16S rDNA.....</i>	<i>45</i>
<i>Análise das Sequências do Gene 16S rDNA.....</i>	<i>46</i>
<i>Análises Filogenéticas do gene 16S rDNA.....</i>	<i>47</i>
<i>Atividade de redução do acetileno (ARA).....</i>	<i>47</i>
<i>Avaliação da produção de ácido indol acético in vitro (AIA).....</i>	<i>48</i>
Referências.....	49
Capítulo 3.....	57
ASPECTOS AGRONÔMICOS, PRODUTIVOS E SANITÁRIOS DO ARROZ DE TERRAS ALTAS INOCULADO COM <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	57
ABSTRACT.....	58
INTRODUÇÃO.....	59
MATERIAL E MÉTODOS.....	60
<i>Área de estudo.....</i>	<i>60</i>
<i>Delineamento experimental e desenvolvimento da pesquisa.....</i>	<i>60</i>
<i>Parâmetros avaliados.....</i>	<i>62</i>
<i>Análise estatística.....</i>	<i>62</i>
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	63

CONCLUSÃO.....	73
REFERÊNCIAS.....	73
Capítulo 4.....	78
CONCLUSÕES GERAIS.....	79
ANEXO 1. Normas de formatação da revista Eviromental Microbiology.....	80
ANEXO 2. Normas de formatação da revista Acta Scientiarum Agronomy.....	84

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Capítulo 1

Figura 1. Estádios fenológicos da cultura do arroz.....	17
Figura 2. Aspecto visual de plantas de arroz acometidas das doenças Brusone (A), Mancha Parda (B), Mancha Estreita (C), Escaldadura (D) e Mancha Foliar (E).....	20
Figura 3. Interações das bactérias na promoção do crescimento das plantas e da sanidade vegetal.....	22
Figura 4. O ciclo do Nitrogênio (N).....	24
Figura 5. Aspecto visual do crescimento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	29

Capítulo 2

Figura 1. Árvore filogenética representada com base na similaridade entre as sequências obtidas e organismos de referência dos isolados de <i>Pseudomonas</i> derivados de sequências do gene de 16SrDNA.....	54
Figura 2. Produção de ácido indol acético (AIA) de isolados de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	56

Capítulo 3

Figura 1. Efeito da inoculação de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> sobre a severidade das doenças mancha parda, mancha estreita, mancha foliar e escaldadura em plantas de arroz sob cultivo em terras altas em Santa Rita - MA, Brasil.....	71
Figura 2. Efeito da inoculação de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> sobre a severidade das doenças mancha parda, mancha estreita, mancha foliar e escaldadura em plantas de arroz sob cultivo em terras altas em Pirapemas.....	72

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

Tabela 1. Lista de código dos isolados bacterianos coletados em municípios maranhenses sob cultivo de arroz terras altas 53

.....
Tabela 2. Atividade da Nitrogenase e Produção de Etileno dos 15 isolados bacterianos identificados como *Pseudomonas aeruginosa*, obtidos de plantas de arroz, sob cultivo terras altas no Maranhão..... 55

Capítulo 3

Tabela 1. Caracterização química do solo das áreas experimentais em Santa Rita e Pirapemas, a profundidade de 20 cm..... 60

Tabela 2. Valores médios de altura total e taxa de germinação de plantas de arroz, cultivar primavera, 5 dias após o plantio, em Santa Rita – MA, Brasil..... 63

Tabela 3. Valores médios de altura total e taxa de germinação de plantas de arroz, cultivar primavera, 5 dias após o plantio, em Pirapemas – MA, Brasil..... 64

Tabela 4. Efeito de *Pseudomonas aeruginosa* sobre aspectos produtivos e agronômicos de plantas de arroz sob cultivo de terras altas em Santa Rita – MA, Brasil..... 65

Tabela 5. Efeito de *Pseudomonas aeruginosa* sobre aspectos produtivos e agronômicos de plantas de arroz sob cultivo de terras altas em Pirapemas – MA, Brasil..... 66

Tabela 6. Teor de Nitrogênio na parte aérea e grãos de arroz cultivar BRS Primavera sob sistema de cultivo terras altas em Santa Rita – MA, Brasil..... 67

Tabela 7. Teor de Nitrogênio na parte aérea e grãos de arroz cultivar BRS Primavera sob sistema de cultivo terras altas em Pirapemas – MA, Brasil..... 68

LISTA DE SIGLAS

AIA	Ácido Indol Acético
ARA	Atividade de Redução do Acetileno
AT	Altura Total
B1	Bactéria 1
B2	Bactéria 2
DAP	Dias Após o Plantio
FBN	Fixação Biológica de Nitrogênio
GER %	Percentual de Germinação
G INT %	Percentual de Grãos Inteiros
G/PL	Grão por Planta
M1000	Massa de mil grãos
MSPAA	Matéria Seca da Parte Aérea da Planta na Antese
MSPAM	Matéria Seca da Parte Aérea da Planta na Maturação
N Pan	Número de Panículas
TN	Teor de Nitrogênio

RESUMO

Avaliamos a capacidade da espécie *Pseudomonas aeruginosa* quanto a: fixação do nitrogênio atmosférico, promoção de crescimento, sanidade e produção de arroz, sob sistema de cultivo em terras altas, no Maranhão, Brasil. Foram realizadas coletas uniformes de plantas de arroz de terras altas, nos municípios maranhenses: São Mateus, Igarapé do Meio, Bacabal, Belágua, Viana, Itapecuru, São Bento, Presidente Juscelino, São Benedito do Rio Preto, Urbano Santos, Matinha, Arari e Governador Newton Bello. Em seguida, foi realizado o isolamento bacteriano das folhas e raízes do arroz, para posterior identificação molecular dos isolados. A atividade da enzima nitrogenase (ARA) e a produção de ácido indol acético dos isolados, foram avaliadas respectivamente pelo método de redução do acetileno e pelo método colorimétrico. Para os experimentos de campo, foram considerados apenas os dois isolados de maior atividade da nitrogenase. Foram instalados dois experimentos em dois anos consecutivos, ambos em blocos ao acaso, com sete tratamentos e quatro repetições em Santa Rita-MA (2018), e oito tratamentos e quatro repetições em Pirapemas-MA (2019). Os tratamentos constituíram-se da microbiolização de sementes de arroz cultivar primavera, com duas cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, com e sem associação a pulverização da solução bacteriana e adubação NPK. Em ambos os experimentos, os tratamentos controle foram designados como testemunha absoluta (sem microbiolização e adubo) e adubada. Foram obtidos 33 isolados bacterianos de arroz, todos identificados como *Pseudomonas aeruginosa*. Os isolados identificados como *P. aeruginosa* apresentaram proximidade filogenética com as espécies *Comamonas sediminis*, *Stenotrophomonas tumulicola*, *S. maltophilia*, *Pseudomonas hibscicola*, *Raoultella ornithinolytica*, *Celvibrio japonicus* e *Escherichia coli*. Comprovamos a atividade da enzima nitrogenase em 15 dos isolados de *P. aeruginosa*, 6 com ARA maior que 1, com máxima de 26,66 nmolC₂H₄/h. 6 isolados com ARA maior que 1 utilizados, produziram ácido indol acético, com variações de 18,00 a 18,23 µg.L⁻¹. Constatou-se efeito significativo da bactéria sobre a germinação (%) e altura inicial das plantas (cm), massa de 1000 grãos (g), percentual de grãos inteiros, matéria seca da planta (g), número de panículas, altura total no final do ciclo (m), teor de nitrogênio na parte aérea e grãos de arroz, e redução da severidade das doenças mancha parda, mancha foliar e escaldadura. Os tratamentos sob influência de *P. aeruginosa* foram iguais ou superiores à testemunha adubada evidenciando o potencial de uso da bactéria como alternativa econômica e ecológica ao uso excessivo de fertilizantes e pesticidas.

Palavras-chave: *Oryza sativa*. Assimilação de nitrogênio. Bactérias diazotróficas

ABSTRACT

We evaluated the capacity of the species *Pseudomonas aeruginosa* in terms of: fixing atmospheric nitrogen, promoting growth, health and rice production, under a system of cultivation in highlands, in Maranhão, Brazil. Initially, uniform collections of upland rice plants were carried out in the municipalities of Maranhão: São Mateus, Igarapé do Meio, Bacabal, Belágua, Viana, Itapecuru, São Bento, Presidente Juscelino, São Benedito do Rio Preto, Urbano Santos, Matinha, Arari and Governador Newton Bello. Then, bacterial isolation of the leaves and roots of rice was carried out, for later identification of the isolates. The activity of the nitrogenase enzyme and the production of indole acetic acid of the isolates were evaluated respectively by the acetylene reduction method and by the colorimetric method. For field experiments, only the two isolates with the highest nitrogenase activity were considered. Two experiments were installed in two consecutive years, both in randomized blocks, with seven treatments and four repetitions in Santa Rita-Ma (2018), and eight treatments and four repetitions in Pirapemas-MA (2019). The treatments consisted of the microbiolization of rice seeds cultivar primavera, with two strains of *Pseudomonas aeruginosa*, with and without association with the spraying of the bacterial solution and NPK fertilization. In both experiments, the control treatments were designated as absolute control (without microbiolization and fertilizer) and fertilized. 33 bacterial rice isolates were obtained, all identified as *Pseudomonas aeruginosa*. The isolates identified as *P. aeruginosa* showed phylogenetic proximity to the species *Comamonas sediminis*, *Stenotrophomonas tumulicula*, *S. maltophilia*, *Pseudomonas hibscicola*, *Raoultella ornithinolytica*, *Celvibrio japonicus* and *Escherichia coli*. We verified the activity of the nitrogenase enzyme in 15 of the *P. aeruginosa* isolates, 6 with ARA greater than 1, with a maximum of 26, 66 nmolC₂H₄ / h. 6 isolates with ARA greater than 1 used, produced indole acetic acid, with variations from 18.00 to 18.23 µg.L⁻¹. There was a significant effect of the bacteria on germination (%) and initial height of the plants (cm), mass of 1000 grains (g), percentage of whole grains, dry matter of the plant (g), number of panicles, total height in the end of the cycle (m), nitrogen content in the aerial part and grains of rice and reduction in the severity of diseases brown spot, leaf spot and scald. The treatments under the influence of *P. aeruginosa* were equal or superior to the fertilized control, showing the potential of using the bacterium as an economical and ecological alternative to the excessive use of fertilizers and pesticides.

Key words: *Oryza sativa*. Assimilation of nitrogen. Diazotrophic bacteria.

CAPÍTULO 1

***Pseudomonas aeruginosa*: FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO, PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO, SANIDADE E PRODUÇÃO DE ARROZ DE TERRAS ALTAS NO ESTADO DO MARANHÃO**

1. INTRODUÇÃO GERAL

O arroz (*Oryza sativa* L.) é uma cultura de relevante importância socioeconômica, servindo como alimento básico para cerca de 50 % da população humana em todo o mundo (ZHONG et al., 2019). Esta cultura caracteriza-se por apresentar alta demanda por nutrientes, sendo o nitrogênio um dos principais fatores limitantes à sua produtividade. Este elemento tem efeito direto sobre o crescimento das plantas, florescimento e produtividade de grãos. A alta eficiência de seu uso é desejável para as cultivares de arroz, especialmente nos sistemas agrícolas com baixo emprego de tecnologia (FIDELIS et al., 2012), como ocorre na agricultura familiar dos trópicos úmidos.

Dessa forma, o manejo do nitrogênio tem sido uma das práticas agrícolas mais estudadas no sentido de melhorar a sua eficiência de uso, pois apesar de abundante na natureza, a maior parte do nitrogênio do solo se encontra em combinações orgânicas, não assimiláveis pelos vegetais (OKUMURA et al., 2011). Vale ressaltar ainda, que a adubação nitrogenada, além de onerar os custos da produção, é um dos principais contribuintes da poluição ambiental, principalmente por contaminação do lençol freático (CARVALHO; ZABOT, 2012).

Entre as principais alternativas para aumentar a eficiência do uso de fertilizantes químicos, visando à redução da quantidade aplicada em ambientes de produção agrícola, está o uso de inoculantes que contêm bactérias diazotróficas (SPAOLAOR et al., 2016). Tais bactérias, além de fixar nitrogênio atmosférico, podem promover o crescimento vegetal, bem como induzir à resistência a fitopatógenos (BALDOTTO et al., 2010).

Estudos recentes, apontam a associação de espécies do gênero *Pseudomonas*, com sistema radicular de plantas de arroz, destacando-as como microrganismos que além de fixar nitrogênio atmosférico, também são capazes de produzir ácido indol acético (AIA) e atividades de protease, catalase e urease, contribuindo de forma significativa com melhorias nos aspectos sanitários e produtivos das plantas (FERREIRA et al., 2014; PHAM et al., 2017; GUPTA et al., 2020). Assim, a inoculação de espécies deste gênero, pode ser uma alternativa ecológica e economicamente viável à adubação nitrogenada em diferentes culturas, inclusive no arroz.

Com base neste enfoque, o objetivo da pesquisa foi avaliar a capacidade da espécie *Pseudomonas aeruginosa*, na fixação do nitrogênio atmosférico, promoção de crescimento, sanidade e produção de arroz, sob sistema de cultivo terras altas, no Maranhão.

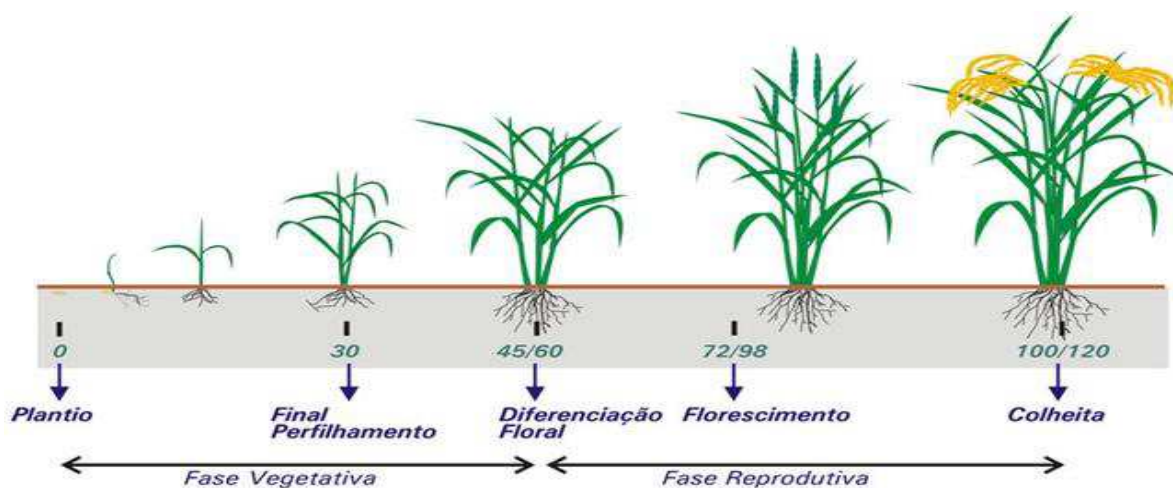
2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. A Cultura do Arroz

O arroz (*Oryza sativa* L.) ao longo do seu processo evolutivo adaptou-se aos mais variados ambientes, com diferentes condições edafoclimáticas ao redor do mundo. O grão está entre os principais cereais consumidos no mundo, principalmente nos países em desenvolvimento, sendo cultivado em diferentes ecossistemas, e em temperaturas e regimes hídricos distintos (TERRA, 2013).

Esta espécie é uma monocotiledônea, pertencente à família Poaceae, a qual abriga em torno de 23 espécies. O arroz é uma herbácea que apresenta ramificações secundárias nas panículas, espiguetas persistentes no pedicelo e lígulas com até 10 mm de comprimento. O sistema radicular da planta é constituído por numerosas raízes fibrosas, longas e finas que permitem sua rápida fixação no solo. De modo geral, o desenvolvimento do arroz ocorre em três etapas: fase vegetativa, que é o período compreendido entre a germinação da semente e a iniciação da panícula; fase reprodutiva, que compreende da iniciação da panícula ao florescimento, normalmente, requer 35 dias em condições tropicais; e fase de maturação que ocorre do florescimento à maturação dos grãos, durando de 30 a 35 dias, com estádios fenológicos distintos (Figura 1) (BORÉM; RANGEL, 2015).

Figura 1. Estádios fenológicos da cultura do arroz.



Fonte: adaptado de COUNCE et al. (2000), apud PINHEIRO e HEINEMANN [s.d.].

Existem dois tipos principais de sistemas de cultivo de arroz no Brasil, o sistema de cultivo de terras altas ou sequeiro, que se localiza nas savanas do país, possui grande relevância socioeconômica na América do Sul (HEINEMANN et al., 2019), e o sistema de arroz irrigado ou de terras baixas, em sua grande maioria localizado na região sul do país, suprindo cerca de 80 % da demanda brasileira pelo arroz em aproximadamente 6 milhões de hectares (THEISEN et al., 2017).

No Maranhão, o arroz é cultivado em praticamente todos os municípios, com predomínio do sistema de sequeiro, responsável por cerca de 95 % da produção e por 98 % da área cultivada (ZONTA; SILVA, 2014). Dentre as características da orizicultura maranhense, destaca-se a alta dispersão da produção de arroz, quando comparado a outros estados brasileiros. O arroz produzido no estado do Maranhão, em sua quase totalidade, encontra-se em lavouras com menos de 50 ha e com uso de baixa tecnologia (BUOSI et al., 2013).

2.1.1 Importância socioeconômica do arroz

O arroz é cultivado em todos os continentes do mundo, destacando-se em primeiro lugar o continente asiático, responsável por aproximadamente 82,1% da produção mundial, seguido dos continentes africano com 4,75 %, americano com 4,62 %, europeu com 0,52 % e oceânico com 0,1 % (FAO, 2018).

Ainda segundo dados da FAO (2018), a espécie está entre os três cereais mais importantes para a economia global, ocupando o segundo lugar em produção e extensão de área cultivada, com aproximadamente 30% da produção de cereais no mundo. Os dados mais recentes para produção mundial da cultura constam em 782 milhões de toneladas no ano de 2018, com área plantada de 167,1 milhões de hectares e produtividade média de 4,7 T ha⁻¹.

O Brasil ocupa a sétima posição no ranking mundial de produção de arroz, com 11,7 milhões de toneladas em 2018 (FAO, 2018). A região Nordeste é a terceira maior produtora de arroz no país, com 525,9 mil toneladas na safra 2017/2018 e 323 mil toneladas na safra 2018/2019. Dentre os estados produtores da região Nordeste o Maranhão alcançou a primeira posição na safra 2017/2018, contribuindo com 320,9 mil toneladas, equivalentes a 61,02% da produção na região. Na safra 2018/2019 o estado manteve-se na primeira posição com produção de 167,25 mil toneladas, representando 31,80% da produção do Nordeste. (CONAB, 2019)

A crescente demanda por arroz, associada à importância socioeconômica do cereal e à crise ambiental mundial, justifica o enfoque dos estudos para produção sustentável da cultura,

com menor utilização de insumos externos e favorecimento das interações benéficas dentro dos agroecossistemas produtivos.

As doenças que acometem a espécie *O.sativa* constituem-se na principal causa de danos econômicos à orizicultura, com redução expressiva da produtividade (NALLEY, et al.,2016). Em função da importância econômica da cultura e visando a redução de impactos ambientais e custos de produção, o manejo alternativo de doenças, através do uso de bactérias diazotróficas, como biopesticidas, tem ganhado espaço na orizicultura (YASMIN et al., 2016; SOUZA JÚNIOR et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2019).

2.1.2. As principais doenças do arroz

As doenças causadas por fungos são os principais problemas da orizicultura mundial, uma vez que, em todas as fases de desenvolvimento, o arroz pode ser afetado por fungos que reduzem a produtividade e comprometem a qualidade dos grãos, bem como a qualidade fisiológica das sementes (SANTOS et al., 2011). A incidência e severidade das doenças dependem da ocorrência do patógeno virulento, do ambiente favorável e da suscetibilidade da cultivar (SANTOS; SANTIAGO, 2014).

Dentre as principais doenças que acometem a espécie *O. sativa* causando danos econômicos, destacam-se a Brusone (*Pyricularia grisea* fase imperfeita (anamorfo) (Cooke) Sacc), cuja forma perfeita (teleomorfo) é *Magnaporthe grisea* (T.T Herbet) M.E.Barr, Mancha Parda (*Bipolaris oryzae* (Breda de Haan) Shoemaker [*Cochiobolus miyabeanus* (Ito & Kuribayashi) Drechsler & Dastur]), Mancha Estreita (*Sphaerulina oryzina* K. Hara [*Cercospora oryzae* Miyake, syn. *Cercospora janseana* (Racib.) O. Constant.]), Escaldadura (*Gerlachia oryzae* Hashioka &Yokogi) (SILVA LOBO; FILLIPPI, 2017) e Mancha Foliar (*Curvularia lunata*) (Figura 2) (OLIVEIRA, 2017).

Figura 2. Aspecto visual de plantas de arroz acometidas das doenças Brusone (A), Mancha Parda (B), Mancha Estreita (C), Escaldadura (D) e Mancha Foliar (E).



Segundo Malavolta et al. (2009) a brusone é a principal doença do arroz, especialmente porque o agente etiológico, *Magnaporthe grisea* é um microrganismo que apresenta alta variabilidade patogênica, com existência de grande número de raças fisiológicas. De modo geral, os sintomas da doença iniciam-se nas folhas, com pequenos pontos castanhos que aumentam e formam as lesões típicas elípticas, com centro geralmente cinza e as bordas marrons, às vezes circundadas por um halo amarelado. Essas lesões aumentam em tamanho e em número, podendo se juntar, queimar e provocar a morte das folhas e, muitas vezes, da planta.

As infecções causadas por *M. grisea* ocorrem ainda na aurícula e lígula da folha bandeira, nos nós e colmos, apresentando-se com manchas marrons, podendo causar necrose total da parte atingida, impedindo a circulação da seiva e produzindo panículas com grãos chochos. A infecção do nó da base da panícula é conhecida como “brusone do pescoço”. Os grãos das panículas atacadas logo após a emissão até a fase de grão leitoso ficam totalmente chochos, já aqueles atacados mais tarde, sofrem redução no peso. Vale ressaltar que diversas partes da panícula, como ráquis, pedicelos, ramificações primárias e secundárias também podem ser infectadas (SILVA LOBO; FILIPPI, 2017).

Ludwig et al. (2009) destacam a mancha parda causada por *Bipolaris oryzae*, como uma doença de elevada importância econômica para a cultura do arroz. De forma geral, os sintomas da doença caracterizam-se por lesões circulares ou ovais, de coloração marrom, nas

folhas e grãos. Os seus danos vão desde a redução no percentual de germinação das sementes, no estabelecimento de plantas e na área fotossintetizante, até manchas nos grãos que causam depreciação do produto e geram perdas durante o beneficiamento.

