



**MÔNICA APARECIDA DE FREITAS**

***Bacillus subtilis* E BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS  
AUTÓCTONES COMO AGENTES DE  
BIOCONTROLE PARA *Fusarium solani* E  
BIOACÚMULO DE FERRO NA CULTURA DA  
MANDIOCA**

**LAVRAS - MG**

**2015**

**MÔNICA APARECIDA DE FREITAS**

***Bacillus subtilis* E BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS AUTÓCTONES COMO  
AGENTES DE BIOCONTROLE PARA *Fusarium solani* E  
BIOACÚMULO DE FERRO NA CULTURA DA MANDIOCA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/ Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de Doutor.

Orientador

Dr. Flavio Henrique Vasconcelos de Medeiros

Coorientador

PhD. Paul W. Paré

**LAVRAS – MG**

**2015**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Freitas, Mônica Aparecida de.

*Bacillus subtilis* e bactérias endofíticas autóctones como agentes de biocontrole para *Fusarium solani* e bioacúmulo de ferro na cultura da mandioca / Mônica Aparecida de Freitas. – Lavras : UFLA, 2015.

91 p. : il.

Tese(doutorado)–Universidade Federal de Lavras, 2015.

Orientador: Flavio Henrique Vasconcelos de Medeiros.

Bibliografia.

1. *Bacillus subtilis*. 2. *Fusarium solani*. 3. Controle biológico. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

**MÔNICA APARECIDA DE FREITAS**

***Bacillus subtilis* E BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS AUTÓCTONES COMO  
AGENTES DE BIOCONTROLE PARA *Fusarium solani* E  
BIOACÚMULO DE FERRO NA CULTURA DA MANDIOCA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/ Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 24 de julho de 2015.

PhD. Jorge Teodoro de Souza UFLA

Dr. Luiz Antônio De Bastos Andrade UFLA

Dr. Vicente Paulo Campos UFLA

Dr. Flavio Henrique Vasconcelos de Medeiros  
Orientador

PhD. Paul W. Paré  
Coorientador

**LAVRAS – MG**

**2015**

Aos meus pais Marcelo C. Freitas e Maria D. Albino Freitas  
e ao meu irmão Marcelo Freitas Jr.

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal de Lavras, em especial ao Departamento de Fitopatologia, por minha formação acadêmica e oportunidade de me tornar doutora.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos.

Ao meu orientador, prof. Dr. Flavio H. V. Medeiros, pela oportunidade, ensinamentos, aconselhamentos, pela confiança em mim depositada e por acreditar em minha capacidade. Agradeço, também, o amigo que se tornou e a gentileza nas palavras que sempre me motivaram.

Agradeço aos meus coorientadores, prof. PhD. Paul W. Paré e Dr. Samuel P. Carvalho, pela oportunidade, tempo e sabedoria a mim empregados. Agradeço pela amizade, apoio e sugestões durante o desenvolvimento desta pesquisa.

Aos membros da banca examinadora: PhD. Jorge Teodoro De Souza, Dr. Luiz Antônio B. Andrade e Dr. Vicente Paulo Campos, por me honrarem com a participação, assim como pelas críticas e valiosas contribuições.

Aos amigos que contribuíram para que a realização da pesquisa fosse possível: Priscila F. Pereira, Wilhiam D. Teixeiras, Aurivan S. Freitas e Josimar S. Aleixo. Agradeço pela grande contribuição para concretização desta tese.

A todos os amigos do laboratório de biocontrole de enfermidades de plantas: Samuel Júlio Martins, Amanda Flausino, Rafaela A. Guimarães, Fernando P. Monteiro, Mírian Rabelo, Andres M. Pizon e Gabriel Alvarez pelo auxílio, companheirismo e bons momentos compartilhados.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia por todo ensinamento e aos funcionários pelo total apoio no decorrer do curso.

Agradeço aos meus amigos da fitopatologia da UFV e UFRPE, Adriana N. Sousa, Marcio T. Godinho, Hélivio G. Ferraz, Roberto Lanna Filho, Patrícia Ângelo, Marcela Andrade, Lilian Guimarães e Sandra Maranhão, pelo apoio e suporte sempre que precisei.

Agradeço aos meus pais Marcelo C. Freitas e Maria D. Balbino Freitas, e ao meu irmão Marcelo Freitas Jr., pelo apoio, compreensão, paciência, amor e dedicação. Obrigada pelo constante incentivo aos estudos, por serem a minha base e nunca me deixarem ter dúvidas.

Agradeço ao meu querido Eduardo L. Cancellier, pelo carinho, paciência, compreensão e companheirismo, ajudando-me a superar dificuldades de forma mais branda, tornando os meus dias mais agradáveis.

Ao meu eterno mestre, prof. Reginaldo S. Romeiro (*in memoriam*), a quem devo o meu interesse pela Fitopatologia. Serei eternamente grata pela oportunidade, ensinamentos, por acreditar em mim e pelos votos de futura pesquisadora os quais espero merecer. Agradeço, também, pelo grande amigo que foi.

E às minhas amigas de toda uma vida, Kalina F. Gonçalves, Ana Alice de Freitas, Jussileide Magalhaes, Juliana Deolinda, Fabiana Valente, Arianne Barbara e Sylvania Freitas, pela amizade que supera distâncias e se faz presente em meu dia a dia.

**MUITO OBRIGADA!**

“Mandioca, o alimento dos pobres, tornou-se uma cultura polivalente que corresponde às prioridades dos países em desenvolvimento, às tendências da economia global e aos desafios das mudanças climáticas.”

**Food and Agriculture Organization, 2013.**

## RESUMO

A mandioca é uma cultura de elevada importância sócio econômica. No entanto, o valor nutricional da raiz é pobre, contém pouca proteína, vitaminas ou nutrientes como o ferro. Em adicional, a cultura sofre perdas em qualidade e produtividade devido à ocorrência de doenças, dentre as principais, a podridão radicular causada por *Fusarium solani*. Nesse sentido, foram realizados ensaios com a adoção de isolados bacterianos benéficos no melhoramento da cultura. Para avaliar o antagonismo contra *F. solani* e a indução do acúmulo de ferro em plantas de mandioca foram utilizados isolados bacterianos endofíticos autóctones e a rizobactéria GBO3. Dessas, AMRAC31 (*Rhizobium radiobacter*), MGRTSA05 (*Bacillus subtilis*), MAIIF2a (*Microbacterium imperiale*) e GBO3 (*Bacillus subtilis*) promoveram crescimento de plantas, acúmulo de ferro e/ou ausência de sintomas da podridão radicular causada por *F. solani*. Novos ensaios foram então realizados com os isolados bacterianos mais promissores para indução do acúmulo de ferro por plantas cultivadas em solução nutritiva. MAIIF2a, MGRTSA05 e GBO3 foram capazes de induzir o acúmulo significativos de ferro pelas plantas em condições ideais e de deficiência em ferro. Os isolados também apresentaram efeito fungicida e fungistático, protegendo gemas e ramos de mandioca contra a colonização de *F. solani* após bacterização *in vitro*. A partir da combinação dos resultados obtidos, foi avaliado em campo o potencial indutor do acúmulo de ferro dos isolados mais promissores em duas cultivares previamente selecionadas quanto a produtividade. Concluiu-se que MGRTSA05 e GBO3, foram capazes de induzir o acúmulo de ferro por plantas de mandioca cultivar “IAC 576” com valores significativos em relação ao tratamento controle.

Palavras-chave: *Manihot esculenta* Crantz. Microscopia eletrônica de varredura. Microanálise de raio x. Vasos de Leonard.

## ABSTRACT

Cassava is a culture of high socio-economic importance. However, the nutritional value of the root is poor. It contains little protein, vitamins or nutrients, such as iron. In addition, the culture suffers quality and productivity loss due to the occurrence of disease, among which, the main disease is root rot caused by *Fusarium solani*. In this sense, we conducted trials adopting bacterial isolates beneficial to improving the culture. To evaluate the antagonism against *F. solani* and the induction of iron accumulation in cassava plants, we used endophytic and autochthonous bacterial isolates and the GBO3 rhizobacteria. Of these, AMRAC31 (*Rhizobium radiobacter*), MGRTSA05 (*Bacillus subtilis*), MAIIF2a (*Microbacterium imperial*) and GBO3 (*Bacillus subtilis*) promoted growth, iron accumulation and/or absence of root rot symptoms caused by *F. solani*. New trials were conducted with the most promising bacteria for inducing the accumulation of iron by plants cultivated in nutritive solution. MAIIF2a, MGRTSA05 and GBO3 were capable of inducing significant iron accumulation by plants in ideal conditions and iron deficiency conditions. The isolates also presented fungicide and fungistatic effect, protecting cassava gems and branches against colonization by *F. solani* after *in vitro* bacterization. With the combination of the obtained results, we evaluated, in field, the inducing potential of iron accumulation on the more promising isolates in two cultivars previously selected regarding productivity. We concluded that the MGRTSA05 and GBO3, were capable of inducing iron accumulation by cassava plants of cultivar "IAC 576" with significant values regarding the control treatment.

Keywords: *Manihot esculenta* Crantz. Scan electron microscopy. X-ray microanalysis. Leonard vases.

## SUMÁRIO

<b>PRIMEIRA PARTE</b>	
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> ..... 11
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> ..... 13
<b>2.1</b>	<i>Manihot esculenta</i> Crantz, classificação botânica ..... 13
<b>2.2</b>	<i>Manihot esculenta</i> Crantz, origem e diversidade ..... 14
<b>2.3</b>	<i>Manihot esculenta</i> Crantz, economia ..... 15
<b>2.4</b>	Consumo de mandioca e deficiência humana em ferro ..... 16
<b>2.5</b>	Micronutriente ferro ..... 17
<b>2.6</b>	Indução e absorção de ferro mediada por bactérias ..... 19
<b>2.7</b>	Podridão radicular da mandioca ..... 20
<b>2.8</b>	Rizobactérias e bactérias endofíticas no biocontrole de doenças de plantas ..... 24
	<b>REFERÊNCIAS</b> ..... 27
	<b>SEGUNDA PARTE – ARTIGOS</b> ..... 35
	<b>ARTIGO 1</b> Augmenting iron accumulation in cassava by the beneficial soil bacterium <i>Bacillus subtilis</i> (GBO3) ..... 35
	<b>ARTIGO 2</b> <i>Bacillus subtilis</i> (GBO3) e bactérias endofíticas autóctones são agentes de controle de <i>Fusarium solani</i> na cultura da mandioca ..... 54
	<b>ARTIGO 3</b> <i>Bacillus subtilis</i> e bactérias endofíticas autóctones induzem o acúmulo de ferro na cultura da mandioca ..... 74

## PRIMEIRA PARTE

### 1 INTRODUÇÃO

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma cultura de elevada importância socioeconômica, por se tratar da principal fonte de carboidrato e de subsistência para populações carentes, em todo o mundo tropical, incluindo o Brasil (FARIAS et al., 2006). No entanto, a raiz é pobre em proteínas, vitaminas e nutrientes minerais como o ferro, que, segundo Goos et al. (2004), pode ser corrigido de duas formas: pelo melhoramento genético da cultura, com a busca, multiplicação e seleção de cultivares mais ricas nos nutrientes alvos e pela utilização de técnicas da biotecnologia para aquisição de nutrientes. Também, pode ser obtido por meio de fertilizantes, quelatos de ferro (CURIE; BRIAT, 2003), assimilação biológica por bactérias benéficas do solo (CURIE; BRIAT, 2003; ROMEIRO, 2005), que utilizam de mecanismos como a acidificação do solo, elevando a solubilidade do ferro férrico (RYU et al., 2003) e por moléculas que capturam ferro do solo, os sideróforos (ROMEIRO; GARCIA, 2003). E, mais recentemente, foram descobertos os transportadores e a produção de voláteis que ativam o próprio maquinário de aquisição das plantas. (ZHANG et al., 2009). No entanto, não se almeja somente o enriquecimento nutricional do produto, mas também a redução de perdas de qualidade e produtividade em razão da ocorrência de pragas e doenças no campo, dentre as principais doenças, a podridão radicular, causada por *F. solani* (FUKUDA.; OTSUBO, 2004). Doença de difícil controle, com o manejo baseado no uso de cultivares tolerantes, manejo cultural e químico, métodos de baixa eficiência no controle do fitopatógeno, indicando a necessidade da implementação de ações multidisciplinares, dentre as quais o uso de microrganismos antagônicos, como as bactérias benéficas (CASTILHO; FUKUDA; TUPINAMBA, 1990; FARIAS,

2006; FUKUDA, 1991; 1993). O conhecimento sobre os benefícios das rizobactérias e bactérias endofíticas, no sistema de produção da mandioca, resultando no controle de fitopatógenos e no bioacúmulo de ferro, representa uma nova estratégia na busca de soluções mais apropriadas para a produção de mandioca. Otimiza o emprego de estratégias multidisciplinares, ao reduzir o impacto ambiental, resultando no aumento da produtividade e qualidade do produto.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 *Manihot esculenta* Crantz, classificação botânica

A mandioca pertence à classe das Magnoliophyta, subclasse Archiclamydeae, ordem Euphorbiales, tribo Manihoteae, gênero *Manihot* e a espécie *Manihot esculenta* Crantz (FARIAS, 2006). No gênero *Manihot* já foram identificadas cerca de 98 espécies (ROGER; APPAN, 1973). No entanto, apenas a espécie *M. esculenta* Crantz é cultivada comercialmente para produção de raízes comestíveis (DOMINGUEZ; CEBALLHOS; FUENTES, 1982).

A mandioca é uma planta herbácea, dicotiledônea e monoica com flores femininas e masculinas dispostas na mesma inflorescência. As flores masculinas são formadas na parte superior da inflorescência, em maior número, e as femininas na parte basal, com protogenia, em que as flores abrem-se cerca de uma semana antes das flores masculinas (FUKUDA, 1980; KAWANO; AMAYA; RIOS, 1978). É considerada alógama e altamente heterozigota, com forte depressão endogâmica ocasionada pela autofecundação (KAWANO, 1982).

A cultura reproduz normalmente por propagação vegetativa, embora a produção de sementes sexuais ocorra facilmente gerando diversidade genética (SECOND; IGLESIAS, 2000), com ampla segregação, originando populações altamente desuniformes para todos os caracteres da planta. Assim, sementes de mandioca têm sido utilizadas apenas em programas de melhoramento para criar variabilidade genética (FARIAS, 2006).

## 2.2 *Manihot esculenta* Crantz, origem e diversidade

*Manihot esculenta* Crantz tem origem imprecisa. A incerteza vem do fato de que são raras as evidências arqueológicas de partes vegetativas, por causa da dificuldade de conservação dos fósseis em ambientes tropicais (PEREIRA, 1989). Análises filogenéticas do gênero *Manihot*, realizadas por Schaal et al. (1994), baseadas em marcadores moleculares, indicaram que a mandioca originou-se na América do Sul. O maior centro de diversificação está localizado na parte central do Brasil, mais precisamente no sul de Goiás e oeste de Minas Gerais, onde cerca de 38 espécies já foram identificadas (NASSAR, 1978).

Parte da diversidade genética da mandioca encontra-se mantida em bancos de germoplasma distribuídos em toda a América Latina (FUKUDA; ALVES, 1987b). Segundo Costa e Morales (1994), aproximadamente, 8500 acessos de mandioca são mantidos no mundo, dos quais 7500 apenas na América do Sul. No Brasil já foram catalogados cerca de 4132 acessos, em coleções e bancos ativos de germoplasma (FUKUDA; ALVES, 1987a).

O maior banco de germoplasma da América Latina encontra-se na Colômbia (CIAT), seguido pelo banco da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical no Brasil (FARIAS, 2006). Uma amostra de genótipos de mandioca de uma única comunidade da região Amazônica mostrou equivalência em diversidade genética tão representativa como a amostragem da coleção do CIAT, quando analisada, usando métodos de polimorfismo do comprimento de restrição – RLFPs (COLOMBO, 1997).

Tanto as espécies silvestres quanto as tradicionais são fontes primárias de genes e combinações de genes para novas cultivares. E os biotecnólogos e geneticistas moleculares têm usado acessos em bancos genéticos, para determinar os genes que controlam traços específicos, o que representa a base

genética para o desenvolvimento de novas cultivares, com genes de resistência a pragas e doenças e melhores características agronômicas e de qualidade (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, 2013).

### **2.3 *Manihot esculenta* Crantz, economia**

A produção mundial de mandioca ainda é modesta, no entanto, no período de 2000 a 2013, a produção aumentou cerca de 100 milhões de toneladas, impulsionada pela demanda na Ásia e África, com potencial para novos aumentos da produção sob condições ideais de cultivo (FARIAS, 2006). Os rendimentos podem chegar a 80 toneladas por hectare, elevada, quando em comparação com a atual produção média de apenas 12,8 toneladas (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, 2013).

O Brasil é o segundo maior produtor mundial, apresentando uma safra recorde em 2012 de 26.285.837 toneladas, em uma área colhida estimada em 1.777.194 hectares (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, 2013). Estatísticas da Secretaria de Comércio Exterior do Governo brasileiro mostram que, no período compreendido entre 1996 a 2013, a receita com as exportações de raiz e derivados da mandioca (fécula e farinha) foi de US\$ 106.021,0 milhões, equivalente a uma média de US\$ 5,9 milhões por ano. Contudo, segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2015), a de produção para 2014 é de 23.977.757 t milhões de toneladas, uma queda em relação a 2012 causada pela redução em área plantada e clima desfavorável.

Enquanto o Brasil enfrenta retração da produção, no resto do mundo a produção de mandioca vem se intensificando e a expectativa, para os próximos anos, será a mudança para monocultivo, uso de genótipos de maior rendimento e maior uso de irrigação e agroquímicos. Intensificação que irá trazer grandes

riscos à cultura, incluindo picos em pragas e doenças e empobrecimento de nutrientes do solo (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, 2013). A cultura absorve grande quantidade de nutrientes do solo e, praticamente, exporta todo nutriente que foi absorvido, retornando sua baixa porcentagem sob a forma de resíduos culturais para o ambiente (FARIAS, 2006).

#### **2.4 Consumo de mandioca e deficiência humana em ferro**

A mandioca é fonte de alimentação para cerca de 800 milhões de pessoas em todo o mundo (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, 2013). O consumo médio anual do brasileiro é de 70 kg de mandioca, seja in natura ou a mandioca industrializada, pouco, quando comparado com países subdesenvolvidos como o Congo e Gana na África, onde o consumo médio é de 300 kg e 250 kg, respectivamente. Entretanto, a cultura é pobre em vitaminas e nutrientes como o ferro, fornecendo no consumo cerca de 20% do ferro necessário a uma dieta adequada (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, 2013).

Com uma nutrição, baseada no consumo de mandioca e/ ou seus derivados com baixo valor nutricional, a população é levada à subnutrição, que hoje, segundo a organização mundial da saúde, é o distúrbio mais prevalente no mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2008), sobretudo nos países em desenvolvimento, onde a cultura é cultivada em pequenas áreas com baixo nível tecnológico (BORBA et al., 2012).

A deficiência em ferro provoca dificuldade de aprendizagem, retardo no desenvolvimento mental, redução do desenvolvimento físico, da resistência contra as doenças infecciosas e da produtividade (LOZOFF; WACHS, 2001; ROSS; HORTON, 1998), além de afetar um grande número de crianças e mulheres em países não industrializados. É a única deficiência nutricional,

também, prevalente em praticamente todos os países industrializados. Em números globais, pode-se estimar que a maioria das crianças em idade pré-escolar e 52% das mulheres grávidas, em países não industrializados e, pelo menos, 30% das crianças e 23% das mulheres grávidas, nos países industrializados, apresentam deficiência de ferro (DEMAEYER; ADIELS-TECMAN, 1985; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2008).

## **2.5 Micronutriente ferro**

O ferro é um micronutriente essencial para as plantas, com importante papel no transporte de elétrons (LUCENA, 2003) e na síntese da clorofila, uma vez que enzimas que catalisam a sua biossíntese necessitam de ferro metálico (SPILLER; CASTLEFRANCO; CASTLEFRANCO, 1982; TOTTEY et al., 2003). O aparato fotossintético das plantas é enriquecido de ferro, contendo dois ou três átomos de ferro por fotossistema II (FSII); doze átomos de ferro por fotossistema I, cinco por complexo citocromo b6-f e dois por molécula ferredoxina (VAROTTO et al., 2002). Como resultado, a deficiência de ferro reduz os centros de reações e operações de transferência de elétrons. O ferro, também, é um cofator para várias enzimas ligadas ao tilacoide que protegem o cloroplasto de espécies reativas de oxigênio (CASANO et al., 2000; MURGIA et al., 2004).

O ferro é um dos maiores componentes da litosfera, o elemento metálico mais comum na crosta terrestre, muito abundante tanto em rochas como em solos, sendo superado apenas pelo oxigênio, silício e alumínio. No entanto, ele é pouco disponível para absorção pelas plantas, dentre os motivos estão os solos calcários com pH elevado (LUCENA, 2003), sinergismo ou competição com potássio, cálcio e magnésio, inibição competitiva com os elementos cobre,

manganês e zinco, ambientes alcalinos com fortes interações com fósforo e, ainda, terrenos rasos mal drenados (ROMHELD, 2001).

O Ferro pode ser absorvido pelas raízes das plantas na forma de  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$ , sendo menos absorvido na forma de  $\text{Fe}^{3+}$  (LUCENA, 2003). Dentre os mecanismos que aumentam sua absorção, está a acidificação do solo, elevando a solubilidade do ferro férrico, reduzindo a forma ferrosa mais solúvel, utilizar quelatos que possam formar complexos estáveis e solúveis (quelantes de ferro como ácido málico, ácido cítrico, ácidos fenólicos e ácido piscídico). Um complexo metal-quelato é o resultado de uma forma especial de complexação, na qual o agente quelante é capaz de formar múltiplas ligações em uma estrutura ao redor do íon metálico (ALBANO; MILLER, 1995). Atualmente disponíveis na forma de diferentes moléculas e isômeros, todos ácidos carboxílicos poliaminados (YUNTA et al., 2003).

Em dicotiledôneas e monocotiledôneas não gramineáceas, a absorção de ferro é baseada na estratégia de redução e aquisição induzida de ferro (MARSCHNER; ROMHELD, 1994). Esta estratégia envolve três etapas para a absorção: 1) exsudação de prótons que aumenta a mobilidade de ferro, 2) redução do  $\text{Fe}^{3+}$  para  $\text{Fe}^{2+}$  e 3) importação de  $\text{Fe}^{2+}$ . E, ainda, na membrana plasmática da raiz, a enzima redutase ferro-quelante reduz o ferro férrico à forma ferro ferroso (YUNTA et al., 2003). Na condição de deficiência de ferro, a atividade da redutase ferro-quelante aumenta, o ferro absorvido (ou quelato) é oxidado à forma férrica, dentro das raízes e transportado até as folhas em complexos eletrostáticos com citrato. Em sua maioria, nos vegetais, o ferro é encontrado na molécula heme do citocromo, nos cloroplastos e nas mitocôndrias (MARSCHNER; ROMHELD, 1994).

## 2.6 Indução e absorção de ferro mediada por bactérias

Diversos são os mecanismos pelos quais as bactérias beneficiam as plantas para a aquisição de ferro, dentre as quais estão a assimilação biológica (CURIE; BRIAT, 2003; ROMEIRO, 2005), por meio da acidificação do solo, elevando a solubilidade do ferro férrico (RYU et al., 2003), por moléculas que capturam ferro do solo, os sideróforos (ROMEIRO; GARCIA, 2003), por transportadores e pela produção de voláteis que ativam os mecanismos de aquisição das plantas (ZHANG et al., 2009).

Rizobactérias do solo podem produzir sideróforos (NEILANDS; LEONG, 1986; BRIAT, 1992) que facilitam a disponibilidade e absorção de ferro pelas plantas (BAR-NESS et al., 1992; GLICK et al., 1999). Sideróforos são peptídeos com elevada afinidade por ferro, produzidos e utilizados sob estresse de ferro, sequestrando este elemento do ambiente externo (ROMEIRO; GARCIA, 2003), na proximidade da raiz (BAR-NESS et al., 1992; GLICK et al., 1999). Ao ligar ao ferro, o sideróforo indisponibiliza o nutriente para outros organismos, como os organismos fitopatogênicos (ROMEIRO; GARCIA, 2003).

Em oposição a outras rizobactérias, *Bacillus subtilis* GB03 é uma rizobactéria simbiote, capaz de aumentar o acúmulo de ferro e promover o crescimento das plantas, sem utilizar sideróforos, produção de hormônios e contato físico com as plantas. Ela sintetiza mais de 30 compostos voláteis (PARE et al., 2005; RYU et al., 2003; ZHANG et al., 2009), que ativam cerca de 600 transcrições relacionadas com modificações da parede celular, metabolismo primário e secundário, resposta a estresses, regulação hormonal e homeostase do elemento ferro em *Arabidopsis thaliana* (FARAG et al., 2006; RYU et al., 2003; ZHANG; KIM; KRISHNAMACHARI, 2007).

Os compostos orgânicos voláteis não só induzem a expansão das células da folha (ZHANG; KIM; KRISHNAMACHARI, 2007), mas também ampliam

atividades fotossintéticas, com o aumento da síntese do maquinário fotossintético das plantas (ZHANG et al., 2008). Voláteis produzidos por GBO3 estimulam a absorção do ferro pela planta por elevar a sua própria capacidade de aquisição do elemento. Segundo Zhang et al. (2009), em trabalhos realizados com *Arabidopsis*, GBO3 direta e indiretamente induz acidificação da rizosfera, elevando três vezes a capacidade de liberar prótons pelas raízes. Dos mais de 25 metabólitos voláteis emitidos da suspensão bacteriana, três componentes, o ácido glioixílico, ácido 3-metil-butanoico e ácido acético dietílico podem ser classificados como ácidos orgânicos (FARAG et al., 2006).