No que se refere à mancha estreita, causada por *Cercospora janseana*, os sintomas típicos são caracterizados pelo próprio nome da doença. As manchas foliares têm formato estreito (linear) e alongado, não atingindo mais do que 1-2 espaços internervuras, no sentido transversal. Normalmente as lesões apresentam coloração pardo-avermelhada e possuem em média de 2 a 10 mm de comprimento e 1 mm de largura, mas podem coalescer. Vale ressaltar que também podem aparecer sintomas na bainha da folha, no último nó do colmo e nas panículas (NUNES, 2013).

A escaldadura (*Gerlachia oryzae*) é considerada uma das doenças foliares mais importantes e danosas ao arroz. Ocorrendo em níveis elevados em todas as regiões orizícolas do Brasil, a doença está associada ao uso de cultivares suscetíveis. Os sintomas iniciam-se pelas extremidades apicais das folhas ou pelas bordas das lâminas foliares. Primeiramente as manchas não apresentam margens bem definidas e são de coloração verde-oliva; Posteriormente as lesões apresentam sucessões de faixas concêntricas, alternando faixas marrom-claras e escuras. As lesões coalescem, causando seca e morte das folhas. As lavouras afetadas apresentam amarelecimento geral, com as pontas das folhas secas. Em condições desfavoráveis ao desenvolvimento da doença, os esporos produzem várias pontuações pequenas de coloração marrom-clara e, geralmente, são confundidos com outras doenças. Sintomas semelhantes podem ser vistos nas bainhas. O fungo infecta os grãos, causando pequenas manchas do tamanho de uma cabeça de alfinete e, em casos severos, provocam descoloração das glumelas, deixando-as com a coloração marrom-avermelhada (SILVALOBO; FILIPPI, 2017).

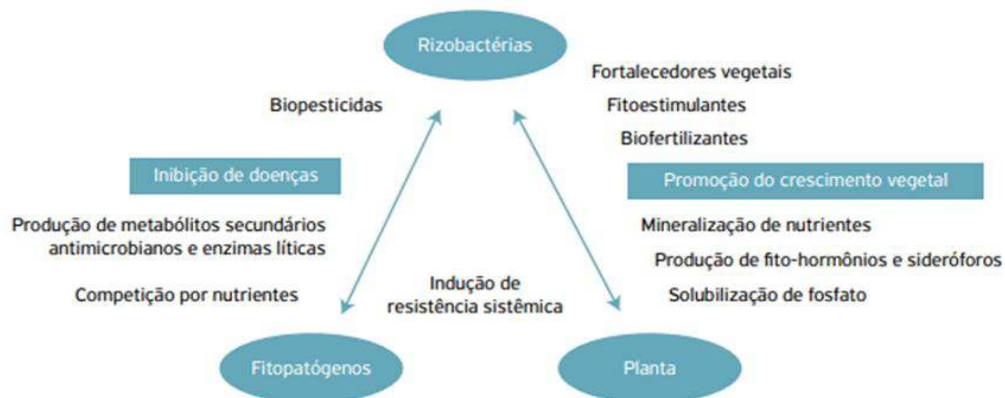
A mancha foliar (*Curvularia lunata*), apesar de ocorrência mais rara em relação as outras doenças do arroz, também tem importância econômica para a cultura. O patógeno permanece na planta durante todo o ciclo provocando manchas irregulares que coalescem e reduzem a área fotossintética da folha, além de manchas e deformação também nos grãos (SILVA et al., 2014).

2.2. Interação Planta e Microrganismo

A compreensão das relações ecológicas entre as comunidades microbianas, bem como de suas funções e possíveis interações com as plantas dentro dos agroecossistemas, é fundamental para a sustentabilidade agrícola.

De modo geral, essa interação entre microrganismos e plantas, pode ser maléfica ou patogênica, quando microrganismos causam doenças às plantas (VERGARA et al., 2019), e benéfica ou simbiótica (Figura 3), quando tanto os microrganismos quanto as plantas se beneficiam. Desta forma, enquanto as plantas fornecem carboidratos aos microrganismos, estes auxiliam principalmente na promoção de crescimento vegetal, fixação de nitrogênio e controle de doenças (OLDROYD, 2013).

Figura 3. Interações das bactérias na promoção do crescimento das plantas e da sanidade vegetal.



Fonte: GARCIA et al. (2015).

Dentre os organismos do solo capazes de estabelecer simbiose com culturas agrícolas, os diazotróficos assumem destaque nas pesquisas, uma vez que, além de fornecerem nitrogênio às plantas, promovem o crescimento vegetal, e desta forma, o uso de inoculantes desses organismos, constitui-se numa promissora alternativa tanto para redução de custos na produção, quanto para redução dos impactos ambientais negativos (MOREIRA et al., 2010; IKEDA et al., 2014; SPOLAOR et al., 2016).

Cálculos da contribuição de N fixado para gramíneas estão em torno de 25 a 50 kg N/ha/ano o que equivale ao suprimento médio de cerca de 17 % das demandas das culturas. Considerando a importância das espécies produtoras de grãos, a exemplo o arroz, esta taxa de fixação biológica de nitrogênio (FBN), mesmo baixa representa uma grande economia nos custos de produção (MOREIRA et al., 2010).

Além das bactérias diazotróficas, as Rizobactérias Promotoras de Crescimento em Plantas (RPCP), também têm sido bastante estudadas, devido a capacidade de colonização de

raízes, estimulando-as diretamente ou beneficiando o crescimento/desenvolvimento vegetal através da síntese de ácido indol acético (AIA) (PEDRINHO et al., 2010).

Vale ressaltar, que a promoção de crescimento vegetal pode ocorrer de forma direta, pela fixação biológica de nitrogênio, produção de fitormônios, como AIA, disponibilidade de nutrientes por meio de solubilização de fosfato e produção de sideróforos ou de forma indireta, por meio da produção de substâncias inibidoras do crescimento de fitopatógenos, entre outros (IKEDA et al., 2014).

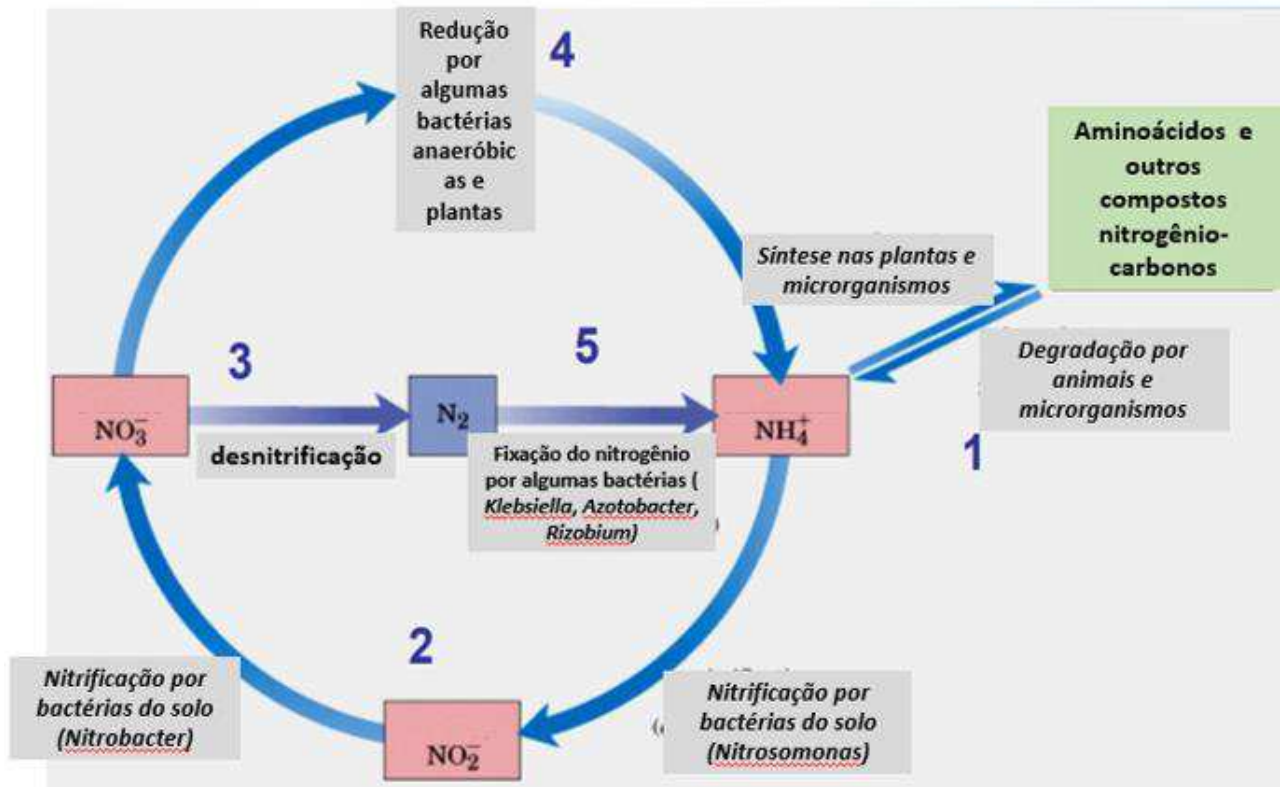
Estudos recentes comprovam a associação benéfica entre bactérias diazotróficas e as RPCP com a cultura do arroz (FERRERA et al., 2014; GARCIA et al., 2015; YASMIN et al., 2016; PHAM et al., 2017), no entanto, alguns aspectos ainda precisam ser mais bem investigados, tais como: os mecanismos envolvidos na interação entre as bactérias e as plantas hospedeiras, a influência do genótipo dos cultivares de arroz na seleção das bactérias, e as interações entre as espécies de bactérias e seus fitopatógenos e pragas (GARCIA et al., 2015).

2.2.1 Fixação biológica do nitrogênio (FBN)

O nitrogênio (N) é um elemento essencial para a manutenção das células vivas, fazendo parte de moléculas orgânicas, como proteínas e aminoácidos. Em geral, a concentração desse nutriente no tecido vegetal pode variar de 2 a 4 %, e a demanda por N das culturas agrícolas é expressiva. A aplicação de N no solo é inerente à produtividade elevada das culturas agrícolas, no entanto, o N aplicado está sujeito a transformações e movimentações no solo, resultando em perdas, que podem variar de acordo com o clima, as propriedades químicas e físicas do solo, o estágio fenológico da planta e também a atividade microbiana no solo (MENGEL; KIRKY, 1987; OSÓRIO FILHO et al., 2016).

A FBN é um processo enzimático realizado por microrganismos simbióticos e assimbióticos fixadores de nitrogênio. Esses microrganismos são chamados de diazotróficos e assumem papel importante no ciclo do nitrogênio: a fixação do N² atmosférico no solo, na forma de amônio, assimilável pelas plantas (LI et al., 2019) (Figura 4). Segundo Rascio e La Rocca (2013) esse processo de fixação realizado por bactérias é capaz de fornecer aos ecossistemas cerca de 200 milhões de toneladas de N por ano.

Figura 4. O ciclo do Nitrogênio (N).



Fonte: adaptado de ALVES (2019).

Os microrganismos conduzem o ciclo do nitrogênio através da fixação do nitrogênio à amônia. Tradicionalmente, a agricultura depende de rotações que exploram o nitrogênio fixado por rizóbios simbióticos em leguminosas, resíduos reciclados e esterco, que a atividade microbiana mineraliza para liberar amônia ou nitrato, sem grandes custos para o meio ambiente (HIRSCH; MAUCLINE, 2015).

Atualmente, com o aumento da demanda por alimentos no planeta, o processo industrial de utilização do N para ser fornecido para as plantas na forma de amônio é realizado pela técnica de Haber-Bosch, à custa de grandes gastos energéticos e de combustíveis fósseis sob altas temperaturas (300 a 500 C°) e pressão (20 a 30 MPa), além da emissão gases do efeito estufa como o CO₂ (XUE et al., 2019).

Por conta desse processo oneroso e prejudicial ao meio ambiente, tem se procurado meios alternativos de suprir este nutriente tão primordial ao desenvolvimento das grandes culturas (TAULÉ et al., 2012; KE et al., 2019; BANIK et al., 2019). Neste sentido, a fixação biológica de nitrogênio em plantas não leguminosas como arroz, milho (*Zea mays* L.), cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.), entre outras, constitui-se numa alternativa promissora e

eficiente, no entanto trata-se de uma interação complexa entre as plantas, os microrganismos e os ecossistemas.

Estudos recentes têm demonstrado o potencial da FBN em gramíneas, a exemplo, Urquiaga et al. (2012) relataram ganhos de até 40 kg de N ha⁻¹ ano⁻¹ oriundos da FBN, em cana-de-açúcar. De forma semelhante Ferreira et al. (2010) e Ramos et al. (2010) obtiveram resultados positivos para a inoculação de bactérias do gênero *Herbaspirillum* e *Azospirillum* respectivamente no arroz e milho. Os autores relataram aumento de 13 % na produção e 19,4 % no N-total dos grãos na variedade de arroz IAC4440, em relação ao controle, bem como descreveram maiores alturas para o milho inoculado, em relação à testemunha.

No referente ao arroz, Bortolini (2015) estudando o efeito da inoculação de *Enterobacter oryzendophyticus* (UFSM-11) e *Herbaspirillum frigiense* (UFSM-13) na cultivar IRGA-409, descreveram incrementos de respectivamente 13 % e 16 % na produção de massa fresca se comparado ao tratamento sem inoculação. Os autores também obtiveram maior acúmulo de N na massa fresca do arroz, quando houve inoculação, sendo descritos aumentos de 22 % (UFSM-11) e 17 % (UFSM-13).

Vale ressaltar que a capacidade de bactérias para colonizar, fixar e transferir nitrogênio, em simbiose com plantas de arroz, bem como a ocorrência e a compreensão dos mecanismos envolvidos na interação planta/microrganismo/ambiente, além do conhecimento da variabilidade genética tanto nos microrganismos potencialmente fixadores como nos genótipos de arroz, têm ganhado espaço entre as pesquisas (FAGUNDES et al., 2012), mas ainda necessitam ser mais bem investigados.

2.2.2. Promoção de crescimento vegetal

Recentes progressos no entendimento da diversidade e uso de bactérias promotoras de crescimento, assim como sua pluralidade e habilidade de colonização de tecidos nas plantas e seu modo de ação, têm contribuído para avanços na produção agrícola. No entanto, ainda é necessário compreender melhor, como a produção de substâncias promotoras de crescimento afeta a morfologia das plantas (BHATTACHARYYA; JHA, 2012).

O crescimento vegetal pode ser promovido por bactérias promotoras de crescimento das plantas (BPCP) através de mecanismos, tais como fixação do nitrogênio atmosférico, produção de enzimas e compostos para o crescimento vegetal, e também através da proteção contra o efeito de fitopatógenos (GLICK, 2005; OLDROYD, 2013). Entre os gêneros bacterianos mais citados e estudados na promoção de crescimento vegetal, de forma direta ou

indireta, estão *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Enterobacter*, *Rizobium*, *Bacillus* e *Stenotrophomonas*. De forma geral, quando em associação, essas bactérias promovem um aumento substancial da área da raiz, proporcionando maior eficiência na absorção de água do solo, além de maior disponibilidade de macro e micronutrientes às plantas (BERG, 2009).

Em relação aos mecanismos de ação direta relacionados às BPCP, está a capacidade de obter nutrientes e melhorar o crescimento das plantas modulando os hormônios relacionados ao crescimento, o que pode ajudar as plantas a crescerem melhor sob condições normais e estressadas. Indiretamente, tais bactérias melhoram o crescimento das plantas, combatendo os fitopatógenos usando mecanismos como a produção de antibióticos e enzimas líticas, indisponibilidade de nutrientes para os patógenos e mecanismos primários de defesa das plantas, protegendo as plantas de futuros ataques de patógenos (MILIUTE et al., 2015; MA et al., 2016).

Atualmente, muitos estudos têm relatado resultados positivos em função dos mecanismos diretos e indiretos na promoção de crescimento vegetal, a exemplo, Santos et al. (2017), comprovaram a capacidade de *Azospirillum brasilienses* em promover o crescimento vegetal, devido a capacidade de fixar nitrogênio atmosférico. Os autores constataram incrementos de 30 % e 40 % respectivamente para raiz e massa seca da parte aérea do trigo, quando houve a inoculação da cepa *Azospirillum brasilienses* (HM₀₅₃) excretora de amônio.

De forma semelhante Georgieva et al. (2018) também expuseram resultados positivos e promissores referentes a promoção de crescimento, com espécies do gênero *Pseudomonas*, mas desta vez de forma indireta, através da promoção de enzimas degradadoras da parede celular. Os autores comprovaram a atividade proteolítica e quitinolítica em cepas de *Pseudomonas* (*P. putida* BTCC1046, *P. putida* Or5 e *Pseudomonas* sp. 1S4), ambas as atividades enzimáticas de grande importância na defesa de plantas contra a invasão por parte de fitopatógenos.

Toda via Osório Filho et al. (2016) relataram que os rizóbios, apesar de não fixarem nitrogênio (N) quando associados ao arroz, podem estimular o crescimento radicular e aumentar o aproveitamento dos nutrientes do solo, incluindo o N. Os autores descreveram que a inoculação de rizóbios incrementou a produção de matéria seca e parte aérea das plantas de arroz em 19 %, além disso, aumentou o perfilhamento e a absorção de N. Segundo os autores, a inoculação de rizóbios em arroz, embora não dispense a adubação nitrogenada, tem potencial para aumentar a produção e a eficiência do uso do N.

Já Ferreira et al. (2014) afirmam o potencial do gênero *Pseudomonas* na promoção de crescimento de plantas de arroz de forma direta e indireta. Os autores relataram que P21, uma estirpe de *Pseudomonas* spp. apresentou capacidade de produção de ácido indol acético, fixação biológica de nitrogênio, atividades de protease, catalase e uréase, e entre as bactérias avaliadas em seu estudo (*Burkholderia* spp., *Rhizobium* spp., e *Pseudomonas* spp.) a estirpe de *Pseudomonas* spp. apresentou maior capacidade de interagir com diferentes genótipos de arroz, tendo proporcionado diferença significativa para os parâmetros relacionados à parte aérea e ao sistema radicular, quando comparados ao controle.

2.2.3. Microrganismos como agentes de biocontrole de doenças

A associação de plantas com microrganismos tem papel fundamental no desenvolvimento e sanidade vegetal, sendo em sua maioria, os mecanismos de combate a doenças, relacionados ao próprio desenvolvimento da planta (BERG, 2009).

Dentre as diferentes formas de interações, o estabelecimento da associação planta-microrganismo no sistema radicular é fundamental para a resposta quimiostática do endófito aos exsudatos radiculares. No entanto, a colonização bacteriana da rizosfera ou da superfície da planta é complexa, envolvendo genes e outros metabólicos das bactérias. No processo de colonização ocorrem múltiplas etapas, que iniciam com o deslocamento do microrganismo em direção ao sistema radicular, seguido da adesão e distribuição ao longo das raízes, de forma a garantir a sobrevivência e o crescimento da população de endofíticos (GIRI; DUDEJA, 2013).

Garcia et al. (2015), destacam as RPCP como procariotos eficientes no controle biológico de doenças através de mecanismos como a liberação de metabólitos antimicrobianos, degradação da parede celular de patógenos através da produção de enzimas líticas, competição por nutrientes e indução de resistência sistêmica nas plantas. Entretanto, segundo os autores, as bactérias endofíticas, com caráter diazotrófico (BECD), possuem vantagem em relação às rizobactérias no que se refere ao estímulo do crescimento vegetal e ao controle biológico, uma vez que além de fornecerem nitrogênio, também promovem o crescimento vegetal e induzem a resistência à fitopatógenos.

Brito et al. (2018) avaliaram o potencial de estirpes bacterianas (*Acinetobacter johnsonii* (Bouvet and Grimont), *Burkholderia ambifaria* (Coenye) e *Burkholderia* sp.) na inibição do desenvolvimento de fungos fitopatogênicos (*Giberela zae* (Schwein.) Petch, *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid., *Bipolaris sorokiniana* e *Colletotrichum musae* (Berk. & M.A.Curtis) Arx) comuns na cultura do milho. Os autores comprovaram a ação antagônica

de todas as bactérias na redução do crescimento fúngico, no entanto, *Burkholderia* sp. se destacou no controle de 36 %, 26 % e 32 %, respectivamente para os fungos *C. musae*, *M. phaseolina* e *G. zaeae*.

De forma semelhante, Souza Júnior et al. (2017) avaliaram o efeito de combinações de bactérias (*Pseudomonas synxantha* - DFs185, *P. fluorescens* - DFs223 e *Bacillus* sp. - DFs416 e DFs418) no biocontrole da brusone (*Pyricularia grisea*), mancha parda (*Bipolaris oryzae*) e escaldadura (*Gerlachia oryzae*) em plantas de arroz. Os autores concluíram que as combinações das bactérias, quando microbiolizadas em sementes de arroz, ampliaram o espectro de ação para o controle das doenças foliares, sendo superior ao tratamento com fungicida Carboxin Thiram. Apesar de recentes e em número limitado, os estudos sobre microrganismos como agentes de biocontrole de doenças apresentam resultados promissores.

2.3. Aspectos Gerais do Gênero *Pseudomonas* associado a agricultura

O gênero *Pseudomonas* é constituído por espécies compostas de bastonetes Gram-negativo, onipresente em águas e solos, sendo uma das bactérias mais adaptáveis a vários ambientes. O gênero apresenta ainda grande capacidade de biodegradação de muitos compostos orgânicos (YONG et al., 2019). Na agricultura, o gênero tem sua importância reconhecida principalmente no crescimento de plantas e controle de doenças (GARCIA et al. 2015) no entanto, pesquisas também apontam o potencial para fixação do nitrogênio atmosférico (PHAM et al., 2017). As principais características de *Pseudomonas* spp., são: rápido crescimento *in vitro*, rápida utilização de exsudados de sementes em germinação e raízes, colonização e multiplicação na rizosfera e no interior de plantas, produção de grande variedade de metabólitos (antibióticos, sideróforos e substâncias promotoras de crescimento) e competição contra outros microrganismos (CAMPOS, 2010).

Dentre as espécies do gênero, destacam-se nos estudos de âmbito agrícola, ora como organismos diazotróficos, ora como bactérias promotoras de crescimento e/ou agentes de biocontrole de doenças, as espécies *P. Aeruginosa* (Schtoeter) Migula, *P. fluorescens* Aur, *P. putida* (Trevisan) Migula, *P. korensis* sp. (Kwon), *P. fuscovaginae* sp. (Tanii) Miyajima, dentre outras (WAHAB et al., 2015, GARCIA et al., 2015, ANNAPURNA et al., 2017, PHAM et al., 2017, MELIANE et al., 2017, LIN et al., 2016).

Na figura abaixo, segue o aspecto visual do crescimento de *Pseudomonas aeruginosa*.

Figura 5. Aspecto visual do crescimento de *Pseudomonas aeruginosa*.