GBO3, também, foi capaz de ativar a captação de ferro pela regulação da  $Fe^{3+}$  - quelato redutase e do transportador de ferro ferroso ( $Fe^{2+}$  IRT1) em resposta à demanda por ferro. Consistentemente a tais fatos, plantas expostas a GBO3 apresentaram, três dias após o tratamento com as células bacterianas, aumento de 30% no teor de ferro presente nas plantas em comparação com o tratamento controle (ZHANG; KIM; KRISHNAMACHARI, 2007). Os trabalhos realizados por Zhang et al. (2009), também, excluíram a possibilidade de sideróforos bacterianos na contribuição para o aumento da captação de ferro em plantas expostas a GBO3.

## **2.7 Podridão radicular da mandioca**

Dentre as principais doenças que afetam a cultura da mandioca, a podridão radicular destaca-se como a de maior importância (FUKUDA; OTSUBO, 2003), não somente pela abrangência geográfica, mas pelas severas perdas na produção (FUKUDA; OTSUBO, 2004). Trata-se de uma doença de alto impacto econômico e social nos principais países produtores, dentre os quais a África (ONYEKA; DIXON; EKPO, 2005) e o Brasil (SERRA et al., 2009). Limitante da produção de mandioca em áreas da região norte e nordeste do

Brasil, importante nos ecossistemas de várzea e de terra firme dos estados do Amazonas, Pará e Amapá (SERRA et al., 2009).

Na região Amazônica, as perdas causadas pela podridão radicular chegam a ser superiores a 50% em área de várzea, podendo atingir até 30% em terra firme (MATTOS; CARDOSO, 2013). No Maranhão, essa doença corresponde por 70% das perdas, chegando a 100% em ataques severos (OLIVEIRA; FIORINE, 2006). A doença tem como agente causal um complexo de patógenos: *Phytophthora drechsleri*, *P. nicotianiae* var. *parasitica*, *P. richardiae*, *Pythium scleroteichum*, *Fusarium solani*, *Rosellinia necatrix* e *Diplodia manihotis*, destacando-se dentre esses o fungo *Fusarium solani* em virtude da severidade da doença (FUKUDA; OTSUBO, 2004). Segundo Lorenzi e Dias (1993), o patógeno infecta tanto plantas jovens como adultas, causando murcha, amarelecimento, severo desfolhamento e podridão das raízes (figura 1).

O fungo *Fusarium solani* tem como características morfológicas os macroconídios falciformes, alguns quase retos, formados em monofíalides longas sobre as hifas, medindo 41,8 mm - 15,4 mm x 6 mm - 4,4 mm, com 3 a 4 septos, sendo pouco numerosos. Abundantes microconídios em falsas cabeças, elípticos, medindo 11 mm <sup>3</sup>/<sub>4</sub> 4,4 mm x 4,4 mm <sup>3</sup>/<sub>4</sub> 2,2 mm (POLTRONIERI et al., 2002), as hifas são brancas e a colonização ocorre de forma inter e intracelular (FUKUDA; OTSUBO, 2003), (Figuras 2 a e b).

*Fusarium solani* infecta as plantas no colo da haste, junto ao solo, causando infecções e, muitas vezes, obstruindo totalmente os tecidos vasculares, impedindo a livre circulação da seiva, conseqüentemente, provocando podridão indireta das raízes da mandioca. Ao contrário dos demais agentes causais da podridão radicular na cultura da mandioca, os sintomas provocados nas raízes pelo ataque de *Fusarium* sp. são caracterizados por uma podridão de consistência seca sem aparente distúrbio dos tecidos (CARDOSO;

POLTRONIERI; TRINDADE, 2000). Os sintomas ocorrem em reboleiras (FUKUDA; OTSUBO, 2004) e, em alguns casos, com prejuízos totais, principalmente, em plantios conduzidos em áreas sujeitas à constante encharcamento (MUNIZ, 2006).

Acredita-se que o agente causal é dotado de mecanismos capazes de produzir enzimas que, atuando nos tecidos da raiz, promovem uma rápida fermentação e desintegração celular (BORBA et al., 2012). Diferencia-se dos demais agentes causais por estarem normalmente restrito às áreas de solos argilosos e mal drenados (MASSOLA; BEDENDO, 2005).

Assinala-se que sua sobrevivência esteja relacionada a solos ácidos em cultivos adensados (FUKUDA; OTSUBO, 2003). A disseminação do fungo ocorre por meio de rizomorfás que avançam no solo por vários metros de distância (FUKUDA; OTSUBO, 2004).

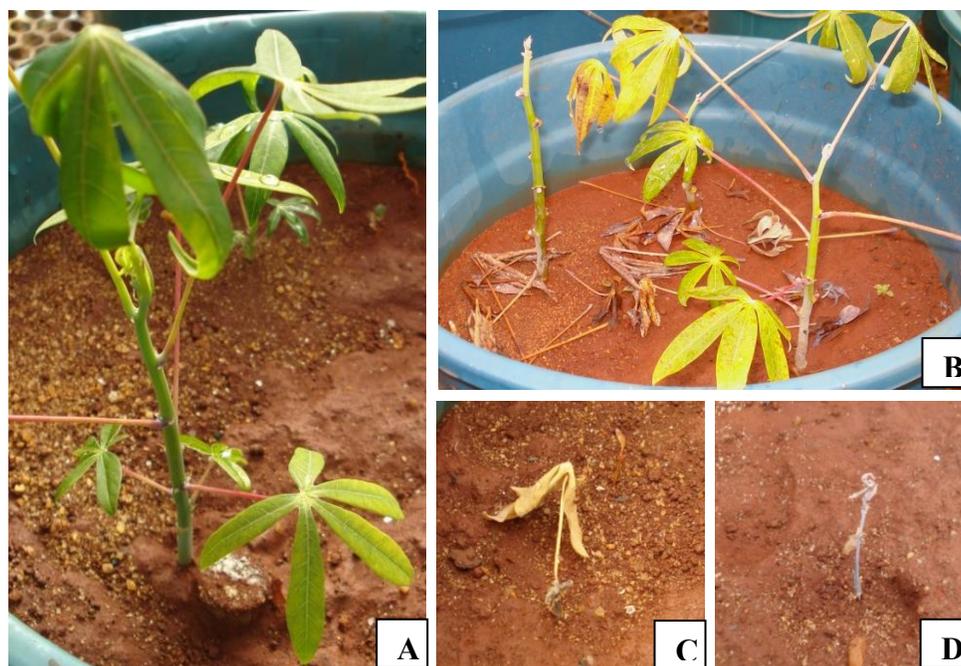


Figura 1 Sintomas de *F. solani* em plantas de mandioca: Sinais do patógeno, micélio e conídios de *F. solani* (A), queda severa de folhas, amarelecimento e podridão na base das plantas (B), morte de plântulas após germinação das gemas (C-D)

Não existem produtos químicos recomendados para o controle das podridões radiculares da mandioca (SISTEMA DE AGROTÓXICOS FITOSSANITÁRIOS, 2013). No controle pode ser usado plantio em solos com boa drenagem, rotação de culturas em áreas de várzeas na estação seca, com milho e arroz, plantio em camalhões de 30 cm de altura, uso de manivas saudáveis, o tratamento químico pela imersão por 10 minutos numa suspensão de Fosetyl – Al (80%), na concentração de 2 g/L e uso de variedades resistentes como a EMBRAPA-8 (KIMATI et al., 2005). Embora tais técnicas possam ser realizadas, pesquisas indicam a baixa eficiência e a necessidade da implementação de integração de métodos, até mesmo o uso de microrganismos

antagônicos ao fitopatógeno (CASTILHO; FUKUDA; TUPINAMBA, 1990; FARIAS, 2006; FUKUDA, 1991; 1993).

## **2.8 Rizobactérias e bactérias endofíticas no biocontrole de doenças de plantas**

Procariontes podem ser benéficos por promoverem crescimento e/ ou, o controle biológico de enfermidades (LUCY; REED; GLICK, 2004) e, geralmente, são de três categorias: rizobactérias, residentes de filoplano e endofitas. As rizobactérias têm como habitat a rizosfera e o rizoplano de plantas, quando benéficas e promotoras de crescimento são chamadas de PGPRs (plant growth promoting rhizobacteria). Beattie e Lindow (1999) consideram como residentes de filoplano as bactérias capazes de nele sobreviverem e se multiplicarem (ROMEIRO; GARCIA, 2003). Bactérias endofíticas são aquelas que vivem nos tecidos de plantas saudáveis sem se tornarem patogênicas (RYAN et al., 2008).

Diversos são os mecanismos pelos quais as bactérias podem promover crescimento de plantas, dentre os quais a fixação de nitrogênio, solubilização de fosfatos, facilitação da absorção de Fe, alterações benéficas no crescimento e na morfologia do sistema radicular, produção de fitohormônios, mineralização de matéria orgânica e melhoria das propriedades físicas do solo (BLOEMBERG; LUNTENBERG, 2001; LUCY; REED; GLICK, 2004; ROMEIRO, 2007; VESSEY, 2003; ).

Segundo Romeiro (2005), a rizosfera favorece intensamente a diversidade e atividade microbiana, por se tratar de um ambiente rico em nutrientes, açúcares, aminoácidos e ácidos orgânicos. Os organismos presentes nesse ambiente, além da capacidade de multiplicação, diversidade metabólica, devem ser capazes de produzir substâncias antagônicas, favorecendo o processo

de colonização radicular (ROMEIRO; GARCIA, 2003). Diversos são os exemplos de sucesso do uso de bactérias benéficas, dentre os quais atuando no biocontrole de patógenos do solo (MELO, 1998; ROBBS, 1991).

Além das rizobactérias, as endofíticas, também, podem atuar como biocontroladoras e promotoras de crescimento. Segundo Melo, Faria e Teixeira (2005), elas existem em grande diversidade na cultura da mandioca (Figura 2b). Já foram identificadas 48 espécies bacterianas pertencentes a 27 gêneros, em plantios comerciais no estado de São Paulo e em etno variedades coletadas em aldeias indígenas e pequenos agricultores nos estados do Amazonas e Bahia, sendo as mais frequentes do gênero *Bacillus*.

Assim como para as rizobactérias, diversos são os exemplos da aplicação de bactérias endofíticas na produção agrícola. Elas aumentam o crescimento de plantas, por meio da produção de fitohormônios (BARBIERI et al., 1986), da produtividade pela disponibilidade de minerais (MURTY; LADHA, 1988), resistência a doenças (CHEN et al., 1995), fixação de nitrogênio (WEBSTER et al., 1997) e formação de tubérculos em condições de estresse (BENSALIM; NOWAK; ASIEDU, 1998).

Tais organismos antagonísticos têm sido avaliados por controlar podridões radiculares causadas por *Fusarium* sp. em cravo (ALDRICH; BAKER, 1970; MICHAEL; NELSON, 1972), trigo (STEVENSON, 1956), soja (CUBETA; HARTMAN; SINCLAIR, 1985), cebola (UTKHEDE; RAHE, 1983), pepino (MELO; VALARINI, 1995), bananeira (CARDOSO; LUQUINE; SILVA, 2012), abacaxi (MELLO, 2001), milho e pepino (MELO, 1998). E, de acordo com a Biological Control Committee (2004), existem produtos formulados e em comercialização em diversas culturas como HiSticK (*B. subtilis* MBI600), Kodiak HB (*B. subtilis*), Mycostop (*Streptomyces griseovirides* K61), Companion (*Bacillus subtilis* GBO3), Nogall (Agrobacteria. radiobacter K1026), Subtilex (*B. subtilis* MBI600) e YieldShield (*B. pumillus* GB34).