REFERÊNCIAS

- ALVES, L. M. C. 2019. **Ciclo de nitrogênio e fixação biológica**. Disponível em: <https://www.fcav.unesp.br/Home/departamentos/tecnologia/luciamariacararetoalves/aula-10--ciclo-n-e-fbn.pdf>. Acessado em : 09/08/2019.
- ANNAPURNA, K.; GOVINDASAMY, V.; SHARMA, M.; RAJRANA, Y.; SWARNALAKSHMI, K.; PAUL, S.; GHOSH, A.; CHIKARAB. S.K. Draft Genome Sequence of *Pseudomonas stutzeri* Strain KMS 55, an Endophytic Diazotroph Isolated from Rice Roots. **American society for microbiology**, v. 5 n. 40, p. 1-2, 2017 .
- BALDOTTO, L.E.B.; BALDOTTO, M.A.; OLIVARES, F.L.; VIANA, A.P.; BRESSAN-SMITH, R. Seleção de bactérias promotoras de crescimento no abacaxizeiro cultivar Vitória durante a aclimatização. **Revista Brasileira Ciência do Solo**, v. 34, p. 349-360, 2010. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-06832010000200008&script=sci_abstract&tlng=pt. Acessado em: 10/08/2019.
- BANIK, A.; DASH, G. K.; SWAIN, P.; KUMAR, U.; MUKHOPADHYAY, S. K.; DANGAR, T. KANTI. Application of rice (*Oryza sativa* L.) root endophytic diazotrophic Azotobacter sp. strain Avi2 (MCC 3432) can increase rice yield under green house and field condition. **Microbiological Research**, v. 219, n. November 2018, p. 56–65, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.11.004>>. Acesso em: 23 jul. 2019.
- BERG, G. Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: Perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 84, n. 1, p. 11–18, 2009. Disponível em: <<https://link-springer-com.ez80.periodicos.capes.gov.br/article/10.1007/s00253-009-2092-7#Sec2>> Acesso em: 03 ago. 2019
- BHATTACHARYYA, P. N.; JHA, D. K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Emergence in agriculture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 1327–1350, 2012. Disponível em: <<https://link-springer-com.ez80.periodicos.capes.gov.br/article/10.1007/s11274-011-0979-9>> Acesso em: 26 jul. 2019.
- BORÉM, A.; RANGEL, P. H. N. **Arroz: do plantio à colheita**. 1. ed. Viçosa: UFV, 2015.
- BORTOLINI, J. G. 2015. **Resposta de cultivares de arroz irrigado a inoculação de bactérias diazotróficas**. 47 f. Dissertação (mestrado em agrobiologia) Universidade Federal de Santa Maria, 2015.
- BRITO, T. S. LIMA, W.F. PAN, F. PORFITIO, M.D. CANELLO, K.T. CHAVES, E.I.D. Antagonismo de bactérias diazotróficas isoladas de plantas de milho no biocontrole de fitopatógenos. **Revista cultivando o saber**. v. 11, n. 1, p. 430–439, 2018. disponível em: <https://www.fag.edu.br/upload/revista/cultivando_o_saber/5ab39d397868c.pdf> Acesso em: 10 ago. 2018.
- BUOSI, T.; MUNIZ, L. C.; FERREIRA, C. M. **Caracterização e diagnóstico da cadeia produtiva do arroz no estado do Maranhão**. Brasília: Embrapa, 2013. 35p.
- CAMPOS, J. T. **Rizobactérias promotoras do crescimento de cana-de-açúcar**. 2010. 71 f. Dissertação de Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical, Campinas, SP, 2010.

CARVALHO, N. L.; ZABOT, V. NITROGÊNIO: NUTRIENTE OU POLUENTE? **Revista eletrônica em gestão, educação e tecnologia ambiental**, v. 6, n. 6, p. 960-974, 2012. Disponível em: <https://periodicos.ufsm.br/reget/article/viewFile/4671/2990>. Acessado em: 10/08/2019.

CONAB, 2019. **Análise Mensal do Arroz**. 10p. 2019.

COUNCE, P. A.; KEISLING, T. C.; MITCHELL, A. L. A uniform and adaptative system for expressing rice development Crop Science. *apud* PINHEIRO, B. S.; HEINEMANN, A. B. Características da planta. **AGEITEC. Agência Embrapa de Informação Tecnológica, 2000**. disponível em: <https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/arroz/arvore/CONT000fe75wint02wx5eo07qw4xecl ygdut.html> . Acesso em: 16 ago 2019.

FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS STATISTICS. 2018. Disponível em: <http://http://fenix.fao.org/faostat/internal/en/#data/QC>. Acesso em: 29 fev 2020.

FAGUNDES, P. R. R. MATTOS, M. L. T. MAGALHAES JUNIOR, A. M. SCIVITTARO, W. B. PETRINI, J. A. AZAMBUJA, I. H. V. SEVERO, A. C. M. KNABAH, O. W. **Resposta de Genótipos de Arroz Irrigado à Fixação Biológica de Nitrogênio**. Brasília: EMBRAPA. 2012.

FERREIRA, J.S. BALDANI, J.I. BALDANI, V.L.D. Seleção de inoculantes à base de turfa contendo bactérias diazotróficas em duas variedades de arroz. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 32, n.1 p. 179-189, 2010. disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1807-86212010000100025&script=sci_abstract&tlng=pt Acesso em: 10 ago. 2018.

FERREIRA, E. P. B.; KNUPP, A. M.; MARTIN DINDONET, C. C. G. CRESCIMENTO DE CULTIVARES DE ARROZ (*Oryza sativa* L.) INFLUENCIADO PELA INOCULAÇÃO COM BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO DE PLANTAS. **Biosci. J.**, v. 30, n. 3, p. 655-665, 2014.

FIDELIS, R. R.; RODRIGUES, A. M.; SILVA, G. F.; BARROS. H. B.; PINTO, L. C.; AGUIAR, R. W. S. EFICIÊNCIA DO USO DE NITROGÊNIO EM GENÓTIPOS DE ARROZ DE TERRAS ALTA. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 42, n. 1, p. 124-128, 2012. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/pat/v42n1/18.pdf>. Acessado em: 10/08/2019.

GARCIA, T. V.; KNAAK, N.; FIUZA, L. M. LIDIA MARIANA. Bactérias endofíticas como agentes de controle biológico na orizicultura. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 82, n. 1, p. 1–9, 2015.

GEORGIEVA, T.; EVSTATIEVA, Y.; SAVOV, V.; BRATKOV, S.; NIKOLOVA, D. Assessment of plant growth promoting activities of five rhizospheric *Pseudomonas* strains. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 16, n. August, p. 285–292, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.08.015>. Acesso em: 03ago. 2019.

GIRI, R.; DUDEJA, S.S. Root Colonization of Root and Nodule Endophytic Bacteria in Legume and Non Legume Plants Grown in Liquid Medium. **Journal of Microbiology Research and reviews**, v. 1, n. 6, p. 75-82, 2013.

GLICK, B. R. Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. **FEMS Microbiology Letters**, v. 251, n. 1, p. 1–7, 2005. Disponível em: <https://academic.oup.com/femsle/article/251/1/1/467308> Acessado em: 26 jul. 2019.

GUPTA V, KUMAR GN, BUCH A. Colonization by multi-potential *Pseudomonas aeruginosa* P4 stimulates peanut (*Arachis hypogaea* L.) growth, defence physiology and root system functioning to benefit the root-rhizobacterial interface. **J Plant Physiol.** v. 248, p. 1–30, 2020. Disponível em: <Disponível em: <<https://academic.oup.com/femsle/article/251/1/1/467308>> Acessado em: 28 jul. 2019.

HEINEMANN, A. B.; RAMIREZ-VILLEGAS, J.; REBOLLEDO, M. C.; COSTA NETO, G. M. F.; CASTRO, A. P. Upland rice breeding led to increased drought sensitivity in Brazil. **Field Crops Research**, v. 231, n. April, p. 57–67, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fcr.2018.11.009>>. Acesso em 18 jul. 2019.

HIRSCH, PENNY R.; MAUCHLINE, T.H. The Importance of the Microbial N Cycle in Soil for Crop Plant Nutrition. **Adv. Appl. Microbiol.** v. 93. p.45-71, 2015. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1016/bs.aambs.2015.09.001>>. Acesso em 31 jul.2019.

IKEDA, A.C.; HUNGR IA, M.; KAVA - CORDEIRO, V.; GLIENKE, C.; GALLI - TERASAWA, L. V. **Bactérias endofíticas e rizobactérias como promotoras de crescimento em plantas de milho.** Embrapa, 20 p, 2014.

KE, XI.; SHUAI, F.; JIN W.; WEI L.; WEI Z.; MING. C.; MIN, L. Effect of inoculation with nitrogen-fixing bacterium *Pseudomonas stutzeri* A1501 on maize plant growth and the microbiome indigenous to the rhizosphere. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 42, n. 2, p. 248–260, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.syapm.2018.10.010>>. Acesso em: 23 jul. 2019.

LI, Y.; PAN, F.; YAO, H. Huaiying. Response of symbiotic and asymbiotic nitrogen-fixing microorganisms to nitrogen fertilizer application. **Journal of Soils and Sediments**, v. 19, n. 4, p. 1948–1958, 2019. Disponível em: <<https://link-springer-com.ez80.periodicos.capes.gov.br/article/10.1007/s11368-018-2192-z>> Acessado em 21 jul. 2019.

LIN, H.; HU, SHIKA.; LIU, R.; CHEN, P.; GE, C.; ZHU, B.; GUO, L. Genome Sequence of *Pseudomonas koreensis* CRS05-R5, an Antagonistic Bacterium Isolated from Rice Paddy Field. **Frontiers in Microbiology** , v. 7 n. p. 1-5, 2016.

LUDWIG, L.; MOURA, A. B.; SANTOS, A. C.; RIBEIRO, A. S. Microbiolização de sementes para o controle da mancha parda e da escaudadura em arroz irrigado. **Tropical Plant Pathology**, vol. 34, n. 5, p. 322-328, 2009.

MA, Y.; RAJKUMAR, M.; ZHANG, C.; FREITAS, H. Beneficial role of bacterial endophytes in heavy metal phytoremediation. **Journal of Environmental Management**. v. 174, 14–25, 2016.

MALAVOLTA, V M. A; CARQUEIJO, A. P.; MENDES, L. Variabilidade patogênica do fungo *Pyricularia grisea* no Estado de São Paulo. **Summa Phytopathol**, v. 35, n. 1, p. 49-51, 2009.

MELIANI, A.; BENSOLTANE, A.; BENIDIRE, L.; OUFDOU, K. Plant Growth-Promotion and IAA Secretion With *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*. **Journal of Botanical Sciences**, v. 6, p. 16-24, 2017.

MENGEL, K.; KIRKBY, E.A. **Principles of plant nutrition.** Berna: International Potash Institute, 1987. 687p.

MILIUTE, I.; BUZAITE, O.; BANIULIS, D.; STANYS, V. Bacterial endophytes in agricultural crops and their role in stress tolerance: a review. **Zemdirbyste-Agriculture**. v.102, n.6, p. 465-478, 2015.

MOREIRA, F.M.S.; SILVA, K.; NÓBREGA, R. S. A., Bactérias diazotróficas associativas: Diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, v. 1, n. 2, p. 74–99, 2010. Disponível em:<<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/896224>> Acessado em: 26 jul. 2019.

NALLEY, L.; TSIBOE, F.; DURAND-MORAT, A.; SHEW, A.; THOMA, G. Economic and Environmental Impact of Rice Blast Pathogen (*Magnaporthe oryzae*) Alleviation in the United States **PLoS one** v 11 n 12, p. 1–15, 2016 :< <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27907101/> > Acessado em: 27 jul. 2019.

NUNES, C. D. M. **Doenças da Cultura do Arroz Irrigado**. Embrapa, 85 p, 2013.

OLDROYD, G. E. D. Speak, friend, and enter: Signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 4, p. 252–263, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2990>> Acessado em: 26 jul. 2019.

OLIVEIRA, I. N. **Manejo ecológico de doenças em arroz (*Oryza sativa* L.) de terras altas**. 134 f. tese (Doutorado em Agroecologia) Universidade Estadual do Maranhão, São Luis. 2017.

OLIVEIRA, M. I., CHAIBUB, A. A., SOUSA, T. P., CORTES, M. V. C. BARROS., SOUZA, A. C. A., CONCEIÇÃO, E.C., & FILIPPI, M. C. C. (2019) Formulations of *Pseudomonas fluorescens* and *Burkholderia pyrrocinia* control rice blast of upland rice cultivated under no-tillage system. **Biological Control**, v 144 n.1,p. 1-6. Disponível em: < Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2990>> Acessado em: 26 jul. 2019.> Acessado em: 26 jul. 2019.

OKUMURA, R. S.; MARIANO, D. C.; ZACCHEO, P. C. Uso de fertilizante nitrogenado na cultura do milho: uma revisão. **Revista Brasileira de Tecnologia Aplicada nas Ciências Agrárias**, v.4, n.2, p.226–244, 2011.

OSÓRIO FILHO, B. D.; BINZ, A.; LIMA, R. F.; GIONGO, A.; SÁ, E. L. S. Promoção de crescimento de arroz por rizóbios em diferentes níveis de adubação nitrogenada **Ciência Rural**, v. 46, n. 6, p. 478-485, 2016.

PEDRINHO, E. A. N.; GALDIANO, R. F.; CAMPANHARO, J. C.; ALVES, L. M. C.; LEMOS, E. G.M. Identificação E Avaliação De Rizobactérias Isoladas De Raízes De Milho. **Bragantia**, v. 69, n. 4, p. 905–912, 2010. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/brag/v69n4/v69n4a17.pdf>> Acessado em: 26jul. 2019.

PHAM, V. T. K.; REDDIERS, H.; GHEQUIRE, M. G. K.; NGUYEN, H. H. ; MOT, R.; VANDERLYDEN, J.; SPAEPEN, S. The plant growth-promoting effect of the nitrogen-fixing endophyte *Pseudomonas stutzeri* A15. **Arch Microbiol**, v. 199, n. 3, p. 513- 517,2017.

RAMOS, A. S.; SANTOS, T. M. C.; SANTANA, T. M.; GUEDES, E. L. F.; MONTALDO, Y. C. Ação do *Azospirillum lipoferum* no desenvolvimento de plantas de milho. **Revista Verde**, v. 5, n. 4, p. 113-117, 2010.

RASCIO, N.; LA ROCCA N. Biological Nitrogen Fixation. **Encyclopedia of Ecology** , v. 2, 2013, p. 264-279. 2013. Disponível em:<<https://www-scienceirect.ez80.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/B9780444637680006855>>. Acesso em 21 jul. 2019.

SANTOS, K.F.D.N.; MOURE, V. R.; HAUER, V.; SANTOS, A. R. S.; DONATTI, L GALVÃO, C. W.; PEDROSA F.; O, SOUZA, E.; WASSEM, M. R.; STEFFENS, M. B. R. Wheat colonization by an *Azospirillum brasilense* ammonium-excreting strain reveals upregulation of nitrogenase and superior plant growth promotion. **Plant and Soil**, v. 415, n. 1–2, p. 245–255, 2017. Disponível em: <<https://link-springer-com.ez80.periodicos.capes.gov.br/article/10.1007/s11104-016-3140-6>> Acesso em 01 ago. 2019.

SANTOS, A. B.; SANTIAGO, C. M. (Eds.). **Informações técnicas para a cultura do arroz irrigado nas regiões Norte e Nordeste do Brasil**. Documentos, Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, n. 279, 2014.

SANTOS, G. R.; CHAGAS, J. F. R.; TAVARES, A. T.; CASTRO NETO, M. D.; SARMENTO, R. A.; CHAGAS JÚNIOR, A. F.; NASCIMENTO, I. R. Danos causados por doenças fúngicas no arroz cultivado em várzeas no Sul do Estado do Tocantins. **Bragantia**, v. 70, n. 4, p.869-875, 2011.

SILVA LOBO, V. L.; FILIPPI, M. C. C. **Manual de Identificação de Doenças da Cultura do Arroz**. 48 p, 2017.

SILVA, M.S.B.S; RODRIGUES, A.A.C; OLIVEIRA, L.J.M.G; SILVA, E.K.C; PEREIRA, T.S. Sanidade de sementes de arroz, biocontrole, caracterização e transmissão de *Curvularia lunata* em semente –plântula de arroz. **Revista Ceres**, v.61 n.4 p.511-517, 2014.

SOUZA JÚNIOR, I. T.; SCAHFER, J. T.; CORRÊA, B. O.; FUNCK, G. D.; MOURA, A. B. Ampliação do espectro do biocontrole de doenças foliares em arroz com combinações de rizobactérias. **Revista Ciência Agronômica**, v. 48, n. 3, p. 513-522, 2017.

SPOLAOR, L. T.; GONÇALVES, L.S.A.; SANTOS, O.J.A.P.; OLIVEIRA, A.L.M.; SCAPIM, C.A.; BERTAGNA, F.A.B. KUKI, M.C. Bactérias promotoras de crescimento associadas a adubação nitrogenada de cobertura no desempenho agrônomico de milho pipoca Plant growth-promoting bacteria associated with nitrogen fertilization at topdressing in popcorn agronomic performance. **Bragantia**, v. 75, n. 1, p. 33–4033, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/1678-4499.330>> Acessado em: 26 jul. 2019.

TAULÉ, C. CINTIA, M.; CLAUDIA, B.; FERNANDO, H.; VERONICA, M.R.; MARGARITA, S.; FEDERICO, B. The contribution of nitrogen fixation to sugarcane (*Saccharum officinarum* L.), and the identification and characterization of part of the associated diazotrophic bacterial community. **Plant and Soil**, v. 356, n. 1–2, p. 35–49, 2012. Disponível em: < Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.syapm.2018.10.010>>. Acesso em: 23 jul. 2019.

TERRA, T. G. R.; LEAL, T.C.A.B.; BOREM, A.; RANGEL, P.H.N. Tolerância de linhagens de arroz de terras altas à seca. **Pesqui. Agropecu. Trop.**, Goiânia, v. 43, n. 2, p. 201-208, 2013. disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1983-40632013000200013&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 10 jul. 2019.

THEISEN, G.; SILVA, J. J. C.; SILVA, J. S.; ANDRES, A.; ANTEN, N. P. R.; BASTIAANS, L. The birth of a new cropping system: towards sustainability in the sub-tropical lowland agriculture. **Field Crops Research**, v. 212, n. July, p. 82–94, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fcr.2017.07.001>>. Acesso em 18 jul. 2019.

URQUIAGA, S.; XAVIER, R.P.; MORAIS, R.F.; BATISTA, R.B.; SCHULTZ, N.; LEITE, J.M.; SÁ, J.M.; BARBOSA, K.P. DE RESENDE, A.S.; ALVES, B.J.R.; BODDEY, R.M. Evidence from field nitrogen balance and ^{15}N natural abundance data for the contribution of biological N_2 fixation to Brazilian sugarcane varieties.

Plant and Soil, v. 356, n. 1–2, p. 5–21, 2012. Disponível em: < <https://link.springer.com/article/10.1007/s11104-011-1016-3#citeas>> Acessado em: 25 jul. 2019.

VERGARA, C.; ARAUJO, K. E. C.; SOUZA, S. R.; SCHULTZ, N.; JAGGIN JÚNIOR, O. J., SPERANDIO, M. V. L.; ZILLI, J. É. Plant-mycorrhizal fungi interaction and response to inoculation with different growth-promoting fungi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 54, p. 1-24, 2019. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-204X2019000103301>Acessado em: 26 jul. 2019.

WAHAB M, SIJAM K, ISMAIL R, HASHIM, HATA E, et al. Phenotypic Characterization and Molecular Identification of Malaysian *Pseudomonas fuscovaginae* Isolated from Rice Plants. **Asian Journal of Plant Pathology**, v. 9, n. 3, p.112 – 123, 2015.

XUE, XIAOLAN.; CHEN, R., YAN, C.; ZHAO, P.; HU, Y.; ZHANG, W.; JIN, Z. Review on photocatalytic and electrocatalytic artificial nitrogen fixation for ammonia synthesis at mild conditions: Advances, challenges and perspectives. **Nano Research**, v. 12, n. 6, p. 1229–1249, 2019. Disponível em:< <https://link-springer-com.ez80.periodicos.capes.gov.br/article/10.1007/s12274-018-2268-5#Bib1>>. Acesso em 22 jul. 2019.

YASMIN, S., ZAKA, A., IMRAN, A., ZAHID, M. A., YOUSAF, S., RASUL, G., ... MIRZA, M. S. (2016). Plant Growth Promotion and Suppression of Bacterial Leaf Blight in Rice by Inoculated Bacteria. **PLoS one**, v.11 n.8, p 1–19 2016 Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27532545/>>. Acesso em 22 jul. 2019.

YONG, Y.C.; WU, X.Y.; SUN, J.Z.; CAO, Y.X.; SONG, H. Engineering quorum sensing signaling of *Pseudomonas* for enhanced wastewater treatment and electricity harvest: A review. *Chemosphere*. v. 140 ,p. 18-25, 2015.

ZHONG, Z.; LIN, L.; CHEN, M.; LIN, L.; CHEN, X.; LIN, Y. CHEN, X.; WANG, Z.; NORVIENYEKU, J.; ZHENG, H. Expression Divergence as an Evolutionary Alternative Mechanism Adopted by Two Rice Subspecies Against Rice Blast Infection. **Rice**, v. 12, n. 12 p.1–10,2019. Disponível em: <<https://thericejournal.springeropen.com/articles/10.1186/s12284-019-0270-5>>. Acesso em 22 jul. 2019.

ZONTA, J.B.; SILVA, F.B. Dinâmica da orizicultura no Maranhão. **Revista de Política Agrícola**, Brasília, v.13, n. 2, 2014.

Capítulo 2

POTENCIAL DE *Pseudomonas aeruginosa* NA ATIVIDADE DA NITROGENASE E PRODUÇÃO DE ÁCIDO INDOL ACÉTICO

Artigo redigido para submissão à Revista
Environmental Microbiology

Potencial de *Pseudomonas aeruginosa* na atividade da nitrogenase e produção de ácido indol acético

Sumário

A capacidade de fixação biológica de nitrogênio e promoção de crescimento por microrganismos em associação benéfica com culturas de interesse econômico tem sido bastante estudada nos últimos anos. O objetivo do trabalho foi identificar e avaliar o potencial de isolados bacterianos de *Pseudomonas aeruginosa*, obtidos de plantas de arroz de terras altas, no Estado do Maranhão, Brasil, quanto à atividade da enzima nitrogenase e de ácido indol acético. Para a identificação dos isolados realizou-se à amplificação e sequenciamento do gene 16S rDNA e posteriormente, a atividade da enzima nitrogenase foi avaliada pelo método de redução do acetileno (ARA). A produção de ácido indol acético foi determinada pelo método colorimétrico e os dados foram submetidos à análise de variância e ao teste de Tukey ($p < 0.05$). Foram obtidos 33 isolados bacterianos endofíticos de arroz, com proximidade filogenética com as espécies *Comamonas sediminis*, *Stenotrophomonas tumulicola*, *S. maltophilia*, *Pseudomonas hibscicola*, *P. donghunensis*, *P. sihuiensis*, *P. guuanensis*, *Raoultella ornithinolytica* e *Celvibrio japonicus*. Comprovou-se atividade da enzima nitrogenase em 15 isolados, com variação de 0.05 a 26.66 nmol C₂H₄ h⁻¹, bem como a produção de ácido indol acético em seis isolados, com variação de 18 a 18.23 µg.L⁻¹.

Introdução

A sustentabilidade agrícola tem sido o maior desafio dos últimos séculos, uma vez que, o crescimento contínuo da população acelera o aumento da demanda por alimentos e desta forma,

pressiona a agricultura a intensificar as práticas agrícolas, ao mesmo tempo em que seus impactos ambientais negativos também precisam ser minimizados (Godfray *et al.*, 2010).

Atualmente a agricultura moderna tem simplificado os agroecossistemas, substituindo os serviços ecossistêmicos, pelo aumento de insumos externos de energia e agroquímicos, como os pesticidas, herbicidas e fertilizantes. No entanto, estudos apontam que apesar da intensificação de práticas agrícolas convencionais, a produtividade de culturas alimentares de alta demanda, já estabilizou em muitos países, a expensas de danos quase que irreparáveis como alteração climática e redução da biodiversidade (Bommarco *et al.*, 2013), especialmente devido à contaminação e poluição pelo uso excessivo de fertilizantes (Kamga *et al.*, 2013).

Com base nesse enfoque, a busca por métodos alternativos em função da sustentabilidade é cada vez mais frequente e nas últimas décadas houve um aumento expressivo de pesquisas que visam compreender a dinâmica e contribuir para o entendimento dos fatores relacionados a fixação biológica de nitrogênio (FBN) para o desenvolvimento de culturas agrícolas (Breda *et al.*, 2019). A incorporação de nitrogênio nos diferentes ecossistemas do planeta, via FBN, faz parte dos ciclos biogeoquímicos naturais e só é possível na presença do complexo enzimático nitrogenase, presente em algumas espécies de bactérias que podem ser de vida livre ou viver em associações. O entendimento desse processo biológico abrange conhecimentos das espécies capazes de fixarem nitrogênio e sua classificação filogenética (Freitas e Rodrigues, 2010). O gene 16S rDNA tem sido amplamente utilizado com finalidade taxonômica e filogenética, desempenhando papel fundamental na identificação precisa de bactérias (Mus *et al.*, 2016) que compõem a diversidade de microrganismos diazotróficos e desta forma possibilita o emprego desses, como inoculantes em culturas agrícolas, especialmente nos cereais, com resultados positivos e promissores (Ke *et al.*, 2019).

Pesquisas relatam que bactérias dos gêneros *Azospirillum*, *Bacillus*, *Enterobacter* e *Pseudomonas*, apresentam potencial para incrementar o conteúdo de nitrogênio na planta e

aumentar sua produtividade, bem como induzir a produção do Ácido Indol Acético (AIA) e ainda atuar como agentes biocontroladores (Moreira *et al.*, 2014; Shabanamol e Jisha, 2014).

O gênero *Pseudomonas* tem sido constantemente associada ao sistema radicular de plantas de arroz, sugerindo que a inoculação de espécies deste gênero, pode ser uma alternativa viável à adubação nitrogenada em diferentes culturas (Pham *et al.*, 2017). *Pseudomonas* spp., tem se destacado entre os diazotróficos, uma vez que, quando inoculados em culturas agrícolas, além de FBN, também são capazes de produzir ácido indol acético (AIA) (Ferreira *et al.*, 2014), hormônio de regulação de crescimento vegetal, que atua direta ou indiretamente promovendo o crescimento das plantas em condições nutricionais, bióticas ou abióticas (Cassán *et al.*, 2014). Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi identificar e avaliar o potencial de isolados bacterianos de *Pseudomonas aeruginosa*, obtidos de plantas de arroz de terras altas, no estado do Maranhão, quanto à atividade da enzima nitrogenase e de ácido indol acético.

Resultados e discussão

Identificação molecular dos isolados

Após o sequenciamento do gene 16S rDNA e construção das árvores filogenéticas com 1000 repetições de *bootstrap*, foram obtidos 33 isolados bacterianos que apresentaram relações filogenéticas com a espécie *Pseudomonas aeruginosa* (Tabela 1).

Os isolados identificados como *P. aeruginosa* apresentaram proximidade filogenética com as espécies *Comamonas sediminis*, *Stenotrophomonas tumulicula*, *S. maltophilia*, *Pseudomonas hibscicola*, *P. donghunensis*, *P. sihuiensis*, *P. guguanensis*, *Raoultella ornithinolytica* e *Celvibrio japonicus* (Fig. 1). O gênero *Pseudomonas* se destaca no âmbito agrícola devido à capacidade de fixação biológica do nitrogênio, promoção do crescimento vegetal e controle de doenças (Ferreira *et al.*, 2014; Pham *et al.*, 2017).

Espécies dos gêneros *Comamonas*, *Stenotrophomonas* e *Raoultella* apresentam capacidade de controle de fitopatógenos e promoção de crescimento, havendo também relatos de fixação biológica de nitrogênio em espécies de *Stenotrophomonas* e *Raoultella*. O gênero *Celvibrio* tem sido associado respectivamente ao controle de fitopatógenos e degradação da celulose no solo (Finkmann *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2006; Lucon *et al.*, 2008; Resendez *et al.*, 2018).

De forma semelhante a nossa pesquisa, isolados bacterianos de folhas e raízes de arroz, após o sequenciamento do gene 16S rDNA e construção de árvores filogenéticas, também apresentaram em sua totalidade, relação filogenética com a espécie *Pseudomonas stutzeri* (Annapurna *et al.*, 2017). Além disso, também já foi constada a presença de *P. koreensis*, através do sequenciamento do genoma dos isolados em solos cultivados com arroz (Lin *et al.*, 2016).

Em geral, o gênero *Pseudomonas* tem sido frequentemente associado com gramíneas em especial, milho (*Zea mays* L.), cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) e arroz, proporcionando melhorias nos aspectos sanitários e produtivos (Pedrinho *et al.*, 2010; Shabanamol e Jisha, 2014).

Atividade de redução do acetileno (ARA)

Do total de 33 isolados obtidos de folhas e raízes de arroz, identificados como *P. aeruginosa*, 15 demonstraram capacidade de fixação biológica de nitrogênio (FBN), baseando-se na atividade da enzima nitrogenase, através do método ARA, com variações de 0.05 a 26.66 nmolC₂H₄h⁻¹ para atividade dessa enzima e 0.2 a 108.85 nmolC₂H₄ da cultura.h⁻¹ para produção de etileno (Tabela 2).

Sabe-se que a fixação biológica do nitrogênio (FBN) é a redução do N₂ a NH₄⁺, realizada por algumas espécies de bactérias, devido à presença do complexo enzimático nitrogenase. Sendo esta enzima a responsável pela quebra da tríplice ligação do nitrogênio através da energia celular na forma de ATP (Reis e Teixeira, 2005). Ela é composta por duas unidades básicas: a

ferro-proteína que coleta a força redutora e a energia, e outra ferro-molibdênio, responsável por coletar e reduzir o substrato (Moreira e Siqueira, 2006).

Dentre os isolados de *Pseudomonas aeruginosa* capazes de reduzir acetileno (Tabela 2), 60 % foram provenientes de raízes e 40 % provenientes de tecidos foliares, o que indica uma maior capacidade de colonização pelas bactérias na porção radicular possivelmente devido à liberação de exsudados. A presença de bactérias diazotróficas em maior quantidade nas raízes se comparada a parte aérea é um resultado comum e já foi relatada em isolamentos e caracterização de bactérias endofíticas de vários tecidos de arroz, obtendo-se em sua maioria, isolados provenientes da porção radicular, sendo 48% identificados como *Pseudomonas spp* e 52 % identificados como espécies de *Bacillus*, *Azotobacter* e *Enterobacter* (Phetcharata e Duangpaeng, 2012). *Pseudomonas* está entre os gêneros bacterianos mais comumente encontrados na raiz e rizosfera de plantas (Santoyo *et al.*, 2012).

O método de redução de acetileno, apesar de qualitativo, tem sido utilizado para avaliação indireta da atividade da nitrogenase, principalmente por ser considerada uma técnica rápida, de baixo custo e confiável (Alves *et al.*, 2015). Com base na análise de ARA dos 15 isolados de *P. aeruginosa*, seis apresentaram atividade da nitrogenase maior que “1”, enquanto que os nove restantes apresentaram valores muito baixos, totalizando apenas 1.50 nmolC₂H₄h⁻¹ (Tabela 2).

Os valores da nitrogenase obtidos para os isolados em nossa pesquisa foram relativamente baixos quando comparados aos valores de outros estudos (Estrada *et al.*, 2013; Alves *et al.*, 2015) no entanto, foi possível comprovar a capacidade de fixação biológica de nitrogênio pela espécie.

Houve grande variabilidade na atividade de redução de acetileno (ARA) dentre os isolados de *P. aeruginosa* com ARA maior que “1” (1.45 a 26.66 nmolC₂H₄h⁻¹), corroborando com pesquisas semelhantes que também expõem valores muito variáveis, mesmo para outras espécies diazotróficas. A exemplo, valores de 2 a 43.39 nmolC₂H₄h⁻¹, para *Burkholderia*

vietnamiensis e 159.8 a 265.21 $\text{nmolC}_2\text{H}_4\text{h}^{-1}$ para *Herbaspirillum seropedicae* (Estrada et al., 2013), bem como variações de 94 a 770 $\text{nmolC}_2\text{H}_4\text{h}^{-1}$ para *Herbaspirillum* spp (Alves et al., 2015) e também, 0.32 a 73.20 $\text{nmolC}_2\text{H}_4\text{h}^{-1}$ para bactérias diazotróficas isoladas de raízes do milho (Kifle e Laing, 2016).

Capacidade de produção do ácido indol acético (AIA)

Os seis isolados de *P. aeruginosa* com capacidade comprovada de fixação biológica de nitrogênio, através da confirmação da atividade da nitrogenase, também foram capazes de produzir ácido indol acético (AIA) de acordo com o método colorimétrico e apesar da pequena variabilidade entre as quantidades de AIA produzidas, houve diferença estatística na produção do hormônio entre os isolados (Fig. 2).

Em outras pesquisas, também já foi constatada a produção de AIA entre espécies do gênero *Pseudomonas*, a exemplo, em 103 isolados de *Pseudomonas* fluorescentes, a produção máxima foi de 4800 $\mu\text{g.l}^{-1}$ descrita para um isolado identificado como *P. aeruginosa* (Khare Arora, 2010). Em contraste aos nossos resultados houve grande variabilidade na quantidade de AIA produzida por *Pseudomonas* spp. (10200 a 31200 $\mu\text{g.l}^{-1}$) (Malik e Sindhu, 2011), assim como expressiva produção de AIA para as espécies *P. putida* (116000 $\mu\text{g.l}^{-1}$) e *P. fluorescens* (89000 $\mu\text{g.l}^{-1}$) (Meliani et al., 2017). Vale ressaltar que também já foram descritas baixa quantidade produzida e alta variabilidade na produção de ácido indol acético para *Pseudomonas* spp. (mínimo de 0.00091 e máximo de 0.00449 $\mu\text{g.l}^{-1}$) (Ashraf et al., 2011).

O gênero *Pseudomonas* tem se destacado, especialmente por sua capacidade de produzir metabólitos envolvidos na promoção do crescimento, além de atuar como agentes biocontroladores. Devido à produção de ácido indol acético, estudos apontam que a inoculação de *Pseudomonas* spp., pode proporcionar o crescimento/desenvolvimento das raízes bem como aumentar o número de pelos radiculares (Pedrinho et al., 2010). A exemplo, foi constatado o aumento de 100 % da raiz e parte aérea de grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.), bem como o

controle significativo do fungo *Macrophomina phaseolina*, causador da doença podridão de carvão nessa cultura (Khare Arora, 2010).

Vale ressaltar, que dentre as espécies subordinadas ao gênero, há relatos de produção de AIA e efeito estimulatório sobre o crescimento da parte aérea e desenvolvimento radicular, após inoculação, para as espécies *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens* (Meliani et al., 2017) e *Pseudomonas aeruginosa* (Khare Arora, 2010).

Os 33 isolados bacterianos, obtidos de plantas de arroz sob cultivo terras altas no Maranhão, foram identificados como *Pseudomonas aeruginosa* e apresentaram proximidade filogenética com as espécies *Comamonas sediminis*, *Stenotrophomonas tumulicola*, *S. maltophilia*, *Pseudomonas hibscicola*, *P. donghunensis*, *P. sihuiensis*, *P.guguanesis*, *Raoultella ornithinolytica* e *Celvibrio japonicus*.

Dentre os 33 isolados de *Pseudomonas aeruginosa*, 15 apresentaram capacidade de fixação biológica de nitrogênio (FBN) devido à comprovada redução de acetileno pela enzima nitrogenase, no entanto, ressaltamos que os isolados denominados SNf, DACAr, BACr, APf, SM3r e NBf se destacaram com os maiores valores de atividade da nitrogenase e também foram capazes de produzir o hormônio ácido indol acético (AIA), constituindo uma alternativa econômico-ambiental viável à produção agrícola em detrimento do uso excessivo de agroquímicos.

Procedimentos experimentais

Isolamento de bactérias obtidas de plantas de arroz (Oryza sativa L.)

Para a coleta foram selecionados campos produtores, sob cultivo de arroz de terras altas, contendo plantas uniformes, sadias e em fase vegetativa de desenvolvimento, nos municípios maranhenses de São Mateus, Igarapé do Meio, Bacabal, Belágua, Viana, Itapecuru, São Bento,

Presidente Juscelino, São Benedito do Rio Preto, Urbano Santos, Matinha, Arari e Governador Newton Bello.

Após a coleta, as plantas de arroz foram conduzidas ao Laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual do Maranhão – UEMA. Para o isolamento das bactérias, as plantas foram lavadas em água corrente, após retirada do excesso de umidade, foram retiradas 15 g de folhas e 15 g de raízes para imersão por 10 minutos (min) em água destilada estéril. Em seguida, porções de 10 g de ambas as partes da planta foram trituradas em liquidificador com 90 ml de solução salina ($8.5 \text{ g L}^{-1} \text{ NaCl}$) e então realizadas diluições seriadas de 10^{-3} a 10^{-6} , transferindo sucessivamente 0.1 ml da suspensão de cada diluição para frascos contendo 0.9 ml de solução salina. De cada uma das diluições, alíquotas de 100 μl foram transferidas para frascos de vidro de 15 ml contendo 5 ml do meio semi-sólido NFb livre de Nitrogênio, com a seguinte composição em g L^{-1} ácido málico, 5; K_2HPO_4 , 0.5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2; NaCl, 0.1; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.02; KOH, 4.5; e em mL: solução de micronutrientes, 2; solução de azul de bromotimol (0.5% em 0.2 KOH), 2; solução de FeEDTA (solução 1.64%), 4; e solução vitaminas, 1; pH 6.5. Os frascos com as diluições foram incubados a 30°C por sete dias para crescimento das bactérias diazotróficas (Dobereiner *et al.*, 1995).

Depois da formação de uma película fina na superfície, transferiu-se uma alíquota da cultura, com alça de platina para novo meio NFb Semi-Sólido e incubou-se à mesma temperatura, até a formação de uma nova película. Nessa fase, as culturas foram riscadas em placas contendo meio NFb Sólido (15 g ágar/litro) acrescido de 20 mg de extrato de levedura. Cinco dias após a incubação observou-se a formação de colônias bacterianas na superfície do meio de cultura.

Para purificação final, essas colônias foram transferidas para novo meio NFb Semi-sólido e após a formação da película foram estocadas e armazenadas à temperatura de 4°C .

Identificação molecular de isolados

Extração do DNA

A extração de DNA dos isolados bacterianos para as reações de PCR foi realizada pelo método de lise alcalina (Sambrook *et al.*, 1989), no Laboratório de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

As colônias foram repicadas em meio NFb sólido e mantidas à temperatura de 30 °C em BOD. Após crescimento, uma pequena quantidade de células bacterianas da colônia foi transferida com auxílio de uma ponteira para microtubos *eppendorf* contendo solução tampão (1N NaOH/ 10 % de SDS, Água Mili-Q esteril) (Nieman *et al.*, 1997), mantendo-as em Banho Maria a 65°C durante 15 min. Posteriormente, os microtubos foram colocados em gelo por 5 min, seguido de centrifugação a 13200 rpm por 40 segundos. Logo após adicionou-se 120 µL de TE 1X em cada microtubo, centrifugando-os novamente a 13200 rpm por 5 min a 4 °C. Por fim, retirou-se uma alíquota de 70 µL do sobrenadante (DNA) e transferiu-se para um novo microtubo armazenando-os a 4°C.

Amplificação, purificação dos fragmentos e sequenciamento do gene 16S rDNA

Para identificação molecular dos isolados, o gene 16S rDNA foi amplificado utilizando os *primers* 27F (5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG - 3') e 1492R (5'- GGTTACCTTGTACGACTT - 3') (Lane, 1991). A reação de PCR foi constituída por 1 µl de DNA (30 ng/ µl), 1 µl de cada *primer* (0.4 µM), 2 µl de tampão de reação (10 X), 0.7 µl de MgCl₂ (3 mM), 0.8 µl dNTPs (0.125 mM), 0.1 µl de GoTaq DNA polimerase (1U/ µl) (Invitrogen, Carlsbad, EUA) em volume total de 20 µl. Os ciclos de amplificação foram compostos de desnaturação inicial a 95°C por 3 min, seguida de 35 ciclos de amplificação constituído de desnaturação a 95°C por 30 seg, anelamento a 60°C por 45 seg e extensão a 72 °C por 2 min e 30 seg, finalizando com elongação final, de 72 °C por 7 min, mantendo a reação a 4 °C. Em seguida, 5 µl do produto da reação de PCR com corante FSUDs (2 µl) foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1 % (m/v) a 60 V por 1 hora. O gel de agarose foi corado com Brometo de Etídeo (0.5 µg ml⁻¹) e lavado em água destilada. As bandas de DNA

foram visualizadas em transiluminador UV acoplado a um sistema de foto documentação MultiDoc-it® (UVP). O marcador de tamanho molecular utilizado foi de 1 kb DNA Ladder® (BIOLABS).

Os fragmentos do gene 16S rDNA amplificados foram purificados com enzimas *exo/SAP*, com $0.66 \mu\text{g ml}^{-1}$ da enzima *exo* (3.3 U), $0.66 \mu\text{g ml}^{-1}$ *SAP* (0.66 U) e $0.66 \mu\text{l}$ de água milli-Q estéril em $20 \mu\text{l}$ de DNA (16S amplificado). As amostras foram dispostas em tubos *ependorf* de $200 \mu\text{g ml}^{-1}$ com $2 \mu\text{l}$ do mix (*exo+sap+água*) + $20 \mu\text{l}$ de DNA para cada amostra, que foram levadas ao termociclador por 60 min a 37°C , 15 min a 85°C e finalmente mantendo 4°C .

Para a reação de sequenciamento, foram utilizados $3 \mu\text{l}$ de DNA (400-600 ng), $0.7 \mu\text{l}$ do primer 27F a 10 pmol, $0.7 \mu\text{l}$ de reativo de sequenciamento Big Dye terminator, $2 \mu\text{l}$ do Tampão Save Money e $3.6 \mu\text{l}$ de água milli-Q estéril, no volume final de $10 \mu\text{l}$. As amostras foram dispostas em placa de 96 poços, com $6.4 \mu\text{l}$ do mix + $3 \mu\text{l}$ de DNA para cada amostra.

A placa de 96 poços foi levada ao termociclador com os seguintes parâmetros: 1 ciclo de 3 min a 96°C , 35 ciclos de 96°C por 15 seg, 60°C por 5 seg e 60°C por 4 min e mantidas a 4°C . Após a amplificação, foi realizado o protocolo de precipitação, onde em uma nova placa de 96 poços para cada amostra foram adicionados $10 \mu\text{l}$ da amostra amplificada, $2 \mu\text{l}$ de Acetato de Amônio (7.5 M), 3 volumes de etanol absoluto e $10 \mu\text{l}$ de água milli-Q. Esta placa foi colocada no freezer por 15 min, e centrifugada a 3700 rpm a 20°C por 45 min. Após o descarte do sobrenadante o *pellet* foi lavado com $150 \mu\text{l}$ de etanol 80 % e centrifugado novamente durante 20 min a 3700 rpm a 20°C . O etanol 80 % foi descartado e as amostras foram deixadas para secar sob vácuo, por cerca de 30 min. Após a secagem, as amostras foram tratadas com $10 \mu\text{l}$ de HiDi formamida e levadas para o aparelho de sequenciamento ABI3500 X1 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems – HITACHI).

Análise das Sequências do Gene 16S rDNA

As sequências obtidas pelo sequenciador ABI3500 XI no formato do programa *Ab1sequencing Analises* foram exportados no formato FASTA, através do programa Bioedit (Hall, 1999). Para a busca de similaridade, foi realizada a análise dos dados através do programa BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool* (Altschul *et al.*, 1997) usando o banco de dados do GenBank, disponível em www.ncbi.nlm.nih.gov. Através do BLAST foi possível determinar a identidade das sequências dos isolados através de alinhamentos locais entre as regiões da sequência desconhecida (a que se deseja pesquisar) e sequências existentes do banco de dados para o gene 16S rDNA, resultando em uma lista de sequências com o nome do gene e organismo a qual ele pertence.

Análises Filogenéticas do gene 16S rDNA

As análises filogenéticas foram realizadas utilizando o programa MEGA 6 (Tamura *et al.*, 2013). As sequências foram alinhadas usando o CLUSTALW implementado no MEGA 6 e ajustadas ao melhor modelo de substituição de nucleotídeos. A árvore filogenética foi construída para o gene 16S rDNA e a significância dos agrupamentos foi estimada pela análise de 1000 repetições de *bootstrap* em comparação as demais sequências depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

Atividade de redução do acetileno (ARA)

A atividade da nitrogenase dos isolados foi avaliada pelo método de Redução de Acetileno (ARA) (Boddey *et al.*, 1990). Foram cultivadas colônias em meio sólido NFb e em seguida foram raspadas com palitos esterilizados e transferidos para frascos de 10 ml contendo 4 ml de meio semi-sólido de NFbHp. As colônias de cada isolado foram incubadas a 30 °C durante 24 horas para formação de uma fina película.

Após a formação da película os frascos foram fechados com rolhas de borracha perfurável esterilizadas, e injetou-se 500 µl de acetileno para incubação por 1 hora a 30 °C.

No cromatógrafo de gás com ionização de chama, Perkin Elmer Auto System II, utilizando uma coluna Poropak N de 150 cm a 100 °C, foi injetado 500 µl de etileno para leitura do pico padrão desse gás. Posteriormente, 0.5 ml da fase gasosa do frasco foi retirada e injetada no cromatógrafo para análise do teor de etileno, gás indicador da atividade da nitrogenase.