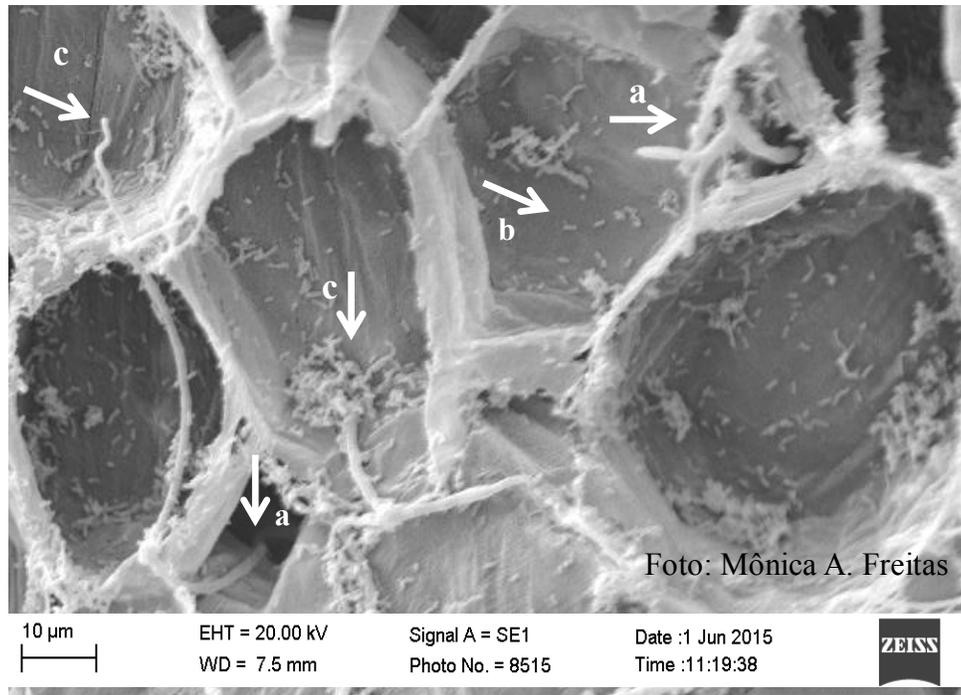


Figura 2 Interação entre *Fusarium solani* e a bactéria endofítica MAIF2a (*Microbacterium imperiale*) em hastes de mandioca, a: colonização intercelular de hifas fúngicas de *F. solani*, b: Célula bacteriana de MAIF2a, c: Hifas de *F. solani* penetrando células intracelularmente

## REFERÊNCIAS

- ALBANO, J.; MILLER, W. B. Light degrades iron-chelates in fertilizer solutions, affecting physiology of iron acquisition in Marigold (*Tagetes erecta* L.). In: SOUTHERN NURSERYMEN'S ASSOCIATION RESEARCH CONFERENCE, 40., Marietta, 1995. **Proceedings...** McMinnville: SNA, 1995. p. 18-20. Disponível em: <<http://www.clemson.edu/hort/sctop/bsec/bsec04.php>>. Acesso em: 23 jun. 2013.
- ALDRICH, J.; BAKER, R. Biological control of *Fusarium roseum* f. sp. dianthi by *Bacillus subtilis*. **Plant Disease Reporter**, Washington, v. 54, n. 5, p. 446-448, 1970.
- BARBIERI, P. et al. Wheat inoculation with *Azospirillum brasiliense* Sp6 and some mutants altered in nitrogen fixation and indole-3-acetic acid production. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 36, n. 1, p. 87-90, Aug. 1986.
- BAR-NESS, E. et al. Iron uptake by plants from microbial siderophores: a study with 7-nitrobenz-2 oxa-1,3-diazole desferrioxamine as fluorescent ferrioxamine B analog. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 99, n. 4, p. 1329-1335, Aug. 1992.
- BEATTIE, G. A.; LINDOW, S. E. Bacterial colonization of leaves: a spectrum of strategies. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 89, n. 5, p. 353-359, May 1999.
- BENSALIM, S.; NOWAK, J.; ASIEDU, S. K. A plant growth promoting rhizobacterium and temperature effects on performance of 18 clones of potato. **American Journal of Potato Research**, Orono, v. 75, n. 3, p. 145-152, May 1998.
- BIOLOGICAL CONTROL COMMITTEE. Commercial biocontrol products available for use against plant pathogens. **APS Biological Control**, Saint Paul, p. 9, 2004. Disponível em: <<http://www.oardc.ohio-state.edu/apsbcc/productlist.htm>>. Acesso em 21 de jun. de 2013.
- BLOEMBERG, G. V.; LUGTENBERG, B. J. J. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 4, n. 4, p. 343-350, Aug. 2001.
- BORBA, A. L. C. et al. Fungos fitopatogênicos na pós-colheita de mandioca sob processamento mínimo. **Revista Técnico Científica**, Santa Catarina, v. 3, n. 1, p. 762, 2012.

BRIAT, J. F. Iron assimilation and storage in prokaryotes. **Journal General Microbiology**, London, v. 138, n. 12, p. 2475-2483, Dec. 1992.

CARDOSO, E. B.; LUQUINE, L. S.; SILVA, H. S. A. Aplicação conjunta de rizobactérias e bactérias endofíticas para o biocontrole do *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense*. In: JORNADA CIENTÍFICA EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA, 6., 2012, Cruz das Almas. **Anais...** Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2012.

CARDOSO, E. M. R.; POLTRONIERI, L. S.; TRINDADE, D. R. **Recomendações para o controle da podridão mole de raízes de mandioca no Estado do Pará**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2000. 13p. (Circular Técnica, 9).

CASANO, L. M. et al. Chlororespiration and poisoning of cyclic electron transport. Plastoquinone as electron transporter between thylakoid NADH dehydrogenase and peroxidase. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 275, n. 2, p. 942-948, Jan. 2000.

CASTILHO, E.; FUKUDA, C.; TUPINAMBA, E. A. Podridão radicular no estado de Sergipe. I Isolamento e patogenicidade. **Revista Brasileira de Mandioca**, Cruz das Almas, v. 9, n. 1-2, p. 90-99, jun. 1990.

CHEN, C. et al. Biological control of *Fusarium* wilt on cotton by use of endophytic bacteria. **Biological Control**, Orlando, v. 5, n. 1, p. 83-91, Mar. 1995.

COLOMBO, C. **Estude de la diversité génétique de maniocs américains (*Manihot esculenta* Crantz) por les marqueurs moléculaires (RAPD et AFLP)**. 1997.144 p. Thèse (Doctorate en Génétique) - Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier, Montpellier, 1997.

COSTA, I. R. S.; MORALES, E. A. V. Cassava genetic resources in South America. In: INTERNATIONAL NETWORK FOR CASSAVA GENETIC RESOURCES, 1., 1994, Cali. **Report...** Cali: CIAT, 1994. p. 16-20.

CUBETA, M. A.; HARTMAN, G. L.; SINCLAIR, J. B. Interaction between *Bacillus subtilis* and fungi associated with soybean seeds. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 69, n. 6, p. 506-509, 1985.

CURIE, C.; BRIAT, J. F. Iron transport and signaling in plants. **Annual Review Plant Biology**, Palo Alto, v. 54, p. 183-206, 2003.

DEMAEYER, E. M.; ADIELS-TEGMAN, M. The prevalence of anaemia in the world. **World Health Statistics Quarterly**, Geneve, v. 38, n. 3, p. 302-316, 1985.

DOMINGUEZ, C. E.; CEBALLHOS, L. F.; FUENTES, C. Morfología de la planta de yucca. In: DOMINGUEZ, C. E. (Ed.). **Yuca: investigación, producción y utilización**. Cali: Pnud, 1982. p. 29-49.

FARAG, M. A. et al. GC-MS SPME profiling of rhizobacterial volatiles reveals prospective inducers of growth promotion and induced systemic resistance in plants. *Phytochemistry*, Oxford, v. 67, n. 20, p. 2262- 2268, Oct. 2006.

FARIAS, A. B. N. **Aspectos sócio econômicos e agrônômicos da mandioca**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006. 817 p.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **Save and grow: Cassava**. Rome: FAO, 2013. 130 p.

FUKUDA, C. Doenças da mandioca. In: CENTRO NACIONAL DE PESQUISA DE MANDIOCA E FRUTICULTURA TROPICAL. **Instruções práticas para cultivo da mandioca**. Cruz das Almas: Embrapa, 1993. p. 53-56.

FUKUDA, C. **Podridão das raízes da mandioca**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 1991. (Mandioca em Foco, 08).

FUKUDA, C.; OTSUBO, A. A. **Cultivo da mandioca na região centro sul do Brasil**. Dourados: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2003. Disponível em: <[http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mandioca/mandioca\\_centrosul/index.htm](http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mandioca/mandioca_centrosul/index.htm)>. Acesso em: 15 jun. 2013.

FUKUDA, C.; OTSUBO, A. A. **Cultivo da mandioca na região centro sul do Brasil**. Dourados: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004. 116 p.

FUKUDA, W. M. G. **Técnica de polinização manual de mandioca**. Cruz das almas: Embrapa, 1980. 3 p. (Micelânia, 1).

FUKUDA, W. M. G.; ALVES, A. A. C. Banco ativo de germoplasma de mandioca do Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura (1976-1988). **Revista Brasileira de Mandioca**, Cruz das Almas, v. 6, n. 2, p. 65-67, 1987a.

FUKUDA, W. M. G.; ALVES, A. A. C. Germoplasma de mandioca no Brasil. **Revista Brasileira de Mandioca**, Cruz das Almas, v. 6, n. 2, p. 109-111, 1987b.

GLICK, B. R. et al. **Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth promoting bacteria**. London: Imperial college Press, 1999. 200 p.

GOOS, R. J. et al. Greenhouse evaluation of controlled release iron fertilizers for soybean. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 27, n. 1, p. 43-55, 2004.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **SIDRA 2013**: sistema IBGE de recuperação automática. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2015. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/imprensa/ppts/00000013314006112013403006271184.pdf>>. Acesso em: 30 maio 2015.

KAVANO, K. Mejoramiento genético de yuca para productividad. In: DOMINGUEZ, C. E. (Ed.). **Yuca**: investigation y utilización. Cali: Pnud, 1982. p. 91-112.

KAWANO, K.; AMAYA, A.; RIOS, M. Factors affectin efficiency of hybridization and selection in cassava. **Crop Science**, Madison, v. 18, n. 3, p. 373-376, Aug. 1978.

KIMATI, H. et al. **Manual de fitopatologia**: doenças das plantas cultivadas: volume 2. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. 706 p.

LORENZI, J. O.; DIAS, C. A. C. **Cultura da mandioca**. Campinas: CATI, 1993. 39 p. (Boletim Técnico da CATI, 211).

LOZOFF, B.; WACHS, T. D. Functional correlation of nutritional anemia in infancy and childhood- child development and behavior. In: RAMAKRISHNAN, U. (Ed.). **Nutritional anemias**. Boca Raton: CRC Press, 2001. p. 69-88.

LUCENA, J. J. Fe chelates for remediation of Fe chlorosis in Strategy I plants. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 26, n. 10, p. 1969-1984, 2003.

LUCY, M.; REED, E.; GLICK, B. R. Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 86, n. 1, p. 1-25, Aug. 2004.

MARSCHNER, H.; ROMHELD, V. Strategies of plants for acquisition of iron. **Plant and Soil**, The Hague, v. 165, n. 2, p. 261-274, Jan. 1994.

MASSOLA, N. S.; BEBENDO, I. P. Doenças da mandioca. In: KIMATI, H. **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Embrapa, 2005. p. 501-510.

MATTOS P. L. P.; CARDOSO, E. M. R. **Cultivo da mandioca para o estado do Pará**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura- Sistemas de Produção, 2003. Disponível em: <[http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mandioca/mandioca\\_para/cultiva](http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mandioca/mandioca_para/cultiva)>. Acesso em: 03 jul. 2013.

MELLO, M. R. F. **Efeito de bactérias na promoção de crescimento e no biocontrole da Fusariose em mudas de abacaxi micropropagadas**. 2001. 94 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal Rural de Recife, Recife, 2001.

MELO I. S.; VALARINI, P. J. Potencial de rizobactérias no controle de *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. em pepino (*Cucumis sativum* L.). **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 52, n. 2, p. 326-330, maio/ago. 1995.

MELO, I. S. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Controle Biológico**; volume 1. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 1998. p. 17-67.

MELO, I. S.; FARIA, R.; TEIXEIRA, M. A. Diversidade de bactérias endofíticas na cultura da mandioca. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, Jaguariúna, v. 33, p. 6-24, dez. 2005.

MICHAEL, A. H.; NELSON, P. E. Antagonistic effect of soil bacteria on *Fusarium roseum* "Culmorum" from Carnation. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 62, n. 9, p. 1052-1056, 1972.

MUNIZ, M. F. S. Caracterização de isolados de *Phytophthora drechsleri*, agente causal da podridão mole de raízes de mandioca. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 2, p. 195-198, mar./abr. 2006.

MURGIA, I. et al. *Arabidopsis thaliana* plants overexpressing thylakoidal ascorbate peroxidase show increased resistance to Paraquat- induced photooxidative stress and to nitric oxideinduced cell death. **Plant Journal**, Oxford, v. 38, n. 6, p. 940-953, June 2004.

MURTY, M. G.; LADHA, J. K. Influence of Azospirillum inoculation on the mineral uptake and growth of rice under hydroponic conditions. **Plant and Soil**, The Hague, v. 108, n. 2, p. 281-285, May 1988.

NASSAR, N. M. A. Genetic resource of cassava 4 chromosome behavior in some wild *Manihot* species. **Indian Journal Genetic and Plant Breeding**, New Delhi, v. 38, p. 135-137, 1978.

NEILANDS, J. B.; LEONG, S. A. Siderophores in relation to plant growth and disease. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 37, p. 187-208, June 1986.

OLIVEIRA, M. A.; FIORINE, R. A. Análise de crescimento em mudas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) provenientes de estacas em diferentes recipientes para cultivo. **Revista Raízes e Amidos Tropicais**, Botucatu, v. 2, p. 12-26, out. 2006.

ONYEKA, T. J.; DIXON, A. G. O.; EKPO, E. J. A. Assessment of laboratory methods for evaluating cassava genotypes for resistance to root rot disease. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 159, n. 3, p. 461-467, Apr. 2005.

PARE, P. W. et al. Elicitors and priming agents initiate plant defense responses. **Photosynthesis Research**, Hague, v. 85, n. 2, p. 149-159, Aug. 2005.

PEREIRA, A. V. **Utilização de análise multivariada na caracterização de germoplasma de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz)**. 1989. 180 p. Tese (Doutorado em Melhoramento Genético) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1989.

POLTRONIERI, L. S. et al. **Podridão do coleto de mudas de mandioca no Estado do Pará causada por *Fusarium solani* (Mart.) Sacc.** Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2002. 2 p. (Comunicado Técnico, 67).

ROBBS, C. F. Bactérias como agentes de controle biológico de fitopatógenos. In: BETTIOL, W. **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: Embrapa, 1991. p. 121-133.

ROGERS, D. J.; APPAN, S. G. ***Manihot* and manihotoides (*Euphorbiaceae*)**. Royal Oak: Hafner Press, 1973. 272 p.

ROMEIRO, R. S. **Bactérias fitopatogênicas**. Viçosa: Editora da UFV, 2005. 417 p.

ROMEIRO, R. S. **Controle biológico de doenças de plantas: procedimentos**. Viçosa: Editora da UFV, 2007. 172 p.

ROMEIRO, R. S.; GARCIA, F. A. O. Controle biológico de enfermidades de plantas incitadas por bactérias. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 11, n. 1, p. 195-228, 2003.

ROMHELD, V. Aspectos fisiológicos dos sintomas de deficiência e toxicidade de micronutrientes e elementos tóxicos em plantas superiores. In: FERREIRA, M. E. et al. **Micronutrientes e elementos tóxicos na agricultura**. Jaboticabal: CNPq, 2001. p. 71-86.

ROSS, J.; HORTON, S. **The economic consequences of iron deficiency**. Ottawa: The Micronutrient Initiative, 1998. 46 p.

RYAN, R. P. et al. Bacterial endophytes: recent developments and applications. **FEMS, Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 278, n. 1, p. 1-9, Jan. 2008.

RYU, C. M. et al. Bacterial volatiles promote growth in Arabidopsis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 100, n. 8, p. 4927-4932, Apr. 2003.

SCHAAL, B. et al. Phylogenetic analysis of the genus *Manihot* based on molecular markers. In: CASSAVA BIOTECHNOLOGY NETWORK, 2., 1994, Borgon. **Proceeding...** Borgon: {s.n.}, 1994. p. 62-70. (Working Document, 150).

SECOND, G.; IGLESIAS, C. The state of the use of cassava genetic diversity and a proposal to enhance it. In: COOPER, H. D.; SPILLANE, C.; HODGKIN, T. (Ed.). **Broadening the genetic base of crop production**. Osom: Cabi, 2000. p. 201-222.

SERRA, I. M. R. S. et al. *Scytalidium lignicola* em mandioca: ocorrência no Estado do Maranhão e reação de cultivares ao patógeno. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 35, n. 4, p. 327-328, out./dez. 2009.

SISTEMA DE AGROTÓXICOS FITOSSANITÁRIOS. Disponível em: <[http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Acesso em: 21 de jun. 2013.

SPILLER, S.; CASTLEFRANCO, A.; CASTLEFRANCO, P. Effects of iron and oxygen on chlorophyll biosynthesis. I. In vivo observations on iron and oxygen-deficient plants. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 69, n. 1, p. 107-111, Jan. 1982.

STEVENSON, I. L. Antibiotic activity of *Actinomycetes* in soil and their controlling effects on root-rot of wheat. **Journal of General Microbiology**, London, v. 14 p. 440- 448, Apr. 1956.

TOTTEY, S. et al. *Arabidopsis* CHL27, located in both envelope and thylakoid membranes, is required for the synthesis of protochlorophyllide. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 100, n. 26, p. 4350-4354, Dec. 2003.

UTKHEDE, R. S.; RAHE, J. E. Interactions of antagonists and pathogens in biological control of onion white rot. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 73, n. 6, p. 890-893, 1983.

VAROTTO, C. et al. The metal ion transporter IRT1 is necessary for iron homeostasis and efficient photosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Journal**, Oxford, v. 31, n. 5, p. 589–599, Sept. 2002.

VESSEY, J. K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and Soil**, The Hague, v. 255, n. 2, p. 571-586, Aug. 2003.

WEBSTER, G. et al. Interactions of rhizobia with rice and wheat. **Plant and Soil**, The Hague, v. 194, n. 1, p.115-122, July 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global database on iron deficiency and anaemia, micronutrient deficiency information system**. Geneva: WHO, 2008. 115 p.

YUNTA, F. et al. Methodology to screen new iron chelates: prediction of their behavior in nutrient solution and soil conditions. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 26, n. 10-11, p. 1955 - 1968, 2003.

ZHANG, H. et al. A soil bacterium regulates plant acquisition of iron via deficiency-inducible mechanisms. **Plant Journal**, Oxford, v. 58, n. 4, p. 568–577, May 2009.

ZHANG, H. et al. Soil bacteria augment *Arabidopsis* photosynthesis by decreasing glucose sensing and abscisic acid levels in planta. **Plant Journal**, Oxford, v. 56, n. 2, p. 264–273, Oct. 2008.

ZHANG, H.; KIM, M. S.; KRISHNAMACHARI, V. Rhizobacterial volatile emissions regulate auxin homeostasis and cell expansion in *Arabidopsis*. **Planta**, Berlin, v. 226, n. 4, p. 839-851, Sept. 2007.

**SEGUNDA PARTE – ARTIGOS**

**ARTIGO 1 Augmenting iron accumulation in cassava by the beneficial soil bacterium *Bacillus subtilis* (GBO3)**

Mônica A. Freitas, Flavio H. V. Medeiros, Samuel P. Carvalho, Luiz R. G. Guilherme, William D. Teixeira, Huiming Zhang<sup>1</sup> and Paul W. Paré<sup>1\*</sup>

**Artigo formatado de acordo com o periódico *Frontiers In Plant Science***

Departments of Plant Pathology, Agriculture and Soil Science; Federal University of Lavras; Lavras, MG, Brazil

<sup>1</sup>Chemistry & Biochemistry Department, Texas Tech University, Lubbock, TX 79409, USA

\*Correspondence: Paul W Paré, Department of Chemistry & Biochemistry; Texas Tech University, Lubbock, TX 79409, USA; E-mail: paul.pare@ttu.edu

**Abstract**

Cassava (*Manihot esculenta*), a major staple food in the developing world, provides a basic carbohydrate diet for over half a billion people living in the tropics. Despite the iron abundance in most soils, cassava provides insufficient iron for humans as the edible roots contain 3-12 times less iron than other traditional food crops such as wheat, maize, and rice. With the recent identification that the beneficial soil bacterium *Bacillus subtilis* (strain GB03) activates iron acquisition machinery to increase metal ion assimilation in *Arabidopsis*, the question arises as to whether this plant-growth promoting rhizobacterium (PGPR) also augments iron assimilation to increase endogenous iron levels in cassava. Biochemical analyses reveal that shoot-propagated cassava with GB03-inoculation exhibit elevated iron accumulation after 140 days of plant growth as determined by X-ray microanalysis and total foliar iron analysis. Growth promotion and increased photosynthetic efficiency were also observed for greenhouse-grown plants with GB03-exposure. These results demonstrate the potential of microbes to increase iron accumulation in an important agricultural crop and is consistent with idea that microbial signaling can regulate plant photosynthesis.

**Keywords:** cassava, *Bacillus subtilis*, iron induction, plant growth promotion, x-ray microanalysis

## Introduction

*Manihot esculenta* (cassava) is a perennial shrub in the Euphorbiaceae family native to South America and cultivated primarily by small-scale farmers for its storage roots that are eaten as a vegetable (Meenakshi et al., 2010). The tuberous roots provide the third largest source of food carbohydrates in the tropics, after rice and maize. Commercial cassava is propagated from stem cuttings as roots and do not produce buds (Food and Agriculture Organization, 2013). The semi-woody species thrives on nutrient deficient soils ranging from acidic to alkaline conditions and the presence of cyanide-rich defenses minimize damage due to insect herbivory (Blagbrough et al., 2010). Moreover as a drought-tolerant crop, it is capable of growing in marginal soils and due to its wide harvesting window serves as fall-back crop in times of famine (Montagnac et al., 2009). In terms of food calories, cassava is 25-125% more efficiency per unit area-time than other staple crops such as rice, wheat or maize (Meenakshi et al., 2010).

While this low-tech crop is readily grown by poor subsistence farmers throughout Latin America, Africa, and Southeast Asia, low-iron abundance in cassava is associated with iron deficiency, especially for women and children on a cassava-rich diet. To combat iron deficiency in poor regions of the world associated with a cassava-rich diet, plant biofortification strategies are being sought to increase root-iron availability (Sayre et al., 2011). While most soil in which cassava is grown have sufficient iron, oxidized iron,  $\text{Fe}^{+3}$  in neutral or alkaline soils results in low iron uptake unless iron assimilation mechanisms are activated in the plant (Curie and Briat, 2003). A network of metabolic events coordinates the mobilization of iron pools in the immediate vicinity of root epidermal cells, as well as the uptake and distribution of iron within the plant. This strategy involves three steps for iron uptake: proton exudation to enhance iron mobility, reduction of  $\text{Fe}^{3+}$  to  $\text{Fe}^{2+}$ , and import of  $\text{Fe}^{2+}$ .

A transgenic approach to increase endogenous iron levels has been to express an iron assimilatory protein (FEA1) from an alga (*Chlamydomonas reinhardtii*) in cassava for higher iron uptake (Leyva-Guerrero et al., 2012). While in such transgenic plants, a 3-fold increase in root iron is observed within six months of planting, such lines still face approval from a patchwork of tropical regulatory agencies as well as the dissemination of such plants to millions of local farmers that currently utilize alternative cassava cultivars (Gonzalez et al., 2009).

Low-molecular weight iron-binding molecules referred to as siderophores can also facilitate iron uptake by chelating  $\text{Fe}^{3+}$  and significantly increasing the mobility of iron in the rhizosphere. In dicots, phytosiderophore-chelated  $\text{Fe}^{3+}$  can be directly shuttled into the roots without iron reduction by specific plant transporters (Curie and Briat, 2003). In addition, soil microbes produce and release siderophores (Neilands and Leong, 1986) that are proposed to facilitate iron mobility in the soil and uptake of iron by plants (Bar-Ness et al., 1992; Glick, 1999). *Bacillus subtilis* (GB03) is a commercially-available PGPR strain that can be introduced into the soil at the time of planting via seed coating since spores are stable over time (Choi et al. 2014). Unlike many plant-growth promoting rhizobacterial strains that activate plant growth by directly producing and releasing indole-3-acetic acid and/or gibberellins, GB03 emits a bouquet of volatile metabolites, devoid of classic phytohormones that are capable of triggering plant growth promotion (Paré et al. 2005; Ryu et al. 2003). These volatile organic compounds have been shown to activate differential expression of approximately 600 transcripts related to cell wall modifications, primary and secondary metabolism, stress responses, hormone regulation and iron homeostasis (Ryu et al. 2003; Farag et al. 2006; Zhang et al. 2007). Arabidopsis profiling of GB03-induced transcripts has resulted in a new paradigm for PGPR-mediated iron uptake. While some soil microbes are proposed to enhance iron

mobility and uptake via production of bacterial siderophores (Neilands and Leong 1986; Bar-Ness et al. 1992; Glick et al. 1999; Sharma et al. 2003), GB03 enhances *Arabidopsis* iron accumulation via activation of the plant's own iron acquisition machinery (Zhang et al. 2009). Mechanistic studies reveal that GB03 transcriptionally up-regulates the Fe-deficiency-induced transcription factor 1 (FIT1) that is necessary for GB03-induction of ferric reductase FRO2 and the iron transporter IRT1 (Zhang et al. 2009). Given the important role of iron in the synthesis of enzymatic machinery for photosynthesis, the potential role of GB03 in cassava iron assimilation and photosynthesis has been investigated. Herein is reported the effect of GB03 on growth promotion, iron accumulation and photosynthetic efficiency in soil-grown cassava plants.

## **Material and Methods**

### *Bacterial cultures and plant treatment.*

*Bacillus subtilis* strain GBO3 was maintained on half-strength Murashige and Skoog (1962) solid media prepared with 1.5 % (w/v) sucrose and 0.8 % (w/v) agar. For plant treatment, GB03 was streaked into MCF liquid medium (1 L) containing yeast extract (13.8 g), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (2.5 g), anhydrous KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1 g), NaCl (2.5 g), sucrose (6.5 g), manganese sulfate (0.1 g) and magnesium sulfate (0.25 g) and incubated at 25 °C for 48 hrs. The bacterial suspension was then diluted to an OD<sub>570</sub> nm absorbance of 0.7.