Avaliação da produção de ácido indol acético in vitro (AIA)

A análise de produção de ácido indol acético foi realizada com adaptações, pelo método colorimétrico (Bric *et al.*, 1991). Para isto, apenas os isolados com maior capacidade comprovada de atividade de redução do acetileno (ARA) na pesquisa, foram inoculados em tubo de ensaio contendo 5 ml do meio de cultura NFb suplementado com 1gl⁻¹ de L-triptofano (precursor para a síntese do ácido indol acético). Os tubos foram incubados a 28°C por três dias para o crescimento das bactérias sob constante agitação em Shake, a 150 rpm. Utilizou-se quatro réplicas para cada isolado bacteriano. Após o período de incubação, 1.5 ml de cada cultura homogeneizada foi transferida para microtubos *epENDORF* e centrifugado a 12000 rpm por dois min. Os microtubos foram retirados da centrífuga e 1 ml do sobrenadante foram transferidos para novos microtubos e adicionados 2 ml do reagente de Salkowski, constituído por: 1 ml de FeCl₃. 6H₂O 0.5 M (1.35 g/10ml) adicionado a 49 ml de HClO₄ a 35% (Gordon e Weber, 1951). Trinta min após a adição do reagente (no escuro) foi realizada a leitura da placa no comprimento de onda de 530 nm, utilizando o aparelho espectrofotômetro UV visível - Biospectro - sp 220. A concentração dos compostos indólicos foi estimada com uma curva-padrão previamente preparada com quantidades conhecidas de ácido indol acético comercial (0; 10; 20; 40; 80; 100 µg/ml de AIA puro). A coloração rósea indicou a produção do hormônio pelas bactérias. Os dados expressos em µg ml⁻¹ foram submetidos à análise de variância e ao teste de Tukey a 5 % de significância para comparação de médias.

Referências

- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A, Zhang, J., and Zhang, Z. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**: 3389 - 3402.
- Alves, G.C., Videira, S.S., Urquiaga, S., and Reis, V. M. (2015) Differential plant growth promotion and nitrogen fixation in two genotypes of maize by several *Herbaspirillum* inoculants. *Plant Soil* **387**: 307-321.
- Annapurna, K., Govindasamy, V., Sharma, M., Rajrana, Y., Swarnalakshmi, K., Ghosh, A., and Chikara, S.K. (2017) Draft Genome Sequence of *Pseudomonas stutzeri* Strain KMS 55, an Endophytic Diazotroph Isolated from Rice Roots. *AMS* **5**:1-2.
- Ashraf, M.A., Rasool, M., and Mirza, M.S. (2011) Nitrogen Fixation and Indole Acetic Acid Production Potential of Bacteria Isolated from Rhizosphere of Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *Adv Biol Res* **5**: 348-355.
- Boddey, R.M., Boddey, L.H., and Urquiaga, S. (1990) A técnica de redução de acetileno na medição da fixação biológica de nitrogênio. Embrapa-Cnpbs. p. 37.
- Bommarco, R., Kleijn, D., and Potts, S.G. (2013) Ecological intensification: harnessing ecosystem services for food security. *Trends Ecol. Evol.* **28**: 230–238.
- Breda, F.A.F., Silva, T.F.R., Santos, S.G., Alves, G.C., and Reis, R.M. (2019) Modulation of nitrogen metabolism of maize plants inoculated with *Azospirillum brasilense* and *Herbaspirillum seropedicae*. *Arch. Microbiol.* **201**: 547-558.
- Bric, J.M., Bostock, R.M., and Silverstone, S.E. (1991) Rapid In Situ Assay for Indoleacetic Acid Production by Bacteria Immobilized on a Nitrocellulose Membrane. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 535–538.
- Döbereiner, J., Baldan, V.L.D., and Baldani, J.I. (1995) Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. Brasília: Embrapa-Cnpab, 1-60.

- Estrada, G.A., Baldani, V.L.D., Oliveira, D.M., Urquiaga, S., and Baldani, J.I. (2013) Selection of phosphate-solubilizing diazotrophic *Herbaspirillum* and *Burkholderia* strains and their effect on rice crop yield and nutrient uptake. *Plant Soil* **369**: 115–129.
- Ferreira, E.P.B, Knupp, A.M., and Didonet, C.C.G.M. (2014) Crescimento de cultivares de arroz (*Oriza sativa* L.) influenciado pela inoculação com bactérias promotoras de crescimento de plantas. *Biosci. J* **30**: 655- 665.
- Finkmann, W., Altendorf, K., Stackebrandt, E., and Lipski, A. (2000). Characterization of N₂O-producing Xanthomonas-like isolates from biofilters as *Stenotrophomonas nitritireducens* sp. nov., *Luteimonas mephitis* gen. nov., sp. nov. and *Pseudoxanthomonas broegbernensis* gen. nov., sp. nov. *Int J Syst Evol Micr* **50**: 273-282.
- Freitas, I.C.V., Rodrigues, M.B. (2010) Fixação biológica do nitrogênio na cultura do milho. *Agropecuária Técnica* **31**: 143-154.
- Godfray, H.C.J., Beddington, J.R., Crute, I.R., Haddad, L., and Lawrence, D. (2010) Food security: The challenge of feeding 9 billion people. *Science* **32**: 812–818.
- Gordon, A.S., and Weber, R.P. (1951) Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Plant Physiol* **26**: 192-195.
- Hall, T.A. (1999) Bioedit: user-friendly ibiological sequence alignment editor and analyses program for Windows 95/98/NT. *Nucleic. Acids Symposium Series* **41**: 95 - 98.
- Kamga, A., Kouamé, C., Tchindjang, M., Chagomoka, T., and Changomoca, C. (2013) Environmental impacts from overuse of chemical fertiliser and pesticides amongst market gardening in Bamenda Cameroon. *RSTBC* **1**: 6 – 19.
- Ke, X., Feng, S., Wang, J., Lu, W., Zhang, W., Chen, M., and Lin, M. (2019) Effect of inoculation with nitrogen-fixing bacterium *Pseudomonas stutzeri* A1501 on maize plant growth and the microbiome indigenous to the rhizosphere. *Syst Appl Microbiol* **42**: 248–260.

- Khare-Arora, N.K., (2010) Effect of Indole-3-Acetic Acid (IAA) Produced by *Pseudomonas aeruginosa* in Suppression of Charcoal Rot Disease of Chickpea. *Curr Microbiol* **61**: 64-68.
- Kifle, M.H., and Laing, M.D. (2016) Isolation and Screening of Bacteria for Their Diazotrophic Potential and Their Influence on Growth Promotion of Maize Seedlings in Greenhouses. *Front. Plant Sci.* **6**: 1-8.
- Lane, D.J. 16S/23S rRNA sequencing (1991). In E. Stackebrandt, & M. Goodfellow, (Eds.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics* (pp115-175). New York: Wiley.
- Lin, H., Hu, S., Liu, R., Chen, P., Ge, C., Zhu, B., and Guo, L. (2016) Genome Sequence of *Pseudomonas koreensis* CRS05-R5, an Antagonistic Bacterium Isolated from Rice Paddy Field. *Front Microbiol* **7**: 1- 5.
- Lucon, C.M.M., Akamatsu, M.A., and Harakava, R. (2008) Promoção de crescimento e controle de tombamento de plântulas de pepino por rizobactérias. *Pesq. Agropec. Bras.* **43**: 691-697.
- Malik, D.K., and Sindhu, S.S. (2011) Production of indole acetic acid by *Pseudomonas* sp.: effect of co inoculation with *Mesorhizobium* sp. Ciceron nodulation and plant growth of chickpea (*Cicer arietinum*). *Physiol Mol Biol Plants* **17**: 25-32.
- Meliani, A., Bensoltane, A., Benidire, L. and Oufdou, K. (2017) Plant Growth-Promotion and IAA Secretion With *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*. *J Bot. Sci.* **6**: 16-24.
- Moreira, C.D.A., Pereira, D.H., Coimbra, R.A., and Moreira, I.D.A. (2014) Germinação de Gramíneas Forrageiras em Função da Inoculação de Bactérias Diazotróficas. *Sci. Elec. Archi* **6**: 90-96.
- Moreira, F.M.S., and Siqueira, J.O. (2006) *Microbiologia e bioquímica do solo* (2 ed.) Lavras: UFLA.

- Mus F., Matthew, B.C., Kevin, G., Amaya, G. C., Barney, R. G., Evangelia, D. K., and Ponraj, P. (2016) Symbiotic nitrogen fixation and the challenges to its extension to nonlegumes. *Appl. Environ. Microbiol.* **82**: 3698–3710.
- Nieman, S., Puehler, A., Tichy, H.V., Simon, R., and Selbitschka, W. (1997) Evaluation of the resolving power three different DNA fingerprinting methods to discriminate among isolates of a natural *Rhizobium meliloti* population. *J. Appl. Microbiol* **82**: 477- 484.
- Pedrinho, E.A.N., Galdiano Júnior, R.F., Campanharo, J.C., Alves, L.M.C., Lemos, E.G.M. (2010) Identificação e avaliação de rizobactérias isoladas de raízes de milho. *Bragantia* **69**: 905-911.
- Pham, V.T.K., Rediers, H., Ghequire, M.G.K., Nguyen, H.H., De Mot, R., Vanderleyden, J., and Spaepen, S. (2017) The plant growth-promoting effect of the nitrogen-fixing endophyte *Pseudomonas stutzeri* A15. *Arch Microbiol.* **199**: 513- 517.
- Phetcharata, P., and Duangpaeng, A. (2012) Screening of Endophytic Bacteria from Organic Rice Tissue for Indole Acetic Acid Production. *Procedia Eng.* **32**: 177 – 183.
- Reis, V.M., and Teixeira, K.R.S. (2005) Fixação biológica de nitrogênio. In: Aquino AM, Assis RL (Ed.). Processos biológicos no sistema solo- planta: ferramentas para uma agricultura sustentável. Brasília, DF: Embrapa Agrobiologia (Cápítulo 4).
- Resendez, A.M., Mendonza, V.G., Carrilo, J.L.R., Arroyo, J.V., and Ríos, P.C. (2018) Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal: una alternativa de biofertilización para la agricultura sustentable. *Rev. Colomb. Biotecnol* **20**: 68-83.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, R. (1989). *Molecular Cloning: A laboratory Manual*, (2nd ed.). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring. P. 1659.
- Santoyo G, Moreno-Hagelsiebb G, Orozco-Mosqueda MC and Glickc BR (2012). Plantgrowth-promoting bacterial endophytes. *Microbiol. Res.* **183**: 92-99.

Shabanamol, S., and Jisha, M. (2014) Assessment of rice endophytic diazotrophic Bacteria for biocontrol of rice sheath blight. *ISRJ* **3**: 1-6.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., and Kumar, S. (2013) MEGA 6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis, version 6.0. *Mol Biol Evol* **30**: 2725 - 2729.

Zhang, Y.H.P., Himmel, M.E., and Mielenz, J.R. (2006) Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. *Biotechnol. Adv* **24**: 452-481.

Tabela 1. Lista de código dos isolados bacterianos coletados em municípios maranhenses sob cultivo de arroz de terras altas.

Localidade	Código GenBank	Isolados
Arari	MN720543	ARAF
	MN720541	BACf
Bacabal	MN720542	BACr
	MN720555	CATEr
	MN720554	CATEf
	MN720536	ASAf
Belágua	MN720552	EBLr
	MN720545	SNr
	MN720544	SNf
	MN720527	ABf
	MN720534	CRf
	MN720535	IGAf
	MN720529	355f
	MN720537	APf
	MN720528	ABr
	MN720551	PRr
Itapecuru	MN720550	ITAr
	MN720549	ITAf
Governador Newton Bello	MN720539	NBf
	MN720540	NBr
São Benedito do Rio Preto	MN720538	ECOCf
	MN720531	ESBr
	MN720557	VERM SBr
	MN720556	VERM SBf
São Bento	MN720530	SBf
	MN720531	SBr
São Mateus	MN720526	SM2r
	MN720525	SM2f

	MN720547	SM3r
	MN720546	SM3f
Urbano Santos	MN720533	DACAr
	MN720532	DACAf
	MN720548	AVf

*As letras minúsculas “f” e “r” nos códigos dos isolados, representam isolamento da folha e raiz respectivamente.

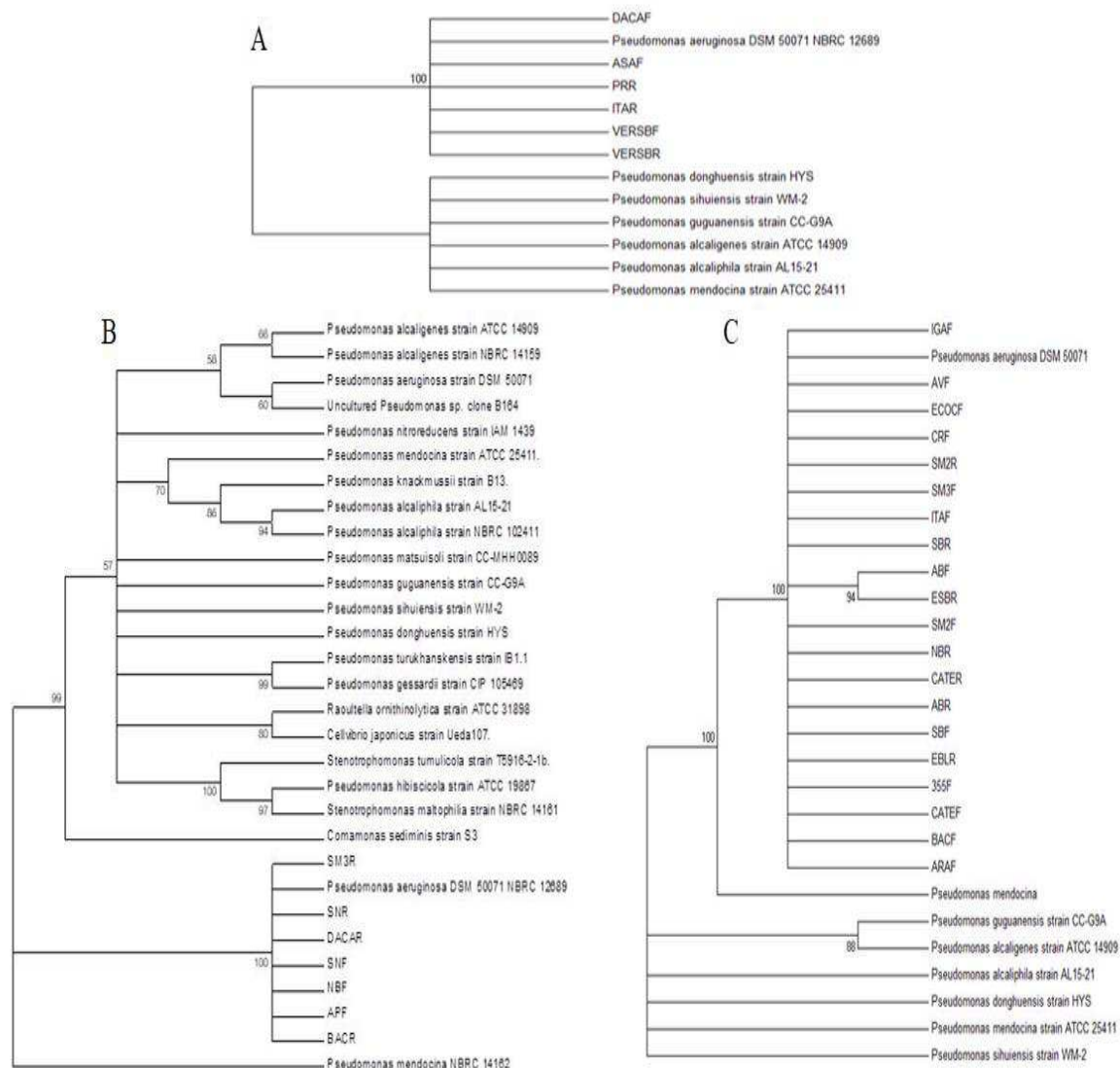


Fig. 1. Árvore filogenética representada com base na similaridade entre as sequências obtidas e organismos de referência dos isolados de *Pseudomonas* derivados de sequências do gene de 16SrDNA.

A. Método estatístico de Maximum Likelihood (ML) e com base em 1000 réplicas de bootstrap. Distâncias evolutivas foram calculadas utilizando o modelo Jukes-Cantor (JC).

B. Método estatístico de máxima semelhança (MS) e com base em 1000 réplicas de bootstrap. Distâncias evolutivas foram calculadas utilizando o modelo Jukes-Cantor (JC).

C. Método estatístico de máxima semelhança (MS) e com base em 1000 réplicas de bootstrap. Distâncias evolutivas foram calculadas utilizando o modelo Kimura 2-parameter.

Tabela 2. Atividade da Nitrogenase e Produção de Etileno dos 15 isolados bacterianos identificados como *Pseudomonas aeruginosa*, obtidos de plantas de arroz, sob cultivo terras altas no Maranhão.

Isolados	Atividade da Nitrogenase (nmolC ₂ H ₄ h ⁻¹)	Produção de Etileno (nmolC ₂ H ₄ da cultura.h ⁻¹)
SNf	26.66	108.85
DACAr	5.58	38.94
BACr	4.93	24.79
APf	2.01	5.36
SM3r	1.87	4.11
NBf	1.45	3.44
335f	0.42	1.32
SNr	0.38	2.5
IGAf	0.13	0.93
PMr	0.13	0.8
ITAr	0.11	0.8
SM2f	0.11	0.27
CATr	0.1	0.25
PRr	0.07	0.25
ABr	0.05	0.2

*As letras minúsculas “f” e “r” nos códigos dos isolados, representam isolamento da folha e raiz respectivamente.

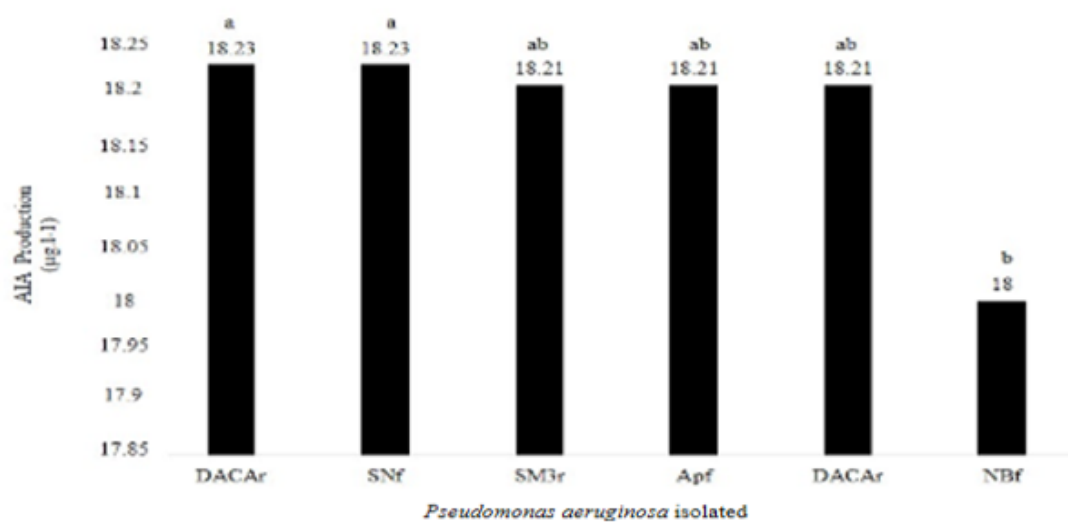


Fig. 2. Produção de ácido indol acético (AIA) de isolados de *Pseudomonas aeruginosa*.

Capítulo 3

ASPECTOS AGRONÔMICOS, PRODUTIVOS E SANITÁRIOS DO ARROZ DE TERRAS ALTAS INOCULADO COM *Pseudomonas aeruginosa*

Artigo redigido para submissão à Revista Acta
Scientiarum Agronomy

ASPECTOS AGRONÔMICOS, PRODUTIVOS E SANITÁRIOS DO ARROZ DE TERRAS ALTAS INOCULADO COM *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa sobre cultivo de arroz

ABSTRACT

O objetivo da pesquisa foi avaliar o potencial da espécie *Pseudomonas aeruginosa* quanto à capacidade de aumentar os teores de nitrogênio na planta e desta forma beneficiar os aspectos agronômicos, produtivos e sanitários do arroz, sob sistema de cultivo terras altas no Maranhão, Brasil. Foram instalados dois experimentos de campo em dois anos consecutivos, ambos em blocos ao acaso, com sete tratamentos e quatro repetições na cidade de Santa Rita-MA, e oito tratamentos e quatro repetições em Pirapemas-MA. Os tratamentos foram constituídos de microbiolização de sementes de arroz cultivar primavera, com duas cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, com e sem associação à pulverização de solução bacteriana e adubação com NPK. Em ambos os experimentos, os tratamentos controle foram designados como testemunha absoluta (sem microbiolização e adubo) e testemunha adubada. O efeito da bactéria foi avaliado quanto ao desenvolvimento inicial das plantas, parâmetros agronômicos e produtivos, teor de nitrogênio em g.kg^{-1} e sanidade, avaliada através da severidade das doenças mancha parda, mancha estreita, mancha foliar e escaldadura. Constatou-se efeito significativo da bactéria sobre a porcentagem de germinação e altura inicial das plantas (cm), massa de 1000 grãos (g), percentual de grãos inteiros, matéria seca da planta (g), número de panículas, altura total no final do ciclo (m), teor de nitrogênio na parte aérea, produção de grãos de arroz e redução da severidade das doenças mancha parda, mancha foliar e escaldadura. Os tratamentos sob influência de *P. aeruginosa* foram iguais ou superiores à testemunha adubada, evidenciando o potencial de uso da bactéria como alternativa econômica e ecológica ao uso excessivo de fertilizantes e pesticidas.

Palavras chaves: inoculação de sementes; bactérias diazotróficas; teor de nitrogênio; doenças do arroz.

INTRODUÇÃO

A segurança alimentar global depende dos cereais predominantes na dieta humana. Dentre os mais importantes para a economia agrícola nacional e mundial, destaca-se o arroz (*Oryza sativa* L.) como o principal alimento consumido por mais da metade do planeta (FAO, 2018).

Devido à importância socioeconômica da cultura, diversos estudos foram realizados visando manter a alta produtividade do arroz. Há um consenso geral de que o bom rendimento da cultura é inerente à adubação nitrogenada e ao controle efetivo de doenças (Freitas et al., 2010; Huang, Fan, & Zou, 2019). Entretanto, ressalta-se que o excesso de nitrogênio, bem como, o uso incorreto de pesticidas, oneram os custos da produção, além de favorecerem o surgimento de doenças, raças resistentes de fitopatógenos e impactos ambientais negativos (Damalas & Eleftherohorinos, 2011; Santos, Nogueira, & Hungria, 2019).

Desta forma, a busca por alternativas sustentáveis que atendam à demanda da cultura é crescente. Estudos relatam que, bactérias diazotróficas apresentam potencial biofertilizante e biopesticida, podendo substituir parcialmente o uso de fertilizantes e pesticidas químicos, como uma alternativa ecológica e econômica a seus equivalentes sintéticos (Souza Junior et al., 2017; Batista & Dixon, 2019). As bactérias diazotróficas promovem benefícios como enriquecimento do solo, por meio da fixação biológica de nitrogênio (FBN), solubilização de fosfatos, liberação de substâncias reguladoras do crescimento das plantas (López-Ortega et al., 2013), controle de patógenos através da produção de metabólitos e indução de resistência (Souza Junior et al., 2017), além disso, aceleram a germinação e crescimento de mudas em campo e melhoram os aspectos produtivos das plantas (Schultz et al., 2014; Schaefer, Martin, & Pizzani, 2019; Numoto et al., 2019).

Pesquisas apontam a associação de espécies do gênero *Pseudomonas* ao sistema radicular de plantas de arroz e destacam a viabilidade econômica e ambiental da inoculação de tais microrganismos, com efeitos positivos sobre a FBN (Pham et al., 2017), controle efetivo de doenças (Ludwig, Moura, & Santos, 2009; Souza Júnior et al., 2017) e parâmetros agrônômicos relacionados ao desenvolvimento e rendimento das plantas (Yasmin et al., 2016).

Com base neste enfoque, o objetivo da pesquisa foi avaliar o comportamento da espécie *Pseudomonas aeruginosa* quanto à capacidade de aumentar os teores de nitrogênio na planta e

desta forma beneficiar os aspectos agronômicos, produtivos e sanitários do arroz, sob sistema de cultivo terras altas no Maranhão.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo

A pesquisa foi realizada nos municípios de Santa Rita e Pirapemas, ambos pertencentes à Mesorregião Norte do Estado do Maranhão, Brasil, que se caracteriza por clima sub-úmido, temperatura anual média de 27°C, Umidade Relativa do Ar anual média de 82% e precipitação pluviométrica de 1900 a 2300 mm por ano, com períodos de chuva e estiagem bem definidos. As classes de solo predominantes são ARGISSOLO VERMELHO AMARELO Pétrico e LATOSSOLO Amarelo (Nugeo, 2015).

Para a caracterização química do solo das áreas experimentais em Santa Rita e Pirapemas, foram coletadas subamostras de 20 pontos aleatórios a uma profundidade de 20 cm. A análise de solo foi realizada no Laboratório de Solos da Universidade Estadual do Maranhão-UEMA. (Tabela 1).

Tabela 1. Caracterização química do solo das áreas experimentais em Santa Rita e Pirapemas à profundidade de 20 cm.

Área experimental	M.O g/dm ³	pH CaCl ₂	P mg/dm ³	Kmmol/dm ³	Ca	Mg	H+Al	Na	Al	V%
Santa Rita	28	4.3	23	0.9	24	14	25	2.3	2	62.23
Pirapemas	3	4.1	3	2.1	10	11	23	5.6	9	55.51

M.O = Matéria Orgânica; P = Fósforo; K = Potássio; Ca = Cálcio; Mg = Magnésio; H+Al = Hidrogênio mais Alumínio; Na = Sódio; Al = Alumínio; V% = Saturação por base.

Delineamento experimental e desenvolvimento da pesquisa

Foram instalados dois experimentos de campo no período de março a maio de 2018, em Santa Rita - MA (03° 03' 40" S e 44° 16' 54" W) e março a maio de 2019, em Pirapemas - MA (03° 43' 24,1" S e 44° 14' 24,9" W).

Em ambos os experimentos foram utilizadas sementes de arroz da cultivar BRS Primavera após a microbiolização com dois isolados de *Pseudomonas aeruginosa*, designados como bactéria 1 (B1) e bactéria 2 (B2), registradas no GenBank como MN720544 e MN720533,

respectivamente (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), ambas com comprovada atividade nitrogenase. As bactérias compõem a coleção de Fitopatógenos da micoteca prof. Gilson Soares da Silva, Laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual do Maranhão – UEMA.

Para o processo de microbiolização as sementes de arroz foram imersas durante 24 horas sob agitação constante a 50 RPM em suspensão preparada com solução salina (NaCl 0.85 %) de cada um dos isolados, após 48 h de crescimento a 28 °C em meio King B ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1.5 g; K_2HPO_4 , 1.5g; glicerina, 10 ml; para 1000 ml de H_2O destilada; pH 7.2) (King, Ward, & Raney, 1954). As concentrações foram ajustadas para 10^8 UFC/mL em espectrofotômetro ($A_{540} = 0.5$). De forma semelhante também foi preparada solução bacteriana ($A_{540} = 0.7$) para pulverização das plantas após 30 e 60 dias de semeadura.

O primeiro experimento foi conduzido em delineamento de blocos ao acaso, com sete tratamentos e quatro repetições. Os tratamentos foram definidos como: T1- testemunha adubada, T2- testemunha absoluta, T3- microbiolização das sementes com B1 mais adubação, T4- microbiolização das sementes com B2 mais adubação, T5- microbiolização das sementes com B1 mais pulverização da solução de B1 aos 30 e 60 dias após semeadura mais adubação, T6- microbiolização das sementes com B2 mais pulverização da solução de B2 aos 30 e 60 dias após semeadura mais adubação e T7- microbiolização das sementes com B1B2 mais pulverização da solução de B1B2 aos 30 e 60 dias após semeadura mais adubação. Para os tratamentos que receberam adubação utilizou-se 40 kg.ha⁻¹ de N, na forma de Ureia; 80 kg. ha⁻¹ de P₂O₅ na forma de Superfosfato Simples e 60 kg. ha⁻¹ de K₂O na forma de Cloreto de Potássio.

A área total deste experimento foi de 18 m x 47 m (738 m²), com 2 m de distância entre os blocos e 1m entre as parcelas dimensionadas em 3 m x 5 m (15 m²). O espaçamento utilizado entre as plantas foi de 0.1 m e entre as fileiras foi de 0.5 m totalizando 300 plantas por parcela. No entanto, para efeito de avaliação experimental, adotou-se como área útil das parcelas, apenas as quatro fileiras centrais desconsiderando as duas primeiras e últimas plantas (7.2 m²).

O segundo experimento consistiu na repetição do primeiro, com algumas adaptações. O delineamento experimental também foi em blocos ao acaso, neste, com oito tratamentos e quatro repetições. Os tratamentos foram definidos como: T1- testemunha absoluta, T2- testemunha adubada, T3- microbiolização das sementes com B1 mais pulverização da solução B1 aos 30 e 60 dias após semeadura, T4- microbiolização das sementes com B2 mais pulverização da solução de B2 aos 30 e 60 dias após a semeadura, T5- microbiolização das sementes com B1 mais pulverização da solução de B1 aos 30 e 60 dias após semeadura mais adubação, T6- microbiolização das sementes com B2 mais pulverização da solução de B2 aos

30 e 60 dias após semeadura mais adubação, T7- microbiolização das sementes com B1B2 mais pulverização da solução de B1B2 aos 30 e 60 dias após semeadura e T8- microbiolização das sementes com B1B2 mais pulverização da solução de B1B2 aos 30 e 60 dias após semeadura mais adubação. Para os tratamentos que receberam adubação utilizou-se 40 kg.ha⁻¹ de N, na forma de Ureia; 80 kg. ha⁻¹ de P₂O₅ na forma de Superfosfato Simples e 60 kg. ha⁻¹ de K₂O na forma de Cloreto de Potássio.

A área total do deste experimento foi de 27 m x 61 m (1647 m²), com 5 m de distância entre os blocos e 3 m entre as parcelas dimensionadas em 3 m x 5 m (15 m²). Adotou-se o mesmo espaçamento e mesma área útil do experimento anterior.

Parâmetros avaliados

Inicialmente avaliou-se o efeito da inoculação das bactérias sobre o desenvolvimento inicial das plantas através da porcentagem de emergência e mensuração da altura aos 5, 10 e 15 dias após o plantio (DAP).

Para avaliação dos parâmetros agronômicos e produtivos utilizou-se metodologia de Tavares, Faloni, e Bassoi (2014) com adaptações. Foram avaliados: (1)- Matéria seca das plantas na antese e maturação utilizando quatro plantas por parcela. Para isso as plantas foram secas em estufa com temperatura de aproximadamente 60°C até atingir massa constante (72 horas); (2)- Massa de 1000 grãos; (3)- Massa de grão/ planta, obtida pela razão entre a massa seca dos grãos e amostragem de 20 plantas por parcela; (4)- Percentual de grãos inteiros, (5)- Altura total (m) considerando 10 plantas ao acaso por parcela no final do ciclo e (6)- Número de panículas na área útil (7,2 m²).

O Teor de Nitrogênio (TN) em g.kg⁻¹ nas plantas e grãos de arroz foi determinado pelo método de Kjeldahl, no qual amostras de 0.2 g secas e trituradas foram digeridas, destiladas e tituladas, conforme descrição de Tedesco, Gianello, e Bissani (1995). Foram coletadas 4 plantas por parcela para determinação do TN na parte aérea e 20 plantas para a determinação do TN nos grãos.

Para atestar o efeito de controle de doenças pela bactéria avaliou-se a severidade das doenças mancha parda (*Bipolaris oryzae* (Breda de Haan), escaldadura (*Gerlachia oryzae* (Hashioka & Yokogi) W. Gams (Sousa júnior et al., 2017), mancha estreita (*Cercospora oryzae* Miyake) (Silva-Lobo & Fillippi, 2017) e mancha foliar (*Curvularia lunata* (Wakker) Boedijn Meyer) (Silva et al., 2014), no final do ciclo da cultura, em amostragem de 10 plantas por parcela, selecionadas ao acaso.

A severidade das doenças mancha parda e mancha estreita foi avaliada através da escala de nota do International Rice Research Institute (IRRI, 1996). Em função da alta severidade da

escaldadura, considerou-se a área da lesão em relação à área total da folha avaliada, sendo a nota atribuída através da relação percentual entre o tamanho da lesão e o tamanho da folha. Já a severidade da mancha foliar foi avaliada por meio de nota atribuída em função do número de lesões na folha.

Análise estatística

Os dados obtidos em campo foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0.05$) e ($p < 0.10$) utilizando o programa estatístico InfoStat versão 2017. 1. 2. Para a severidade de doenças os dados foram transformados para \sqrt{X} e percentil range, antes de serem submetidos à análise de variância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A inoculação das sementes de arroz cultivar BRS primavera com solução de *Pseudomonas aeruginosa* favoreceu o desenvolvimento inicial das plantas aos cinco DAP, em ambos os experimentos. No município de Santa Rita houve diferença significativa entre os tratamentos apenas para a variável altura, mas no município de Pirapemas os tratamentos diferiram entre si também a a porcentagem de germinação (tabelas 2 e 3).

Tabela 2. Valores médios de altura total e taxa de germinação de plantas de arroz, cultivar primavera, cinco dias após o plantio, em Santa Rita -MA, Brasil.

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
AT (cm)	1.93 ab	1.61 b	1.91 ab	2.38 a	1.70 b	2.09 ab	2.15 ab
GER (%)	73.36 a	51.63 a	52.71 a	66.12 a	51.44 a	55.79 a	54.52 a

*Médias seguidas de mesma letra, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. AT- altura total; GER- Germinação; T1- testemunha adubada, T2- testemunha absoluta, T3- microbiolização das sementes com B1 mais adubação, T4- microbiolização das sementes com B2 mais adubação, T5- microbiolização das sementes com B1 mais pulverização da solução de B1 aos 30 e 60 dias após semeadura mais adubação, T6- microbiolização das sementes com B2 mais pulverização da solução de B2 aos 30 e 60 dias após semeadura mais adubação e T7- microbiolização das sementes com B1B2 mais pulverização da solução de B1B2 aos 30 e 60 dias após semeadura mais adubação.

Tabela 3. Valores médios de altura total e taxa de germinação de plantas de arroz, cultivar primavera, cinco dias após o plantio, em Pirapemas - MA, Brasil.

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
AT(cm)	5.6 ab	5.07 ab	6.03ab	6.1 a	4.39 b	5.61ab	5.49ab	5.93ab
GER(%)	24.05 ab	26.49 ab	24.73 ab	36.68 a	10.6 b	25 ab	36.01 a	30.84 ab

*Médias seguidas de mesma letra, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. AT- altura total; GER- Germinação; T1- testemunha adubada, T2- testemunha absoluta, T3- microbiolização das sementes com B1 mais pulverização da solução B1 aos 30 e 60 dias após sementeira, T4- microbiolização das sementes com B2 mais pulverização da solução de B2 aos 30 e 60 dias após a sementeira, T5- microbiolização das sementes com B1 mais pulverização da solução de B1 aos 30 e 60 dias após sementeira mais adubação, T6- microbiolização das sementes com B2 mais pulverização da solução de B2 aos 30 e 60 dias após sementeira mais adubação, T7- microbiolização das sementes com B1B2 mais pulverização da solução de B1B2 aos 30 e 60 dias após sementeira e T8- microbiolização das sementes com B1B2 mais pulverização da solução de B1B2 aos 30 e 60 dias após sementeira mais adubação.

Os resultados indicam o efeito positivo da interação entre os isolados de *P. aeruginosa* e a cultura do arroz, embora não tenha havido diferença significativa entre os tratamentos aos 10 e 15 dias após o plantio. A igualdade entre os tratamentos após o “arranque” inicial promovido pelas bactérias aos cinco DAP sugere que o desenvolvimento vegetativo da cultura está relacionado com as interações entre as características intrínsecas da espécie e cultivar, condições edafoclimáticas e técnicas de cultivo adotadas (Massessini et al., 2014).

A eficácia do gênero *Pseudomonas* no aumento das taxas de germinação de sementes e crescimento inicial de plantas, especialmente dos cereais, já foi comprovada em outros estudos. Como o de Elekhtyar (2015) que relatou diferenças significativas no percentual médio de germinação de sementes de arroz entre os tratamentos sem e com inoculação de *Pseudomonas fluorescens*, através da contagem diária de plantas germinadas durante 14 dias, por dois anos consecutivos. A autora descreveu taxas médias de 72.67% para sementes não inoculadas e 90% para sementes após a inoculação no ano de 2012. Em 2013 foi descrito o mesmo padrão, com médias de 70.65% e 86.67% respectivamente, para sementes sem e com inoculação de *P.*

fluorescens. De forma semelhante, Oliveira, Zucareli, e Spolaor (2012) também relataram o efeito positivo da inoculação de *P. fluorescens*, mas desta vez, sobre o crescimento inicial de plantas de milho em relação à adubação nitrogenada. Os autores expuseram que a altura média das plantas de milho após a inoculação das sementes (1.87 cm) foi estatisticamente igual à altura média das plantas adubadas (1.89 cm).

No que se referente aos aspectos agronômicos e produtivos avaliados, no primeiro experimento, em Santa Rita - MA, verificou-se diferença estatística significativa da inoculação de *P. aeruginosa* sobre os parâmetros massa de mil grãos, percentual de grãos inteiros, matéria seca da parte aérea das plantas na maturação e número de panículas por parcela. Os tratamentos com inoculação de bactérias não diferiram entre si, mas foram superiores à testemunha adubada para o parâmetro massa de mil grãos. Já para os parâmetros percentual de grãos inteiros, matéria seca das plantas na maturação e número de panículas por parcela, os tratamentos com bactéria foram estatisticamente superiores ou iguais à testemunha adubada (Tabela 4). No segundo experimento, em Pirapemas - MA, houve diferença estatística significativa somente para os parâmetros agronômicos matéria seca da parte aérea das plantas na antese e maturação e altura total das plantas. Os tratamentos com inoculação de bactérias não diferiram estatisticamente entre si, mas foram iguais ou superiores à testemunha adubada, com exceção do tratamento T6 para o parâmetro matéria seca das plantas na antese (Tabela 5).

Tabela 4. Efeito de *Pseudomonas aeruginosa* sobre aspectos produtivos e agronômicos de plantas de arroz sob cultivo de terras altas em Santa Rita - MA, Brasil.

	M 1000(g).....	G/Pl	G Int (%)	MSPAA(g).....	MSPAM	N Pan	AT (m)
T1	12.85 c	1.56 a	59.4 b	34.97 a	6.35 ab	150.25 b	99.5 a
T2	12.87 bc	1.61 a	73.74 ab	29.97 a	5.15 b	140.5 b	97.5 a
T3	23.15 a	1.86 a	68.42 ab	30.25 a	5.96 ab	195 ab	99.75 a
T4	23.22 a	1.94 a	63.79 ab	34.32 a	8.02 ab	196 ab	94.5 a
T5	22.42 ab	2.06 a	65.16 ab	35.55 a	8.53 a	212.5 a	88.5 a
T6	22.55 ab	1.47 a	72.35 ab	33.25 a	6.15 ab	187.2 ab	81.75 a
T7	23.2 ab	1.63 a	76.36 a	33.02 a	5.46 ab	204 a	95 a

*Médias seguidas de mesma letra, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. M 1000-Massa de mil grãos; G/Pl- Massa de grãos em gramas por planta; G Int(%) – percentual de grãos inteiros; MSPAA- Massa seca de plantas na antese; MSPAA- Massa seca de plantas na maturação; N Pan- Numero de panículas; AT- Altura Total de plantas.

T1- testemunha adubada, T2- testemunha absoluta, T3- microbiolização das sementes com B1 mais adubação, T4- microbiolização das sementes com B2 mais adubação, T5- microbiolização das sementes com B1 mais pulverização da solução de B1 aos 30 e 60 dias após semeadura mais adubação, T6- microbiolização das sementes com B2 mais pulverização da solução de B2 aos 30 e 60 dias após semeadura mais adubação e T7- microbiolização das sementes com B1B2 mais pulverização da solução de B1B2 aos 30 e 60 dias após semeadura mais adubação.

Tabela 5. Efeito de *Pseudomonas aeruginosa* sobre aspectos produtivos e agrônômicos de plantas de arroz sob cultivo de terras altas em Pirapemas – MA, Brasil.

	M 1000(g).....	G/PI	G Int (%)	MSPAA(g).....	MSPAM	N Pan	AT (m)
T1	25.62 a	1.83 a	60.23 a	22.73 ab	7.15 ab	142 a	65.65 ab
T2	25.85 a	2.09 a	66.84 a	22.87 bc	5.95 ab	155 a	55.20 b
T3	26.17 a	2.27 a	61.99 a	27.73 a	7.87 ab	217 a	71.40 ab
T4	27.62 a	2.68 a	63.70 a	27.19 ab	9.67 ab	195 a	70.85 ab
T5	27.82 a	2.60 a	66.41 a	22.11 bc	9.57 ab	186 a	73.60 a
T6	26.8 a	2.22 a	69.92 a	20.76 c	10.2 ab	163 a	74.05 a
T7	26.87 a	2.62 a	64.68 a	20.49 ab	10.8 a	238 a	68.45 ab
T8	25.27 a	2.13 a	57.79 a	23.59 ab	5.25 b	169 a	71.05 ab

*Médias seguidas de mesma letra, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 10% de probabilidade. M 1000-Massa de mil grãos; MSPAA- Massa seca de plantas na antese; MSPAA- Massa seca de plantas na maturação; G Int (%) – percentual de grãos inteiros; N Pan- Numero de panículas; AT- Altura Total de plantas. T1- testemunha adubada, T2- testemunha absoluta, T3- microbiolização das sementes com B1 mais pulverização da solução B1 aos 30 e 60 dias após semeadura, T4- microbiolização das sementes com B2 mais pulverização da solução de B2 aos 30 e 60 dias após a semeadura, T5- microbiolização das sementes com B1 mais pulverização da solução de B1 aos 30 e 60 dias após semeadura mais adubação, T6- microbiolização das sementes com B2 mais pulverização da solução de B2 aos 30 e 60 dias após semeadura mais adubação, T7- microbiolização das sementes com B1B2 mais pulverização da solução de B1B2 aos 30 e 60 dias após semeadura e T8- microbiolização das sementes com B1B2 mais pulverização da solução de B1B2 aos 30 e 60 dias após semeadura mais adubação.

As diferenças nos resultados entre os dois experimentos podem ser atribuídas à complexa interação planta-solo-microrganismo, que, como explicam Massessini et al. (2014), pode refletir de forma neutra, positiva, ou negativa sobre o desempenho agrônômico e produtivo das plantas.

A prática de inoculação de bactérias diazotróficas pode modificar o ambiente onde a planta se desenvolve e dessa forma as interações bioquímicas entre os pares associativos podem promover mudanças na expressão gênica da planta inoculada (Amaral, Bueno, & Hemes, 2014).

Possivelmente, os contrastes nas condições edafoclimáticas das áreas experimentais, em interação com a bactéria *P. aeruginosa*, podem ter influenciado seu efeito sobre os parâmetros avaliados.

Os resultados corroboram com os de Elekhtyar (2015) que também relata o efeito positivo e significativo da inoculação de *Pseudomonas fluorescens* sob os parâmetros produtivos do arroz cultivar Giza 179. A autora obteve média de 91.03% de grãos inteiros quando houve a inoculação com *P. fluorescens* contra 90.25% quando não houve a inoculação. Para o parâmetro número de panículas as médias descritas foram 459.26 e 386.11 respectivamente para os tratamentos com e sem inoculação. A autora relata que não houve diferença significativa para o parâmetro massa de mil grãos corroborando com nosso experimento em Pirapemas, mas diferindo do experimento de Santa Rita.

Bashir, Ullah, e Mirza (2013) após a inoculação de sementes de arroz com *Pseudomonas* spp., constataram aumento significativo de 13.4 % na matéria seca e 17.13 % na massa dos grãos por planta de arroz, em comparação ao tratamento controle (sem inoculação). De forma semelhante Ferreira, Knupp, e Martin-Didonet (2014) comprovaram o efeito significativo de *Pseudomonas* spp. sob a massa seca e altura total de plantas de arroz cultivar BRS Aimoré. Para o parâmetro massa seca os autores descreveram médias de 1.38 g e 1.02 g com e sem a inoculação respectivamente, e para o parâmetro altura total, médias de 79.07 cm e 66.37 cm com e sem a inoculação respectivamente.

Variações no TN foram evidenciadas, de acordo com a parte da planta, fase analisada, isolado bacteriano inoculado e forma de aplicação nos dois experimentos (Tabelas 6 e 7).

Tabela 6. Teor de Nitrogênio na parte aérea e grãos de arroz cultivar BRS Primavera sob sistema de cultivo terras altas em Santa Rita - MA, Brasil.

	Teor de Nitrogênio (g.kg ⁻¹)		
	Parte aérea na antese	Parte aérea na maturação	Grão
T1	10.01 ab	3.39 b	12.67 ab
T2	8.31 b	3.80 ab	8.53 b
T3	10.06 ab	5.65 ab	12.96 ab

T4	12.15 ab	6.18 ab	11.44 ab
T5	11.63 ab	6.79 a	14.24 a
T6	14.55 a	6.28 ab	12.25 ab
T7	10.70 ab	6.64 a	14.44 a

*Médias seguidas de mesma letra, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. T1- testemunha adubada, T2- testemunha absoluta, T3- microbiolização das sementes com B1 mais adubação, T4- microbiolização das sementes com B2 mais adubação, T5- microbiolização das sementes com B1 mais pulverização da solução de B1 aos 30 e 60 dias após semeadura mais adubação, T6- microbiolização das sementes com B2 mais pulverização da solução de B2 aos 30 e 60 dias após semeadura mais adubação e T7- microbiolização das sementes com B1B2 mais pulverização da solução de B1B2 aos 30 e 60 dias após semeadura mais adubação.

Tabela 7. Teor de Nitrogênio na parte aérea e grãos de arroz cultivar BRS Primavera sob sistema de cultivo em terras altas em Pirapemas - MA, Brasil.