Commercially-grown cassava (*Manihot esculenta* cv. IAC576-70) was field harvested locally and stems were cut into equal sizes (ca. 20 g) so as to contain only one bud per cutting. Stem sections were surface sterilized by immersion in ethanol 70% for 30 seconds, hypochlorite 0.5% active chlorine for 2 minutes and

water rinsed (2X) before being treated with GB03 suspension or MCF. Treated one-bud cuttings were individually immersed in the bacterial suspension in a volume enough to fully cover the stem surface for half an hour then rinsed with distilled water and cuttings immersed in MCF media alone were used as a control. Treated shoots were planted after 12 hours in 10-L pots containing a soil : sand (4:1) mixture. Chemical analysis of the soil substrated indicated the following elementary composition ( $\text{mg dm}^{-3}$ ): potassium 16, phosphorus 2.3, calcium 2.4, zinc 0.8, iron 32.1, manganese 23.7, copper 1.9, boron 0.2, sulphur 23.1 and organic matter 1.2; pH was 6.3. Plants were grown for 140 days during the summer in a greenhouse located in Lavras, MG Brazil at  $21^{\circ} 14' 43$  south latitude and  $44^{\circ} 59' 59$  west longitude with an altitude of 900 meters. Temperature ranged from  $20 - 30^{\circ}\text{C}$  with relative humidity of 40-60%. Pots were arranged in a completely randomized design with three replicates per treatment. Each pot consisted of three buds with the two buds that started to produce leaves last being removed within the first week of the experiment.

#### *Plant growth measurements.*

Leaf physiological parameters on the fifth fully expanded leaf including photosynthesis (A) and transpiration (E) were obtained 140 days after cassava planting using an infrared gas analyzer (IRGA) ACL model PRO 1 (Analytical Development Co. Ltd, Hoddesdon, UK) (Silveira et al., 2012). Immediately after collecting non-destructive measurements, plants were harvested for plant height, shoot dry weight and iron content via spectrophotometric and X-ray microanalysis. At the time of leaf sampling, plants were visually examined to estimate for iron deficiency (i.e. leaf chlorosis) and senescence (i.e. leaf necrosis).

*Iron concentration measurements.* Plant iron levels were determined as described (Lobreaux and Briat, 1991). Glassware was washed thoroughly with tap water and then deionized water to avoid iron cross contamination between sample preparations. The same leaf used to measure photosynthesis was sampled for iron concentration measurements; while only making contact with the petiole, the leaf was wrapped in aluminium foil and stored in polystyrene for iron analysis. Leaves (0.5 g) were ground with a mortar and pestle in liquid N<sub>2</sub>, mineralized according to Beinert (1978) and reduced with thioglycolic acid. The Fe<sup>2+</sup>-O-phenanthroline complex was measured spectrophotometrically at 510 nm and iron concentration was reported on a tissue dry-weight basis using a wet-weight conversion factor determined by weighing the tissue aliquot before and after desiccation at 100°C.

Localized leaf iron content was determined by X-ray microanalysis for the fifth fully expanded leaf of each analyzed plant. From each collected leaf, two fragments of the leaf blade (3x3 mm) were excised from the middle part of the middle leaflet and processed for scanning electron microscopy. The two specimens obtained for each replicate were mounted on stubs, the leaf samples were adhered to the stubs with adhesive double sided carbon tape, one of the disks was mounted with exposed adaxial surface and the other with the abaxial surface. Samples were then covered with carbon and observed by scanning electron microscope. All mounted specimens were analyzed in Leo 040 Evo and an image of each sample surface was generated and digitally recorded, under the conditions of 20 kv and work distance of 9 mm and using Espirit 1.9 software (Bruker, Madison).

*Experimental design and statistical analysis.*

All data were subjected to analysis of variance (ANOVA), using the statistical program SISVAR (Ferreira, 2011) and for significant effects, means compared by Tukey test at 5% probability.

**Results**

Since inducible iron uptake by *Bacillus subtilis* (GB03) is associated with growth promotion in the model plant *Arabidopsis*, growth parameters including plant height and biomass were measured in cassava plants exposed to GB03. Surface-sterilized shoot cuttings, inoculated with GB03 or water (as a control) were grown in soil and harvested after 140 days. Although all plants were grown under the same environmental conditions in terms of light, soil-nutrients and water, GB03-treated plants exhibited significant growth promotion with respect to plant height and total above-ground dry biomass at 28 and 59% greater values respectively, when compared with GBO3 untreated plants (Figure 1). As a first approximation, cassava plants exhibiting increased height, branching, and shoot biomass can be correlated with greater root yields (Ntawuruhunga and Dixon, 2010) albeit harvest index (root biomass/total biomass) is the preferred parameter with breeders for cultivar selection. GBO3-treated plants also exhibited a delay in leaf senescence and abscission. Moreover, external symptoms of nutrient deficiency were less visible in GB03-exposed plants compared to water controls. Such visual indicators of micronutrient deficiency included leaf interveinal chlorosis that is symptomatic of iron deficiency and development of leaf necrotic spots/ early defoliation symptomatic of senescence (Figure 1).

In addition to GB03-induced plant-growth promotion, cassava plants were chemically analyzed for increases in iron accumulation as has been previously reported with *Arabidopsis* (Zhang et al., 2009). Spectrophotometric analysis of iron in the aerial portions of the plant showed almost a 400% increase in iron abundance with GB03 treatment than water controls ( $p = 0.0004$ ). Since photosynthetic machinery can be unequally distributed in leaves with respect to the abaxial and adaxial surface (Fernández et al., 2008), scanning electromicrograph X-ray analysis was performed to detect nutrient abundance in highly localized foliar regions. Qualitative analysis of such foliar images, regardless of the considered treatment, indicated greater iron accumulated on the adaxial versus abaxial leaf surface, in an apparently random distribution throughout the leaf surface, not in concentrated leaf regions such as the spongy cells in the vicinity of veins, as previously reported for *Cornus stolonifera* (Lambert et al., 2006). Interestingly with GB03 exposure, leaf-side differences in iron abundance increased, with an 8-fold greater adaxial iron levels and no significant iron change on the abaxial side for GB03-treated plants (Figure 2). Foliar microanalysis for other nutrients did not exhibit GB03 inducibility, except for potassium in which a 17% increase with GB03 treatment was observed on abaxial leaves (Figure 2).

Consistent with a GB03-induced increase in iron in cassava, physiological-parameters associated with energy-acquisition including net photosynthesis and transpiration increased 40 and 43% respectively, for GB03-treated plants (Figure 3)

## **Discussion**

Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) has long been studied to promote

plant benefits from disease control to plant development and increased nutrient uptake in the absence of the pathogen (Lugtenberg and Kamilova, 2009). Cassava represents a staple food in many developing countries in the world and for its production, growers sometimes face both reduced yield due to the successive cultivation of the same crop without rotation and low use of fertilizers. In those regions, iron content in the daily diet is particularly low and supplement of the mineral is often a part of medical recommendation (Food and Agriculture Organization, 2013).

Chemical signals emitted by GB03 that trigger growth promotion in *Arabidopsis* have been reported (Ryu et al., 2003; Farag et al., 2006); GB03 has also been shown to induce biotic and abiotic tolerance, as well as increased nutrient uptake (Ryu et al., 2003; Paré et al., 2005; Zhang et al., 2007; Zhang et al., 2009) in *Arabidopsis* even though GB03 was not commercialized for this model plant. In contrast, cassava has not been previously reported to be responsive to GB03 induction. Augmented iron uptake has been demonstrated here to occur in cassava after exposure to GB03. While regular iron content in cassava leaves ranges from 4 to 83 ppm (Montagnac et al., 2009), the GB03-treated could increase *ca.* 300% the maximum reported iron leaf content, an increase closer to the one obtained for transgenic cassava expressing the iron transporter FEA1 (Leyva-Guerrero et al., 2012).

Since GB03 has been shown to increase the abundance of transcripts involved in iron uptake and transport as well as induce rhizosphere acidification that directly mobilizes soluble iron (Zhang et al., 2009), future studies will begin to examine the mechanism of inducible iron accumulation in cassava. Similar to GB03 induction of iron in *Arabidopsis* (Zhang et al., 2007), iron accumulation in cassava was accompanied by an increase in the photosynthetic rate and biomass accumulation (Figure 3). The increase in iron was observed on the adaxial leaf

side regardless of the treatment and may be linked with greater chlorophyll levels at this location (Figure 2). Elevated GB03-induced transpiration mobilizes iron into leaves once the metal ion has been absorbed by the roots and transferred to the xylem. The iron is translocated to the shoot through the transpiration flow in the form of complexes with organic acids (Curie and Briat, 2003) and accumulates in chloroplasts (Terry and Abadia, 1986) where most of the chlorophyll is concentrated (Fernández et al., 2008) allowing for optimal photosynthetic performance (Black and Osmond, 2003). Indeed, transpiration is generally negatively correlated with iron deficiency in plants (Larbi et al., 2006) and in cassava specifically positively correlated with plant growth (Silveira et al., 2012). It appears that GB03 exposure also delays leaf senescence which could be a result of higher iron and chlorophyll (Larbi et al., 2006) allowing leaves to remain green longer and/or GB03 suppression of the hormone abscisic acid in shoots (Zhang et al., 2008), which can also delay senescence (Alonso et al., 1999).

While measurements of leaf iron levels greatly reduce the possibility of exogenous soil iron contamination of tissue samples, future studies will directly analyze for nutrient accumulation in the edible root portion. Interestingly, in certain regions of South America and Africa where anemia is more common (FAO, 2013), cassava leaves are consumed as part of the local diet (Heinma et al., 1998). Since GB03 has been shown to promote both whole plant growth and increased iron accumulation in leaves, the application of GB03 to soil grown cassava is expected to promote improved nutrition without the complication and constraints of transgenic crops. In addition, since iron is redistributed from leaves to roots, shoot iron accumulation is expected as a precursor for iron increases in roots (Terry and Abadia, 1986). Perhaps most importantly, since cassava is grown in widely varying edaphic conditions for usually more than 300 days before harvesting, these preliminary results require validation with field-

grown plant for a full growing season.

### **Conflict of Interest Statement**

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

### **Acknowledgments**

Study supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), through a scholarship in the doctoral program in plant pathology at the Federal University of Lavras, Brazil and the Core Fullbright U.S. Scholar Program 2013-2014.

### **References**

Alonso, J. M., Hirayama, T., Roman, G., Nourizadeh, S. and Echer, J. R. (1999). EIN2, a bifunctional transducer of ethylene and stress responses in Arabidopsis. *Science* **284**: 2148-2152.

Beinert, H. (1978). Micro methods for the quantitative determination of iron and copper in biological material. *Methods Enzymol.* **54**: 435- 445.

Black, C. C. and Osmond, C. B. (2003). Crassulacean acid metabolism photosynthesis working the shift. *Photosynth. Res.* **76**: 329-341.

Blagbrough, I. S., Bayoumi, S. A., Rowan, M. G. and Beeching, J. R. (2010). Cassava: an appraisal of its phytochemistry and its biotechnological prospects. *Phytochem.* 71: 1940-1951.

Choi S. K. Jeong H., Kloepper J. W., Ryu C. M. (2014). Genome sequence of *Bacillus amyloliquefaciens* GB03, an active ingredient of the first commercial biological control product. *Genome Announc* 2: e01092-14

Curie, C. and Briat, J. F. (2003). Iron transport and signaling in plants. *Ann. Rev. Plant Biol.* 54: 183-206.

Farag, M. A., Ryu, C. M., Sumner, L. W. and Pare, P. W. (2006). GC-MS SPME profiling of rhizobacterial volatiles reveals prospective inducers of growth promotion and induced systemic resistance in plants. *Phytochem.* 67: 2262–2268.

Fernández, V., Eichert, T., Del-Río, V., López-Casado, G., Heredia-Guerrero, J. A., Abadía, A. and Abadía, J. (2008). Leaf structural changes associated with iron deficiency chlorosis in field-grown pear and peach: physiological implications. *Plant Soil* 311: 161-172.

Ferreira, D. F. (2011). Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia* 35: 1039-1042.

FAO: Food and Agriculture Organization. (2013). Save and Grow Cassava: a guide to sustainable production intensification. Rome: FAO. Available at: [http://www.fao.org/ag/save-and-grow/cassava/index\\_en.html](http://www.fao.org/ag/save-and-grow/cassava/index_en.html), access in: May 24<sup>th</sup> 2015.

Gonzalez, C., Johnson, N. and Qaim, M. (2009). Consumer Acceptance of Second-Generation GM Foods: The Case of Biofortified Cassava in the North-east of Brazil. *J. Agri. Econ.* **60**: 604-624.

Heinma, R. B., Costa, N., Cruz, M. Band Piroz, M. R. (1998). Valor nutricional de farinha de trigo combinada com concentrado proteico de folha de mandioca. *Revista de Nutrição, Campinas* 51-57.