	Teor de Nitrogênio (g.kg ⁻¹)		
	Parte aérea na antese	Parte aérea na maturação	Grão
T1	12.38 a	5.31 a	12.61 c
T2	8 c	5.13 a	12.93 bc
T3	9.65 bc	4.99 a	14.42 abc
T4	10.23 abc	4.99 a	14.87 ab
T5	10.94 ab	5.69 a	15.56 a
T6	11.36 ab	5.53 a	14.61 abc
T7	11.04 ab	5.98 a	14.8 ab
T8	11,79 ab	5,53 a	13,72 abc

*Médias seguidas de mesma letra, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. T1- testemunha adubada, T2- testemunha absoluta, T3- microbiolização das sementes com B1 mais pulverização da solução B1 aos 30 e 60 dias após semeadura, T4- microbiolização das sementes com B2 mais pulverização da solução de B2 aos 30 e 60 dias após a semeadura, T5- microbiolização das sementes com B1 mais pulverização da solução de

B1 aos 30 e 60 dias após semeadura mais adubação, T6- microbiolização das sementes com B2 mais pulverização da solução de B2 aos 30 e 60 dias após semeadura mais adubação, T7- microbiolização das sementes com B1B2 mais pulverização da solução de B1B2 aos 30 e 60 dias após semeadura e T8- microbiolização das sementes com B1B2 mais pulverização da solução de B1B2 aos 30 e 60 dias após semeadura mais adubação.

No experimento instalado em Santa Rita, o TN na parte aérea e grãos de arroz sob a influência de *P. aeruginosa* foi estatisticamente igual ou superior às testemunhas adubada e absoluta. No entanto, podemos destacar na fase de antese o tratamento T6, correspondente à microbiolização e pulverização com B2 aos 30 e 60 DAP mais adubação NPK e, na maturação de grãos os tratamentos T5 e T7, correspondentes à microbiolização e pulverização com B1 aos 30 e 60 DAP mais adubação NPK e microbiolização e pulverização com a mistura B1 e B2 aos 30 e 60 DAP mais adubação NPK, respectivamente (Tabela 6).

Já no experimento instalado em Pirapemas houve diferença estatística significativa para o TN somente na parte aérea da planta na antese e nos grãos. Na fase de antese os tratamentos com *P. aeruginosa* foram estatisticamente iguais a testemunha adubada, com exceção do tratamento T3 que corresponde à microbiolização e pulverização com o isolado bacteriano B1 aos 30 e 60 DAP, com média inferior à testemunha adubada. O TN nos grãos de arroz sob a influência da bactéria foi estatisticamente igual ou superior às testemunhas adubada e absoluta, com destaque ao tratamento cinco que assim como no primeiro experimento em Santa Rita-MA, corresponde à microbiolização e pulverização com o isolado B1 aos 30 e 60 DAP mais adubação NPK (Tabela 7).

Apesar da escassez de estudos sobre o potencial diazotrófico de *Pseudomonas aeruginosa* constatamos o efeito positivo e significativo da bactéria sobre o teor de nitrogênio (g.kg^{-1}) na parte aérea e grãos de arroz. Pesquisas afirmam que bactérias capazes de fixar o N atmosférico promovem consequentemente maior teor do nutriente à planta associada, exercendo influência sobre seu desenvolvimento vegetativo e desempenho agrônomo (Quadros et al., 2014; Müller et al., 2016).

Corroborando com os resultados apresentado, Guimarães e Baldani (2013) observaram variações no teor de nitrogênio no arroz de acordo com a parte da planta, fase analisada, bactéria inoculada além de cultivar. Os autores inocularam as bactérias *Herbaspirillum* spp. e *Burkholderia* spp. em sementes das cultivares de arroz IR42 e IAC4440 e concluíram que há especificidade entre espécie de diazotrófica e cultivar, podendo haver baixa ou alta resposta à inoculação sob condições de campo. Para a cultivar IR42 só houve diferença estatística na fase de maturação para inoculação com *Burkholderia* spp. (13.7 g.kg^{-1}). Já para cultivar IAC4440,

os autores descreveram diferenças significativas na parte aérea e grãos de arroz, sendo a maior média na antese 1.66 g.kg^{-1} após a inoculação com *Burkholderia* spp.; na maturação 1.23 g.kg^{-1} também após a inoculação com *Burkholderia* spp. e nos grãos não houve diferença estatística entre as bactérias, mas a inoculação favoreceu o TN se comparado ao controle, com médias de 1.31 g.kg^{-1} após inoculação com *Herbaspirillum* spp. e 1.43 g.kg^{-1} após inoculação com *Burkholderia* spp.

Breda, Alves, e Reis (2016) ao avaliar o efeito da adubação nitrogenada e inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* em milho, relataram médias estatisticamente iguais de 13.61 g.kg^{-1} e 14.39 g.kg^{-1} , para o TN em grãos, em resposta aos tratamentos adubação com 50 kg de N por hectare mais inoculação de *H. seropedicae* e adubação com 100 kg de N por hectare sem a inoculação, respectivamente. De forma semelhante, Müller et al. (2016) descreveram que a associação da adubação nitrogenada e inoculação com *Azospirillum brasiliense* promoveu teores de nitrogênio foliar favoráveis ao desenvolvimento do milho, com variações de 27.84 g.kg^{-1} a 32.21 g.kg^{-1} .

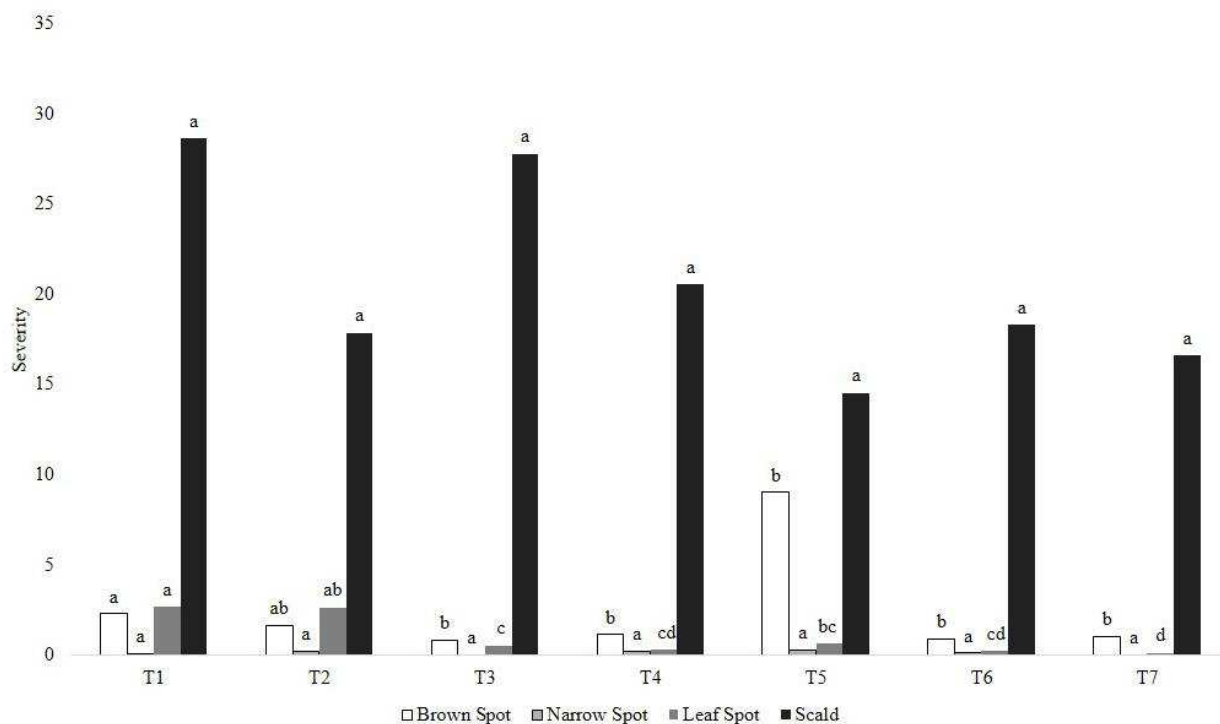
Pode-se com isso inferir que há influência de bactérias diazotróficas no TN nas folhas e grãos de culturas agrícolas economicamente importantes em nível mundial, sugerindo que a inoculação pode ser uma alternativa viável ao uso excessivo de fertilizantes.

Os resultados comprovaram a eficácia da bactéria *P. aeruginosa* na redução da severidade das doenças mancha parda, mancha foliar e escaldadura.

No experimento instalado em Santa Rita houve diferença estatística significativa entre os tratamentos para as doenças mancha parda e mancha foliar, com menor severidade obtida para os tratamentos sob influência da bactéria. Para mancha parda não houve diferença estatística entre os tratamentos com *P. aeruginosa*, mas para mancha foliar podemos destacar o tratamento T7 que corresponde à mistura das duas bactérias com pulverização aos 30 e 60 DAP mais adubação NPK (Figura 1).

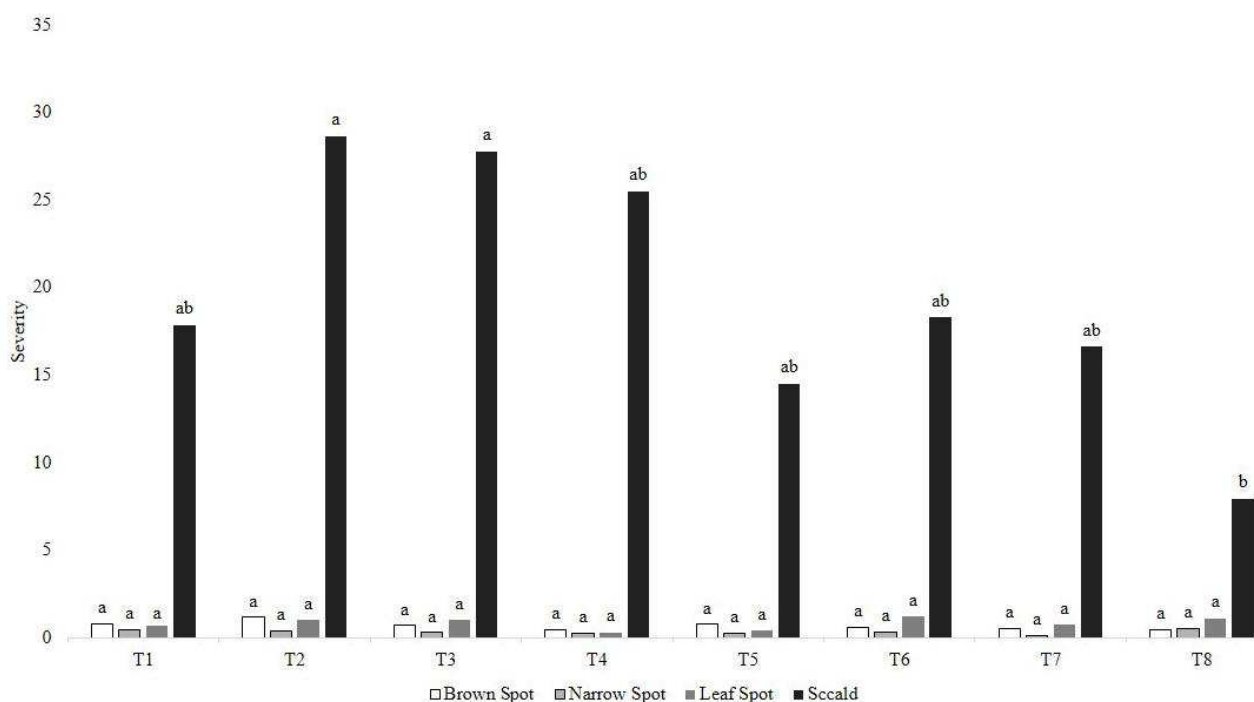
Já no experimento instalado em Pirapemas houve efeito positivo e significativo da bactéria apenas sobre a doença escaldadura, com menor severidade obtida para o tratamento oito que corresponde à mistura das duas bactérias com pulverização aos 30 e 60 DAP mais adubação NPK, bem como o tratamento sete do experimento instalado em Santa Rita (Figura 2).

Figura 1. Efeito da inoculação de *Pseudomonas aeruginosa* sobre a severidade das doenças mancha parda, mancha estreita, mancha foliar e escaldadura em plantas de arroz sob cultivo em terras altas em Santa Rita - MA, Brasil.



*Médias seguidas de mesma letra, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 10% de probabilidade. T1- testemunha adubada, T2- testemunha absoluta, T3- microbiolização das sementes com B1 mais adubação, T4- microbiolização das sementes com B2 mais adubação, T5- microbiolização das sementes com B1 mais pulverização da solução de B1 aos 30 e 60 dias após semeadura mais adubação, T6- microbiolização das sementes com B2 mais pulverização da solução de B2 aos 30 e 60 dias após semeadura mais adubação e T7- microbiolização das sementes com B1B2 mais pulverização da solução de B1B2 aos 30 e 60 dias após semeadura mais adubação.

Figura 2. Efeito da inoculação de *Pseudomonas aeruginosa* sobre a severidade das doenças Mancha parda, Mancha estreita, Mancha foliar e Escaldadura em plantas de arroz sob cultivo em terras altas em Pirapemas - MA, Brasil.



*Médias seguidas de mesma letra, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 10% de probabilidade. T1- testemunha adubada, T2- testemunha absoluta, T3- microbiolização das sementes com B1 mais pulverização da solução B1 aos 30 e 60 dias após semeadura, T4- microbiolização das sementes com B2 mais pulverização da solução de B2 aos 30 e 60 dias após a semeadura, T5- microbiolização das sementes com B1 mais pulverização da solução de B1 aos 30 e 60 dias após semeadura mais adubação, T6- microbiolização das sementes com B2 mais pulverização da solução de B2 aos 30 e 60 dias após semeadura mais adubação, T7- microbiolização das sementes com B1B2 mais pulverização da solução de B1B2 aos 30 e 60 dias após semeadura e T8- microbiolização das sementes com B1B2 mais pulverização da solução de B1B2 aos 30 e 60 dias após semeadura mais adubação.

Souza Júnior et al., (2017) constataram redução significativa na severidade de mancha parda (*Bipolares oryzae*) e escaldadura (*Gerlachia oryzae*), em plantas de arroz cujas sementes foram microbiolizadas respectivamente com *P. synxantha* e *P. fluorescens*, em relação ao controle e ao tratamento com fungicida. Os autores destacaram que não houve diferença estatística entre o controle e o tratamento com fungicida para ambas as doenças e descreveram para severidade de mancha parda, médias de 4.57 quando as sementes foram tratadas com Carboxin Thiran; 6.50 para o controle e 3 para inoculação com *P. synxantha*; já para severidade de escaldadura as médias foram 1.25 para o tratamento com Carboxin Thiran; 1.0 para o controle e 0.63 para inoculação com *P. fluorescens*.

Oliveira et al. (2019) testaram a combinação de formulações a base de glicerol e melão com cepas de *P. fluorescens* e evidenciaram o potencial da espécie na redução da severidade de *Mangnaporte oryzae*, fungo causador da brusone. Segundo estes autores, a espécie pode ser considerada um biofungicida eficiente para o manejo integrado, reduzindo a dependência de insumos químicos e melhorando a produção sustentável de alimentos.

Corroborando com os resultados apresentados, estudos recentes também comprovam o potencial de espécies do gênero *Pseudomonas* na redução da severidade de doenças foliares do milho, a exemplo, Planchamp, Glauser, e Mauch-Mani (2015) relataram que após a microbiolização de sementes de milho, cultivar Jubileu com *P. putida* KT2440, houve redução significativa de antracnose foliar (*Colletotrichum graminicola*) em relação ao controle. Que destacaram que a área foliar colonizada pelo fungo *C. graminicola* foi 20 vezes menor em plantas cujas sementes foram inoculadas, quando comparadas ao tratamento controle.

CONCLUSÃO

Os tratamentos sob influência de *P. aeruginosa* foram estatisticamente superiores ou iguais à testemunha adubada em resposta ao desenvolvimento inicial, parâmetros agronômicos e produtivos (Massa de mil grãos, percentual de grãos inteiros, matéria seca das plantas na antese e maturação, número de panículas por parcela e altura total das plantas), teor de nitrogênio (parte aérea da planta na antese, maturação e grãos) e sanidade das plantas (mancha parda, escaldadura e mancha foliar), evidenciando o potencial de uso da bactéria como alternativa econômica e ecológica ao uso excessivo de fertilizantes e pesticidas.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual do Maranhão, ao Programa de Pós Graduação em Agroecologia, ao grupo NUCLEUS (Virtual Joint Centre Agricultural Nitrogen, Brazil/UK), à Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão – Fapema, e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Capes.

REFERÊNCIAS

Amaral, F. P., Bueno, J. C. F., Hermes, V. S. & Arisi, A. C. M. (2014). Gene expression analysis of maize seedlings (DKB240 variety) inoculated with plant growth promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae*. *Symbiosis*, 62, 41-50. DOI: 10.1007/s13199-014-0270-6

Bashir, A., Ullah, M., & Mirza, M. (2013). Effects of inoculation with plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) on different growth parameters of cold area rice variety, Fakre Malakand. *African journal of microbiology research*, 7(17), 1651-1656. DOI: 10.5897/AJMR2013.5351

Batista, M.B., & Dixon, R. (2019). Manipulating nitrogen regulation in diazotrophic bacteria for agronomic benefit. *Biochemical Society Transactions*, 47(2), 603-614. DOI: 10.1042/BST20180342

Breda, F. A. F., Alves, G. C., & Reis, V. M. (2016). Produtividade de milho na presença de doses de N e de inoculação de *Herbaspirillum seropedicae*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 51(1), 45-52. DOI: 10.1590/S0100-204X2016000100006

Damalas, C. A., & Eleftherohorinos, I. G. (2011). Pesticide exposure, safety issues, and risk assessment indicators. *International journal of environmental research and public health*, 8(5), 1402-1419. DOI:10.3390/IJERPH8051402

Elekhtyar, N. (2015). Efficiency of *Pseudomonas fluorescens* as Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) for the Enhancement of Seedling Vigor, Nitrogen Uptake, Yield and Its Attributes of Rice (*Oryza sativa* L.). *International Journal of Scientific Research in Agricultural Sciences*. 2, 057-067. Retrieved on august 14, 2020, from https://www.researchgate.net/publication/308520878_Efficiency_of_Pseudomonas_fluorescens_as_Plant_Growth

Promoting_Rhizobacteria_PGPR_for_the_Enhancement_of_Seedling_Vigor_Nitrogen_Uptake_Yield_and_Its_Attributes_of_Rice_Oryza_sativa_L

López-Ortega, M. D. P., Criollo-Campos, P. J., Gómez-Vargas, R. M., Camelo-Rusique, M., Estrada-Bonilla, G., Garrido-Rubiano, M. F., & Bonilla-Buitrago, R. (2013). Characterization of diazotrophic phosphate solubilizing bacteria as growth promoters of maize plants. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 15(2), 115-123. DOI: 10.15446/REV.COLOMB.BIOTE.V15N2.36303

Ludwig, J., Moura, A. B., Santos, A. S. D., & Ribeiro, A. S. (2009). Microbiolização de sementes para o controle da mancha-parda e da escaldadura em arroz irrigado. *Tropical Plant Pathology*, 34(5), 322-328. DOI: 10.1590/S1982-56762009000500005

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistics. 2018. Retirado em 29 fevereiro 2020, de <http://fenix.fao.org/faostat/internal/en/#data/QC>

Ferreira, E.P.B., Knupp, A.M., & Martin-Didonet, C.C.G. (2014). Crescimento de cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.) influenciado pela inoculação com bactérias promotoras de crescimento de plantas. *Bioscience Journal*, 30(3), 655-665. Retirado em 29 fevereiro 2020, de <http://www.seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/article/view/18043>

Freitas, J.G., Malavolta, V.M.A., Salomon, M.V., Cantarella, H., Castro, L.H.S.M., & Azzini, L.E. (2010). Nitrogen fertilization and blast incidence in upland rice. *Bragantia*, 69(1), 173-179. DOI: 10.1590/S0006-87052010000100022

Guimarães, S., & Baldani, V. (2013). Produção de arroz inoculado com bactérias diazotróficas marcadas com resistência induzida ao antibiótico estreptomicina. *Revista de Ciências Agrárias - Amazon Journal of Agricultural and Environmental Sciences*, 56. 125-132. DOI: 10.4322/RCA.2013.020

Huang, M., Fan, L., & Zou, Y. (2019). Contrasting responses of grain yield to reducing nitrogen application rate in double-and single-season rice. *Scientific reports*, 9(1), 1-7. DOI: 10.1038/S41598-018-36572-0

IRRI International Rice Research Institute (1996). *Standard Evaluation System for Rice*. Manila, 52p

King, E. O., Ward, M. K., & Raney, D. E. (1954). Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *The Journal of laboratory and clinical medicine*, 44(2), 301-307. DOI: 10.5555/URI:PII:002221435490222X

Massessini, A.M., Bonduki, V.H.A., Melo, C.A.D., Tótola, M.R., Ferreira, F.A., & Costa, M.D. (2014). Soil microorganisms and their role in the interactions between weeds and crops. *Planta Daninha*, 32(4), 873-884. DOI: 10.1590/S0100-83582014000400022

Müller, T. M., Sandini, I. E., Rodrigues, J. D., Novakowski, J. H., Basi, S., & Kaminski, T. H. (2016). Combination of inoculation methods of *Azospirillum brasilense* with broadcasting of nitrogen fertilizer increases corn yield. *Ciência Rural*, 46(2), 210-215. DOI: 10.1590/0103-8478CR20131283

NUGEO - Núcleo Geoambiental. *Atlas do Maranhão*. São Luís: Laboratório de Geoprocessamento/GEPLAN-UEMA, 2015. 42p.