Larbi, A., Abadía, A., Abadía, J., Morales, F. (2006). Down co-regulation of light absorption, photochemistry, and carboxylation in Fe-deficient plants growing in different environments. *Photosynth. Res.* **89**: 113–126.

Lambert, J., Lampen, P., von-Bohlen, A. and Hergenroder, R. (2006). Two- and three-dimensional mapping of the iron distribution in the apoplastic fluid of plant leaf tissue by means of magnetic resonance imaging. *Anal. Bioanal. Chem.* **384**: 231-236.

Leyva-Guerrero, E., Narayanan, N. N., Ihemere, U. and Sayre, R. T. (2012). Iron and protein biofortification of cassava: lessons learned. *Curr. Opin. Biotech.* **23**: 257-264.

Lobreaux, S. and Briat, J. F. (1991). Ferritin accumulation and degradation in different organs of pea (*Pisum sativum*) during development. *J. Biochem.* **274**: 601-606.

Lugtenberg, B. and Kamilova, F. (2009). Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Ann. Rev. of Microbio.* **63**: 541-556.

Meenakshi, J. V., Johnson, N. L., Manyong, V. M., DeGroot, H., Javelosa, J., Yanggen, D. R. and Meng, E. (2010). How cost-effective is biofortification in combating micronutrient malnutrition? *World Development* **38**: 64-75.

Montagnac, J. A., Davis, C. R. and Tanumihardjo, S. A. (2009). Nutritional value of cassava for use as a staple food and recent advances for improvement. *Comprehensive Rev. in Food Sci. Food Safety* **8**: 181-194.

Neilands, J. B. and Leong, S.A. (1986). Siderophores in relation to plant growth and disease. *Annual review of phytopathology* **24**: 187-208

Ntawuruhunga, P. and Dixon, A.G.O. (2010) Quantitative variation and interrelationship between factors influencing cassava yield. *Journal of Applied Biosciences* **26**: 1594 - 1602

Paré, P. W., Farag, M. A., Krishnamachari, V., Zhang, H., Ryu, C. M. and Kloepper, J. W. (2005). Elicitors and priming agents initiate plant defense responses. *Photosynth. Res.* **85**: 149- 159.

Ryu, C. M., Farag, M. A., HU, C. H., Reddy, M. S., Wei, H. X., Pare, P. W. and Kloepper, J. W. (2003). Bacterial volatiles promote growth in Arabidopsis. *PNAS* **100**: 4927-4932.

Sayre, R., Beeching, J. R., Cahoon, E. B., Egesi, C., Fauquet, C., Fellman, J., Fregene, M., Gruissem, W., Mallowa, S. and Manary, M. et al., (2011) The BioCassava plus program: biofortification of cassava for sub-Saharan Africa. *Ann. Rev. Plant. Biol.* **62**: 251-272.

Silveira, H. M., Silva, D. V., Carvalho, F. P., Neto, M. D. C., Silva, A. A. and Sedyama, T. (2012). Características fotossintéticas de cultivares de mandioca tratadas com fluazifop-p-butyl e fomesafen. *Revista Agroambiente* **6**: 222-227

Terry, N. and Abadia, J. (1986). Function of iron in chloroplasts. *J Plant Nutri.* **9**: 609-646

Zhang, H., Kim, M. S. and Krishnamachari, V. (2007). Rhizobacterial volatile emissions regulate auxin homeostasis and cell expansion in Arabidopsis. *Planta* **226**: 839-851.

Zhang, H., Sun, Y., Xie, X., Kim, M., Dowd, S. E. and Pare, P. W. (2009). A soil bacterium regulates plant acquisition of iron via deficiency inducible mechanisms. *Plant J.* **58**: 568–577.

Zhang, H., Xie, X., Kim, M. S., Kornyejev, D. A., Holaday, S., Pare, P. W. (2008). Soil bacteria augment Arabidopsis photosynthesis by decreasing glucose sensing and abscisic acid levels in planta. *Plant J.* **56**: 264–273.

FIGURE 1

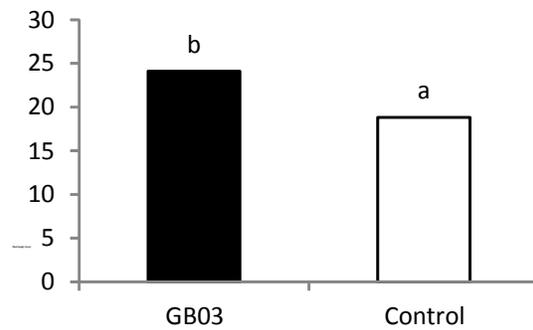
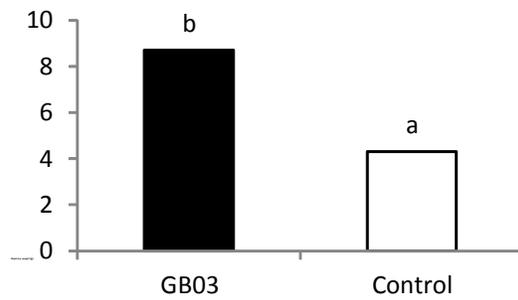
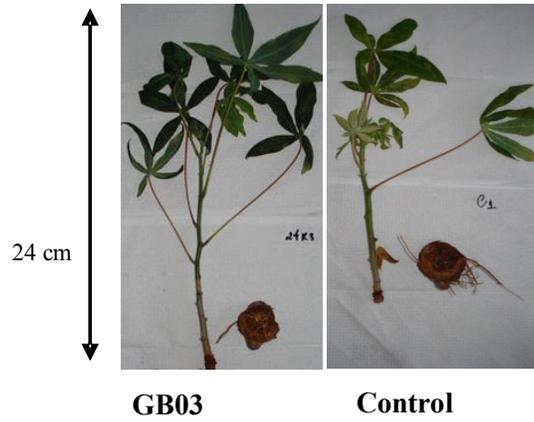
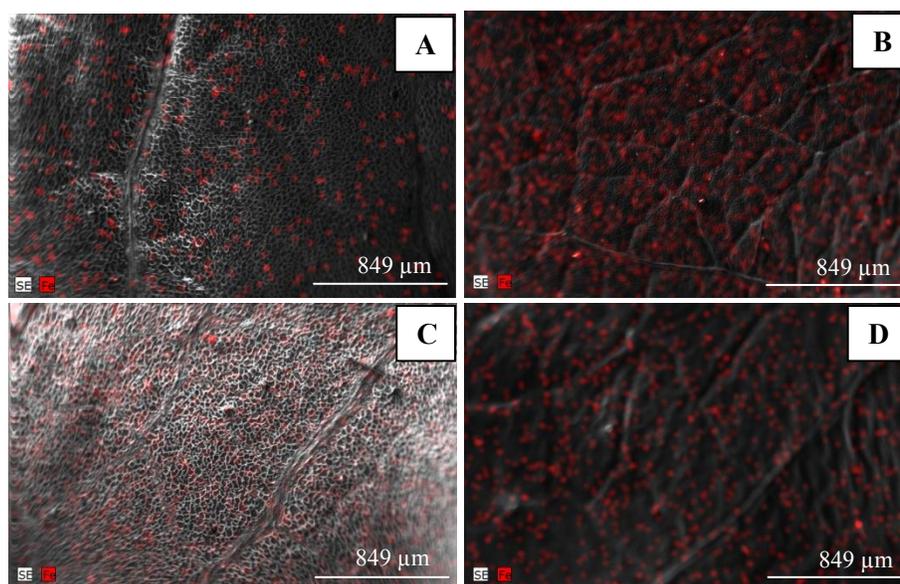


Figure 1 Growth promotion of cassava (*Manihot esculenta*) cv. IAC 576-70 mediated by *B. subtilis* GBO3 compared to the water control. Mean (n=3) shoot dry weight and plant height at 150 days after planting

FIGURE 2



I

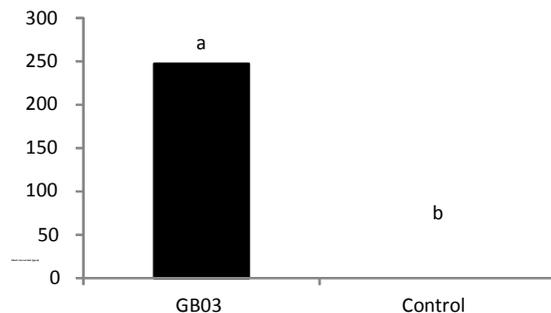
	Abaxial leaf side			Adaxial leaf side		
	K (%*)**	Ca (%)	Fe (%)	K *(%**)	Ca (%)	Fe (%)
Control	2.35 b	1.12 a	0.15 a	1.04 a	0.52 a	0.06 b
GBO3	2.75 a	1.39 a	0.19 a	1.18 a	0.59 a	0.47 a
CV (%)	5.98	33.91	89.19	9.96	18.10	25.63

\*Means followed by the same letter in the columns are similar at 5% according to Tukey's test.; \*\*% of the nutrient compared to the total nutrient composition in the leaf sample. K (Potassium), Ca (Calcium) and Fe (Iron).

II

Figure 2 Scanning electromicrography X-ray analysis of ( I ) the abaxial (A and C) and adaxial (B e D) leaf sides of cassava (*Manihot esculenta*) bacterized with *B. subtilis* GBO3 (A e B) or water (C e D). Red colored dots represent the presence and abundance of iron in the leaves; ( II ) Contents of iron (Fe), potassium (K) and calcium (Ca) in the adaxial and abaxial side of cassava (*Manihot esculentum*) determined by the Espirit 1.9 software from the X-ray generated images.

FIGURE 3



Treatments	Photosynthesis $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	Transpiration $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
<i>B. subtilis</i> GB03	8.94 a	1.03 a
Control	6.33 b	0.72 b

III  
Means followed by the same letter in the columns are similar at 5% according to Tukey's test.

Figure 3 *Bacillus subtilis* GB03-mediated iron accumulation and changes in photosynthesis and transpiration compared to the water-control. ( I ) Cassava plants (*Manihot esculanta*) used ( II ) mean (n= 4) chemical analysis of iron content in cassava shoot and ( III ) net photosynthesis (A) and transpiration (E) measured at the fifth true leaf, for GB03 (A) or water (B) treated cassava after 150 days of planting

(VERSÃO PRELIMINAR)

**ARTIGO 2 *Bacillus subtilis* (GBO3) e bactérias endofíticas autóctones são agentes de controle de *Fusarium solani* na cultura da mandioca<sup>1</sup>**

M. A. Freitas<sup>2</sup>

F. H. V. Medeiros<sup>3\*</sup>

I. S. Melo<sup>4</sup>

P. W. Pare<sup>5</sup>

S. P. Carvalho<sup>6</sup>

P. F. Pereira<sup>7</sup>

**Artigo formatado de acordo com a NBR 6022 (ABNT, 2003).**

---

<sup>1</sup> Parte da Tese da primeira autora.

<sup>2</sup> Aluna de pós - graduação da Universidade Federal de Lavras, Brasil.

<sup>3</sup> Professor, Universidade Federal de Lavras, Brasil.

<sup>4</sup> Pesquisador Embrapa Meio Ambiente. Professor, Universidade Federal de São Paulo.

<sup>5</sup> Professor, Texas Tech University, USA.

<sup>6</sup> Professor, Universidade Federal de Lavras, Brasil. <sup>7</sup> Aluna de pós - graduação da Universidade Federal de Lavras, Brasil.

\*Autor por correspondência: Universidade Federal de Lavras, Departamento de Fitopatologia, Lavras, MG, Brasil. CEP 37200000, e-mail: flaviomedeiros@dfp.ufla.br

## RESUMO

A pesquisa teve por objetivo avaliar o potencial dos isolados bacterianos *Bacillus subtilis* (GBO3) e endofíticos autóctones no biocontrole de *Fusarium solani* na cultura da mandioca. Para isso, manivas foram bacterizadas, por imersão em suspensão bacteriana, em seguida plantadas em solo infestado com *F. solani*. Essas foram mantidas em casa de vegetação por 140 dias e decorrido esse período as plantas foram avaliadas quanto à altura, biomassa seca, fotossíntese e incidência da doença. O efeito fungicida e fungistático dos isolados sobre *F. solani* foram determinados *in vitro* por testes de antibiose, colonização de gemas e hastes destacadas e inibição do crescimento fúngico por compostos orgânicos voláteis produzidos pelos isolados bacterianos. A colonização das hastes e gemas foram avaliadas por microscopia eletrônica de varredura. Os resultados demonstraram que os isolados GBO3 (*B. subtilis*), MAIIF2a (*Microbacterium imperiale*) e AMRCA31 (*Rhizobium radiobacter*) foram eficientes no controle de *F. solani*. GBO3 e MAIIF2a proporcionaram aumento na biomassa, e todos os tratamentos apresentaram aumento significativo na altura das plantas em relação as plantas testemunhas, com efeito fungicida e fungistático nos ensaios *in vitro*, proporcionando inibição do crescimento fungico em gemas e reduzido crescimento micelial em hastes de mandioca.