Numoto, A. Y., Filho, P.S.V., Scapim, C.A., Franco, A. A.N., Ortiz, A. H. T., Marques, O.J., & Pelloso, M. F. (2019). Agronomic performance and sweet corn quality as a function of inoculant doses (*Azospirillum brasilense*) and nitrogen fertilization management in summer harvest. *Bragantia*, 78(1), 26-37. DOI: 10.1590/1678-4499.2018044

Oliveira, M. A., Zucareli, C., Spolaor, L. T., Domingues, A. R., & Ferreira, A. S. (2012). Desempenho agrônômico do milho sob adubação mineral e inoculação das sementes com rizobactérias. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 16(10), 1040-1046. DOI: 10.1590/S1415-43662012001000002

Oliveira, M. I., Chaibub, A. A., Sousa, T. P., Cortes, M. V. C. Barros., Souza, A. C. A., Conceição, E.C., & Filippi, M. C. C. (2019) Formulations of *Pseudomonas fluorescens* and *Burkholderia pyrrocinia* control rice blast of upland rice cultivated under no-tillage system. *Biological Control*, 104153, 1- 6. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2019.104153

Pham, V. T. K., Rediers, H., Ghequire, M. G. K., Nguyen, H. H., Mot, R., Vanderlyden, J., & Spaepen, S. (2017). The plant growth-promoting effect of the nitrogen-fixing endophyte *Pseudomonas stutzeri* A15. *Arch Microbiol* 199(3), 513–517. DOI: 10.1007/s00203-016-1332-3

Planchamp, C., Glauser, G., & Mauch-Mani, B. (2015). Root inoculation with *Pseudomonas putida* KT2440 induces transcriptional and metabolic changes and systemic resistance in maize plants. *Frontiers in plant science*, 5, 719. DOI: 10.3389/fpls.2014.00719

Quadros, P. D., Roesch, L. F. W., Silva, P. R. F., Vieira, V. M., Roehrs, D. D., & Camargo, F. A. O. (2014). Desempenho agrônômico a campo de híbridos de milho inoculados com *Azospirillum*. *Revista Ceres*, 61(2), 209-218. DOI: 10.1590/S0034-737X2014000200008

Santos, M. S., Nogueira, M. A., & Hungria, M. (2019). Microbial inoculants: reviewing the past, discussing the present and previewing an outstanding future for the use of beneficial bacteria in agriculture. *AMB Express*, 9(1), 205. DOI:10.1186/s13568-019-0932-0

Schaefer, P. E., Martin, T. N., Pizzani, R., & Schaefer, E. L. (2019). Inoculation with *Azospirillum brasilense* on corn yield and yield components in an integrated crop-livestock system. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 41, 1-9. DOI: 10.4025/ACTASCIAGRON.V41I1.39481

Schultz, N., Silva, J. A., Sousa, J. S., Monteiro, R. C., Oliveira, R. P., Chaves, Valfredo A., Pereira, W., Silva, M. F., Baldani, J.I., Boddey, R. M., Reis, V. M., & Urquiaga, S. (2014). Inoculation of sugarcane with diazotrophic bacteria. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 38(2), 407-414. DOI: 10.1590/S0100-06832014000200005

Silva Lobo, V. L., & Fillippi, M. C. C. (2017). Manual de Identificação de Doenças da Cultura do Arroz. (1° ed.) Brasília, DF: Embrapa Arroz e Feijão.

Silva, M. S. B. S., Rodrigues, A. A. C., Oliveira, L. J. M. G., Silva, E. K. C., & Pereira, T. S. (2014). Sanidade de sementes de arroz, biocontrole, caracterização e transmissão de *Curvularia lunata* em semente –plântula de arroz. *Revista Ceres*, 61(4), 511-517. DOI: 10.1590/0034-737X201461040009.

Souza Júnior, I. T., Schafer, J. T., Corrêa, B. O., Funck, G. D., & Moura, A. B. (2017). Expansion of the biocontrol spectrum of foliar diseases in rice with combinations of rhizobacteria. *Revista Ciência Agronômica*, 48(3), 513-522. DOI: 10.5935/1806-6690.20170060

Tavares, L. C. V., Foloni, J. S. S., Bassoi, M. C., & Prete, C. E. C. (2014). Genótipos de trigo em diferentes densidades de semeadura. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 44(2), 166-174. DOI: 10.1590/S1983-40632014000200010

Tedesco, M. J., Gianello, C., Bissani, C.A., Bohnen, H. & Volkweiss, S.J. (1995). *Análise de solo, plantas e outros materiais*. (2.ed.). Porto Alegre, RS: Departamento de Solos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 174p.

Yasmin, S., Zaka, A., Imran, A., Zahid, M. A., Yousaf, S., Rasul, G., ... Mirza, M. S. (2016). Plant Growth Promotion and Suppression of Bacterial Leaf Blight in Rice by Inoculated Bacteria. *PloS one*, 11(8), e0160688. DOI:10.1371/JOURNAL.PONE.0160688

Capítulo 4

CONCLUSÕES GERAIS

CONCLUSÕES GERAIS

1. Os 33 isolados bacterianos obtidos de plantas de arroz sob cultivo terras altas no Maranhão foram identificados como *Pseudomonas aeruginosa* e apresentaram proximidade filogenética com as espécies *Comamonas sediminis*, *Stenotrophomonas tumulicola*, *S. maltophilia*, *Pseudomonas hibscicola*, *P. donghunensis*, *P. sihuiensis*, *P. guguanesis*, *Raoultella ornithinolytica* e *Celvibrio japonicus*. Dentre os 33 isolados de *Pseudomonas aeruginosa*, 15 apresentaram capacidade de fixação biológica de nitrogênio (FBN) devido à comprovada redução de acetileno pela enzima nitrogenase, no entanto, ressaltamos que os isolados denominados SNf, DACAr, BACr, APf, SM3r e NBf se destacaram com os maiores valores de nitrogenase e também foram capazes de produzir o hormônio ácido indol acético (AIA), constituindo uma alternativa econômico-ambiental viável à produção agrícola em detrimento do uso excessivo de agroquímicos.

2. Os tratamentos sob influência de *P. aeruginosa* foram iguais ou superiores à testemunha adubada em resposta ao desenvolvimento inicial, parâmetros agrônômicos e produtivos, teor de nitrogênio e sanidade das plantas, evidenciando o potencial de uso da bactéria como alternativa econômica e ecológica ao uso excessivo de fertilizantes e pesticidas.

ANEXO 1. NORMAS DE FORMATAÇÃO DA REVISTA AMBIENTAL MICROBIOLOGY

Resumo

Todos os trabalhos devem incluir um resumo, que não exceda 200 palavras, que descreva sucintamente as principais conclusões do trabalho. Informações básicas e descrições do que foi feito e como devem ser evitadas como redundantes, a menos que sejam essenciais para a compreensão dos resultados e, depois, restritas a uma ou duas frases.

O *texto* *principal*

Para artigos de pesquisa, o texto principal deve ser subdividido em legendas Introdução, Resultados, Discussão, Procedimentos Experimentais, Agradecimentos, Referências, Tabela e Figura. As seções Resultados e Discussão podem ser combinadas e podem incluir subtítulos adicionais. Procedimentos experimentais novos ou desconhecidos devem ser descritos em detalhes suficientes para permitir que as experiências sejam reproduzidas. Procedimentos bem documentados devem ser adequadamente citados. Para relatórios breves, resultados e discussão são combinados, não há seção sobre procedimentos experimentais e detalhes experimentais essenciais devem ser incorporados nas legendas correspondentes das figuras e tabelas. A posição preferida das tabelas e figuras deve ser indicada nos locais apropriados do manuscrito. Notas de rodapé devem ser evitadas.

Formatar

texto

O texto deve ser formatado em espaço duplo, digitado de forma consistente [por exemplo, cuidado para distinguir entre 'l' (um) e 'l' (L minúsculo), '0' (zero) e 'O' (maiúsculo O), etc.] sem hifenização e quebra automática de linha (sem retornos brutos nos parágrafos) e linha e página numeradas consecutivamente.

Referências

Os autores devem usar o sistema de citação de referências ilustradas abaixo. Somente artigos completos que foram publicados ou estão 'no prelo' podem ser incluídos na lista de referências. No texto, estudos não publicados ou submetidos devem ser referidos como tal (por exemplo, JM Smith, não publicado) ou como uma comunicação pessoal. É de responsabilidade do autor obter permissão dos colegas para incluir seu trabalho como comunicação pessoal. No texto, as referências devem ser inseridas entre parênteses em ordem de data, da seguinte forma: (Pugsley, 1996; Matsunaga *et al.* 1997). A lista de referências deve estar em ordem alfabética, de acordo com o primeiro nome do autor. Trabalhos com dois autores devem seguir os do primeiro nome, organizados em ordem alfabética de acordo com o nome do segundo autor. Os artigos com mais de dois autores devem seguir os do primeiro autor nomeado em ordem cronológica; com várias referências do mesmo primeiro autor em um determinado ano, liste as referências na ordem citada. O título do artigo deve ser incluído. Para trabalhos com até sete autores, os nomes de todos os autores devem ser listados. Para artigos com oito ou mais autores, os seis primeiros nomes devem ser listados, seguidos por '*et al.*'. Abreviações padrão de títulos de periódicos devem ser usadas, como no Index Medicus.

A seguir, exemplos:

Sahm, K., MacGregor, BJ, Jørgensen, BB e Stahl, DA (1999) Redução de sulfato e distribuição vertical de bactérias redutoras de sulfato quantificadas por hibridação de ranhuras de rRNA em sedimentos marinhos costeiros. *Environ Microbiol* 1: 65-74.

Madigan, MT, Martinko, JM, Dunlap, PV e Clark, DP (2008) *Brock Biology of Microorganisms*, 12a edn. Nova York, EUA: Pearson Higher Education.

Finlay, BI, Fenchel, T. e Embley, TM (1993) Endossimbiose por metanogênio em climas anaeróbicos. In *Trends in Microbial Ecology*. Guerrero, R. e Pedros-Alio, C. (eds). Barcelona: Sociedade Espanhola de Microbiologia, pp. 285-288.

Referências ao material disponível na World Wide Web podem ser fornecidas, mas somente se as informações estiverem disponíveis gratuitamente para os leitores em um site oficial. Os autores deverão fornecer cópias eletrônicas do material citado para inclusão nos sites da revista, a critério dos Editores. O formato para citações é o seguinte:

Beckleheimer, J. (1994). Como você cita URLs em uma bibliografia? [Documento WWW]. URL www.nrlssc.navy.mil/meta/bibliography.html.

No entanto, como o conteúdo e os endereços do site estão mudando constantemente, os autores são desencorajados a citar as principais informações disponíveis apenas na web.

Matemática

As equações em linha devem ser digitadas como texto. O uso de programas gráficos e 'editores de equações' deve ser evitado. As equações exibidas são recodificadas pelo nosso tipógrafo.

Tabelas

As

tabelas devem ser digitadas como texto, usando 'tabs' ou um editor de tabelas para o layout. Não use software gráfico para criar tabelas.

Figuras

Forneça versões digitais de alta qualidade de figuras, de preferência em formato EPS ou TIFF. Os arquivos TIFF não devem ser produzidos através da transferência de imagens de um arquivo anterior do Powerpoint, pois isso resulta em grande perda de resolução. As fotomicrografias devem incluir uma barra dimensionada e indicar o tamanho (apenas descrições de ampliação não são suficientes). As imagens fotográficas enviadas devem ser dimensionadas para o tamanho da publicação e devem ter uma resolução de imagem de 300 dpi ou superior no formato TIFF. Fotografias anotadas, gráficos de linhas e gráficos de barras devem ser gerados no formato EPS para obter a melhor qualidade de reprodução. Para diretrizes mais detalhadas, consulte http://media.wiley.com/assets/7323/92/electronic_artwork_guidelines.pdf.

Forneça detalhes metodológicos sobre aquisição e processamento de imagens, incluindo software e operações, como colorização e outras modificações.

Os autores são lembrados de que não é conduta científica aceitável modificar qualquer elemento separado dentro de uma imagem. Às vezes, os ajustes de toda a imagem no brilho, contraste e equilíbrio de cores são justificados se eles não deturpam os dados originais

observados. Figuras compostas compostas por imagens agrupadas, como inserções de campos diferentes ou partes separadas de géis, devem ser explicadas na legenda da figura e diferenciadas pelo uso de linhas divisórias ou outros meios para tornar os compósitos inequívocos.

Certifique-se de que a arte eletrônica seja preparada de forma que, após a redução para caber em uma ou duas colunas ou dois terços da largura da página (80 mm, 169 mm ou 110 mm respectivamente), conforme necessário, todas as letras sejam claras e fáceis de ler, ou seja, nenhum rótulo deve ser muito grande ou muito pequeno. Evite usar tonalidades, se possível; se elas são essenciais para a compreensão da figura, tente torná-las grosseiras. Nenhum trabalho artístico deve ser incorporado nos arquivos de texto. Na edição on-line em texto completo da revista, as legendas das figuras podem ser truncadas em links abreviados para a versão em tela cheia. Portanto, os 100 primeiros caracteres de qualquer legenda devem informar o leitor sobre os principais aspectos da figura.

Os autores são incentivados a usar telas coloridas, quando apropriado.

ANEXO 2. NORMAS DE FORMATAÇÃO DA REVISTA ACTA SCIENTIARUM AGRONOMY

1. Os autores devem visitar o website do COPE <http://publicationethics.org>, que contém informações para autores e editores sobre a ética em pesquisa;

2. Antes da submissão, os autores devem seguir os seguintes critérios:

- Com o objetivo de evitar a endogenia e diversidade dos autores publicados, exigimos que, após a publicação na revista, os autores aguardem, no mínimo, 1 ano até publicarem qualquer outro artigo no periódico.

- artigos que contenham aquisição de dados ou análise e interpretação de dados de outras publicações devem referenciá-las de maneira explícita;

- na redação de artigos que contenham uma revisão crítica do conteúdo intelectual de outros autores, estes deverão ser devidamente citados;

- todos os autores devem atender os critérios de autoria inédita do artigo e nenhum dos pesquisadores envolvidos na pesquisa poderá ser omitido da lista de autores;

- a aprovação final do artigo será feita pelos editores e conselho editorial.

3. Para responder aos critérios, serão realizados os seguintes procedimentos:

a) Os editores avaliarão os manuscritos com o sistema ***CrossCheck*** logo após a submissão. Primeiramente será avaliado o conteúdo textual dos artigos científicos, procurando identificar plágio, submissões duplicadas, manuscritos já publicados e possíveis fraudes em pesquisa;

b) Com os resultados, cabe aos editores e conselho editorial decidir se o manuscrito será enviado para revisão por pares que também realizarão avaliações;

c) Após o aceite e antes da publicação, os artigos poderão ser avaliados novamente.

INSTRUÇÕES PARA SUBMISSÃO DE ARTIGOS:

1. *Acta Scientiarum. Agronomy*, ISSN 1807-8621 (Impresso) E ISSN 1807-8621 (*on-line*), é uma publicação contínua da Universidade Estadual de Maringá.
2. A revista publica artigos originais em todas as áreas relevantes da Agronomia, incluindo ciência do solo, entomologia agrícola, fertilidade do solo e adubação, física do solo, fisiologia de plantas cultivadas, fitopatologia, fitossanidade, fitotecnia, gênese, morfologia e classificação dos solos, manejo e conservação do solo, manejo integrado de pragas das plantas, melhoramento vegetal, microbiologia agrícola, parasitologia agrícola e produção e beneficiamento de sementes.
3. Os autores se obrigam a declarar que seu manuscrito é um trabalho original, e que não está sendo submetido, em parte ou no seu todo, à análise para publicação em outro meio de divulgação científica sob pena de exclusão. Esta declaração encontra-se disponível no endereço: <http://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciAgron/about/submissions>.
4. Os dados, ideias, opiniões e conceitos emitidos nos artigos, bem como a exatidão das referências, são de inteira responsabilidade do(s) autor(es). A eventual citação de produtos e marcas comerciais não significa recomendação de seu uso por parte do Conselho Editorial da revista.
5. Os relatos deverão basear-se nas técnicas mais avançadas e apropriadas à pesquisa. Quando apropriado, deverá ser atestado que a pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética e Biossegurança da instituição.
6. Os artigos submetidos deverão ser em inglês.
7. Os artigos serão avaliados por, no mínimo, três consultores da área de conhecimento da pesquisa, de instituições de ensino e/ou pesquisa nacionais e estrangeiras, de comprovada produção científica. Após as devidas correções e possíveis sugestões, o artigo será aceito se tiver dois pareceres favoráveis e rejeitado quando dois pareceres forem desfavoráveis.
8. Os artigos deverão ser submetidos pela internet, acessando o **Portal ACTA**, no endereço <http://www.uem.br/acta>.
9. O conflito de interesses pode ser de natureza pessoal, comercial, política, acadêmica ou financeira. Conflitos de interesses podem ocorrer quando autores, revisores ou editores

possuem interesses que podem influenciar na elaboração ou avaliação de manuscritos. Ao submeter o manuscrito, os autores são responsáveis por reconhecer e revelar conflitos financeiros ou de outra natureza que possam ter influenciado o trabalho. Os autores devem identificar no manuscrito todo o apoio financeiro obtido para a execução do trabalho e outras conexões pessoais referentes à realização do mesmo. O revisor deve informar aos editores quaisquer conflitos de interesse que poderiam influenciar sobre a análise do manuscrito, e deve declarar-se não qualificado para revisá-lo.

10. O texto em inglês dos artigos aceitos para publicação será submetido à correção do *American Journal Experts* e custeado pelos autores. (<http://www.journalexerts.com>).

11. Não serão aceitos manuscritos nos quais:

a) os experimentos de campo não incluam dados de dois anos ou de várias localidades dentro do mesmo ano;

b) a análise de dados obtidos de ambientes controlados seja limitada a apenas um experimento ou bioensaio, sem repetições durante o período;

c) os experimentos se refiram a apenas testes sobre a atividade de produtos químicos ou biológicos contra agentes bióticos ou estresses fisiológicos;

d) os experimentos com cultura *in vitro* sejam limitados ao melhoramento dos protocolos padronizados de cultura ou os que não forneçam novas informações no campo;

e) seus objetivos sejam limitados a registrar a primeira ocorrência de um organismo nocivo ao sistema ecoagrícola ou um estudo básico sobre os parâmetros biológicos do organismo sem uma definida indicação de como esse conhecimento poderia melhorar o manejo da praga no contexto local ou regional.

12. Estão listadas abaixo a formatação e outras convenções que deverão ser seguidas:

a) No processo de submissão, deverão ser inseridos os **nomes completos dos autores** (no máximo oito), **número identificador (ID) do ORCID**, seus endereços institucionais e o *e-mail* do autor indicado para correspondência.

- b)** Os artigos deverão ser subdivididos com os seguintes subtítulos: *Abstract*, *Keywords*, Introdução, Material e métodos, Resultados e/ou Discussão, Conclusão, Agradecimentos (opcional) e Referências. Esses itens deverão ser em caixa alta e em negrito e não deverão ser numerados.
- c)** O título, com no máximo vinte palavras, deverá ser preciso. Também deverá ser fornecido um título resumido com, no máximo, seis palavras.
- d)** O *Abstract* (200 a 300 palavras), deverá conter informações sucintas sobre o objetivo da pesquisa, os materiais experimentais, os métodos empregados, os resultados e a conclusão. Até seis *keywords* (recomenda-se não utilizar as palavras do título) deverão ser acrescentadas ao final do *abstract*.
- e)** Os artigos deverão ter de 12 a 20 páginas digitadas, incluindo figuras, tabelas e referências. Deverão ser escritos em espaço 1,5 linhas e ter suas páginas e linhas numeradas. O trabalho deverá ser editado no *Word*, ou compatível, utilizando fonte *Times New Roman*, tamanho 12.
- f)** O trabalho deverá ser formatado em A4 e as margens inferior, superior, direita e esquerda deverão ser de 2,5 cm.
- g)** O arquivo contendo o trabalho que deverá ser anexado (transferido), durante a submissão, não poderá ultrapassar o tamanho de 2 MB, nem poderá conter qualquer tipo de identificação de autoria, inclusive na opção propriedades do *Word*.
- h)** Tabelas, figuras e gráficos deverão ser inseridos no texto, logo depois de citados.
- i)** As figuras e as tabelas não deverão ultrapassar 17 cm de largura.
- j)** As figuras digitalizadas deverão ter 300 dpi de resolução e preferencialmente gravadas no formato jpg ou png. Ilustrações em cores serão aceitas para publicação.
- k)** Deverá ser adotado o Sistema Internacional (SI) de medidas.
- l)** As equações deverão ser editadas utilizando o *Equation Built* do *Word*.
- m)** As variáveis deverão ser identificadas após a equação.

- n)** Recomenda-se que os autores realizem a análise de regressão para fatores quantitativos.
- o)** Artigos de revisão poderão ser publicados mediante convite do Conselho Editorial ou Editor-Chefe da Eduem.
- p)** A revista aceita um índice máximo de 5% de autocitações e, ainda, recomenda que oitenta por cento (80%) das referências bibliográficas sejam de artigos listados na base *ISI Web of Knowledge*, *Scopus* ou *SciELO* com menos de 10 anos. Recomenda-se dar preferência às citações de artigos internacionais. Não serão aceitas nas referências citações de monografias, dissertações e teses, anais, resumos, resumos expandidos, jornais, magazines, boletins técnicos e documentos eletrônicos.
- q)** As citações deverão seguir os exemplos abaixo, que se baseiam na norma da *American Psychological Association* (APA). Para citação no texto, usar o sobrenome e ano: Lopes (2005) ou (Lopes, 2005); **para dois autores:** Souza e Scapim (2005) ou (Souza & Scapim, 2005); **para três a cinco autores** (1.^a citação): Venturieri, Venturieri, e Leopoldo (2013) ou (Venturieri, Venturieri, & Leopoldo, 2013) e, nas citações subsequentes, Venturieri et al. (2013) ou (Venturieri et al., 2013); **para seis ou mais autores**, citar apenas o primeiro seguido de et al.: Wayner et al. (2007) ou (Wayner et al., 2007).

MODELOS DE REFERÊNCIAS

Deverão ser organizadas em ordem alfabética, alinhamento justificado, conforme os exemplos seguintes, que se baseiam na norma da *American Psychological Association* (APA). Os títulos dos periódicos deverão ser completos e não abreviados e em itálico, sem o local de publicação. As referências deverão conter o DOI.

Artigos

Um autor

Oerke, E. C. (2006). Crop losses to pests. *Journal of Agricultural Science*, 144(1), 31-43. doi: 10.1017/S0021859605005708

Dois a sete autores (devem-se indicar todos os autores separados por vírgula, exceto o último que deve ser separado por vírgula seguido de &)

Caporusso, N. B., & Rolim, G. S. (2015). Reference evapotranspiration models using different time scales in the Jaboticabal region of São Paulo, Brazil. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 37(1), 1-9. DOI: 10.4025/actasciagron.v37i1.18277

Achten, W. M. J., Verchot, L., Franken, Y. J., Mathijs, E., Singh, V. P., Aerts, R., & Muys, B. (2008) *Jatropha* bio-diesel production and use. *Biomass and Bioenergy*, 32(12), 1063-1084. DOI: 10.7763/ijbbb.2013.v3.215

Oito ou mais autores (devem-se indicar os seis primeiros, inserir reticências e acrescentar o último autor)

Soares, M. A., Leite, G. L. D., Zanuncio, J. C., Sá, V. G. M., Ferreira, C. S., Rocha, S. L., ... Serrão, J. E. (2012). Quality Control of *Trichogramma atopovirilia* and *Trichogramma pretiosum* (Hym.: Trichogrammatidae) adults reared under laboratory conditions. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 55(2), 305-311. DOI: 10.1590/s1516-89132012000200018

Livros

Falconer, D. S., & Mackay, T. F. C. (1996). *Introduction to quantitative genetics*. Edinburgh, SC: Addison Wesley Longman.

Kevan, P. G., & Imperatriz-Fonseca, V. L. (2006). *Pollinating bees: the conservation link between agriculture and nature* (2nd ed.). Brasília, DF: Secretariat for Biodiversity and Forests.

Parra, J. R. P. (1991). Consumo e utilização de alimentos por insetos. In A. R. P. Panizzi (Ed.), *Ecologia nutricional de insetos e suas implicações no manejo de pragas* (p. 9-65). São Paulo, SP: Manole.