Palavras-chave: *Manihot esculenta* Crantz. Podridão radicular. Compostos orgânicos voláteis. Antibiose.

## 1 INTRODUÇÃO

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma cultura de elevada importância socioeconômica, fonte de carboidrato e de subsistência para populações carentes em todo o mundo, incluindo o Brasil (FARIAS, 2006). No entanto, anualmente ocorrem perdas de qualidade e produtividade em virtude da ocorrência de pragas e doenças no campo, dentre as principais doenças, a podridão radicular causada por *F. solani*, doença de importância não somente pela abrangência geográfica, mas principalmente pelas severas perdas na produção. O fungo provoca podridão nos órgãos de reserva e, conseqüentemente, a planta murcha e morre (FUKUDA; OTSUBO, 2003).

O controle da doença é baseado no uso de cultivares tolerantes associadas a práticas culturais, manejo físico e químico do solo. Contudo, resultados de pesquisas indicam a necessidade da implementação dos métodos de controle, dentre os quais, o uso de microrganismos antagônicos (CASTILHO; FUKUDA; TUPINAMBÁ, 1990; FARIAS, 2006; FUKUDA, 1991; 1993). Rizobactérias e bactérias endofíticas têm apresentado resultados promissores no antagonismo a patógenos do solo, tais como *Fusarium* e *Rizoctonia* (MELO, 1998; ROBBS, 1991; ROMEIRO, 2005).

Não há relatos sobre um agente biológico capaz de controlar a podridão radicular causada por *F. solani*. No entanto, obter um organismo antagônico eficiente ao desenvolvimento de *F. solani* nos tecidos da mandioca é um caminho viável. Segundo Melo, Faria e Teixeira (2005), bactérias endofíticas existem em grande diversidade na cultura da mandioca. Em trabalhos realizados pela Embrapa Meio Ambiente, foram identificadas 48 espécies bacterianas pertencentes a 27 gêneros, em plantios comerciais no estado de São Paulo e em etnovarietades coletadas em aldeias indígenas e pequenos agricultores, nos estados do Amazonas e Bahia, sendo as mais frequentemente do gênero

*Bacillus*. Essas bactérias, em estreita interação com os tecidos da mandioca, podem vir a ser um agente biológico no controle de *F. solani*.

Os benéficos de *B. subtilis* já foram disponibilizados para produtores de várias espécies agrícolas, (KLOEPPER; SCHOTH, 1981), em 1997, 95% de sementes de algodão plantadas no Texas foram tratadas com *B. subtilis* GB03 registrado como Kodiak para promoção de crescimento (aumento de massa) e supressão dos patógenos de raiz *Rhizoctonia* e *Fusarium* spp. Embora o sucesso inicial de GB03 tenha sido observado para o algodão, uma ampla gama de culturas apresentaram respostas positivas com a bacterização (BRANNEN; KENNEY, 1997), incluindo a cultura da mandioca, recentemente, como promotor do bioacúmulo de ferro e promoção de crescimento (FREITAS et al., 2015).

Nesse sentido, objetivou-se no trabalho avaliar o potencial antagônico de isolados bacterianos autóctones e de *B. subtilis* no biocontrole da podridão radicular na cultura da mandioca causada por *F. solani*.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

O isolado bacteriano *B. subtilis* (GBO3) foi cedido pelo professor Paul W. Paré, da Texas Tech University (Lubbock, TX, USA) e os isolados endofíticos pelo professor Itamar Soares de Melo, da Embrapa Meio Ambiente de Jaguariúna- SP. Isolados que foram coletados de variedades comerciais de mandioca no estado de São Paulo e em etnov variedades mantidas por pequenos agricultores e tribos indígenas nos estados do Amazonas e Bahia (MELO; FARIA; TEIXEIRA, 2005). Foram trabalhados 113 isolados, desses 24 foram selecionados de acordo com o nível de biossegurança. A cultivar de mandioca utilizada foi a “IAC 576-70”, desenvolvida pelo Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), por métodos de melhoramento genético (LORENZI, 2003).

O inóculo de *F. solani* foi obtido por uma cultura pura pertencente ao Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal do Pampa- RS e, para confirmar a patogenicidade, foi realizado teste conforme Serra et al. (2009), onde raízes de mandioca foram desinfestadas com hipoclorito de sódio a 3%, lavadas com água destilada e esterilizada (ADE), em seguida parcialmente secas em papel toalha. A inoculação foi realizada por intermédio de ferimentos nas raízes, onde foram adicionados dois discos (5 mm) de meio batata-dextrose agar (BDA) contendo micélio do patógeno. As raízes inoculadas foram incubadas em câmara úmida e, após 72 horas, as raízes foram avaliadas por inspeções visuais, buscando observar a ocorrência de infecção, para se confirmar a patogenicidade do organismo.

O bioensaio, para avaliar o potencial controlador dos isolados bacterianos contra *F. solani*, foi conduzido em casa de vegetação, em duas etapas (duas repetições no tempo). Para tanto, os antagonistas foram cultivados em meio de cultura líquido MCF (13,8 g de extrato de levedura, 2,5 g de  $K_2HPO_4$ , 1,0 g de  $KH_2PO_4$  anidro, 2,5 g de NaCl, 6,5 g de sacarose, 0,1 g de

sulfato de manganês e de 0,25 g de sulfato de magnésio) e MB1 (KADO; HESKETT, 1970) até a fase exponencial de crescimento, quando as suspensões de células bacterianas foram ajustadas em espectrofotômetro com OD<sub>570</sub> nm para absorvância 0,7.

Para esse estudo, duas horas antes do plantio, o solo foi infestado com 10<sup>7</sup> conídios de *F. solani* por ml de água. A seguir, as manivas, contendo apenas uma gema, foram plantadas em vasos com capacidade de 10 litros, contendo substrato composto de solo e areia lavada 8: 2, latossolo vermelho distrófico típico da região de Lavras- MG. A análise química do solo apresentou (mg dm<sup>-3</sup>): Potássio = 16; fósforo = 2,3; cálcio = 2,4; zinco = 0,84; ferro = 32,06; manganês = 23,67; cobre = 1,88; boro = 0,19, enxofre = 23,11, matéria orgânica = 1,18 e pH 6,3.

Os isolados bacterianos foram utilizados individualmente como tratamentos. Como testemunha, foi utilizado o meio de cultura MCF, meio de crescimento dos isolados bacterianos. No processo de bacterização, as manivas (contendo apenas uma gema) foram imersas em suspensão bacteriana por 30 minutos, seguido pela retirada do excesso do tratamento e descanso de 12 horas. As plantas foram dispostas em delineamento experimental inteiramente casualizado, com 4 repetições, três plantas por vaso. Decorridos 150 dias da infestação do solo com o fungo, foram determinados comprimento e biomassa seca da parte aérea e da raiz e avaliações visuais quanto à presença de sinais e sintomas de *F. solani*. Na segunda etapa, o experimento foi repetido sob mesmas condições, após 5 meses do estabelecimento do primeiro, apenas com os isolados mais promissores.

A determinação da taxa fotossintética ( $A - \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) se deu, durante a condução do experimento, decorridos 140 dias do plantio no terço médio da planta, na primeira folha completamente expandida. Para esta avaliação, foi

utilizado um analisador de gases no infravermelho (IRGA), modelo LCA PRO (Analytical Development), como descrito por Silveira et al. (2012).

O teste de antibiose foi realizado em placas de petri, contendo meio de cultura mandioca ágar (200 g de mandioca, 20g de dextrose, 17g de ágar e 1000 mL de água destilada) em que foi adicionado em uma das extremidades um disco de 5 mm de meio de cultura BDA contendo micélio fúngico de *F. solani*. Após 48 horas, na extremidade oposta, foram repicados os isolados bacterianos. As placas foram incubadas em B.O.D a 26 °C e avaliadas por 36 horas. Para cada um dos isolados foram utilizadas seis repetições.

Para averiguar o efeito fungicida e fungistático dos isolados bacterianos contra *F. solani*, foram realizados testes de biocontrole em hastes e gemas de mandioca destacadas de manivas e plântulas jovens. No antagonismo em gemas destacadas foram utilizados vidros com volume de 20 ml contendo 5 ml de ágar água. As gemas foram retiradas das manivas (previamente desinfestadas em hipoclorito 3%) com auxílio de lâminas esterilizadas. Em seguida elas foram postas sobre alíquota de 20 µl de suspensão bacteriana. E, depois de meia hora, foram repicados micélio de *F. solani* para cada um dos frascos. Cada tratamento contou com 6 repetições. Como controle as gemas foram postas sobre mesma alíquota de água estéril. As avaliações foram realizadas, diariamente, por um período de 5 dias em temperatura ambiente.

Para os isolados mais promissores dos ensaios anteriores, foi realizado o bioensaio *in vitro* do antagonismo em hastes de mandioca. Para tanto, foram feitos cortes transversais, em hastes de mandioca com 15 dias de idade, quando elas apresentavam 2 mm de diâmetro e cada segmento de caule 3 mm. As hastes foram previamente desinfestadas em hipoclorito 2% e imersas por 30 minutos em suspensão de células dos isolados GBO3, AMIIF2a, AMRCA31 e MGTSRA05 (ajustadas em espectrofotômetro OD<sub>570</sub> nm, para absorvância 0,7). Na sequência, as hastes foram transferidas para placa de petri, contendo ágar

água (9 g de agar e 1 litro de água) e sobre elas adicionados, em cada uma das hastes, 20 µl de suspensão de conídios de *F. solani*. As placas foram incubadas por 16 horas a 26 °C.

Para avaliar a interação entre os isolados bacterianos e *F. solani* em hastes de mandioca, as amostras foram preparadas para microscopia eletrônica de varredura, adicionando-se em cada uma delas solução Karnovisk por 24 horas. Em seguida, cacodilato 0,05 M, durante 10 minutos (três vezes), com lavagens sucessivas em água destilada entre as repetições, na sequência 5 gotas de tetróxido de ósmio por uma hora, desidratação em série de acetona (25, 50, 75 e 90% por 10 minutos cada) e desidratação em acetona a 100% por 10 minutos (três vezes). As amostras foram levadas ao ponto crítico em que foi removida toda a acetona, em seguida banho de ouro para visualização em microscopia eletrônica de varredura. Foram 6 repetições por tratamento, com a avaliação de 10 pontos por repetição em MEV.

A capacidade de produção de voláteis pelos isolados endofíticos, assim como os seus efeitos sobre *F. solani*, foram determinados, empregando a técnica da placa bipartida com o plaqueamento do organismo em seus respectivos meios de cultura. No primeiro compartimento, foi adicionado o meio de cultura MB1 para o crescimento dos isolados bacterianos. No compartimento contrário foi repicado *F. solani* no meio de cultura BDA. Como controle, foram utilizados os meios de cultura sem a repicagem bacteriana ou fúngica. As placas foram seladas hermeticamente e incubadas a 25- 28 °C durante 7 dias. O crescimento do fungo foi avaliado a cada 24 horas, e o experimento contou com 5 repetições.

Seguindo a mesma metodologia, todos os ensaios biológicos realizados foram repetidos e avaliados para confirmação dos resultados obtidos. Todos os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), analisados por meio do programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2011) sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O isolado bacteriano *B. subtilis* (GBO3) foi capaz de proporcionar controle de *F. solani* em condições de casa de vegetação (Figura 1). As plantas mantiveram - se saudáveis, ao contrário das plantas testemunhas que desenvolveram os sintomas da infecção por *F. solani*. Foi observado que plantas bacterizadas com GBO3 apresentaram acréscimo significativo ( $p > 0,05$ ) para altura das plantas (170%) e biomassa seca (134 %) (Tabela 1) em relação à testemunha.

O acréscimo na altura das plantas e biomassa seca, observado em plantas tratadas com *B. subtilis*, coincide com o fato que rizobactérias como as promotoras de crescimento (PGPR) são conhecidas por proporcionarem crescimento e/ou o biocontrole de diversos fitopatógenos, dentre os quais, fungos do solo (ROMEIRO, 2005). Segundo Freitas (2003), os principais mecanismos ativados pelas bactérias consistem na disponibilidade de nutrientes à planta, produção de substâncias promotoras de crescimento, biocontrole de fitopatógenos e indução de resistência. Este último caracterizado por induzir a planta a produzir metabólitos deletérios a patógenos (FREITAS, 2003; GLICK, 1995; VAN PEER; NIEMANN; SCHIPPER, 1991; WEI; KLOEPPER; TUZUN, 1991).

Coincidindo com autores que mencionaram que *B. subtilis*, além de proporcionarem a fortificação de plantas através do bioacúmulo de ferro foliar em mandioca (FREITAS et al., 2015), também, foram eficientes no controle dos fitopatógenos de solo *Rhizoctonia* e *Fusarium* spp na cultura da algodão (BRANNEN; KENNEY, 1997). Plantas tratadas com *B. subtilis*, também, apresentaram retardo da senescência das folhas, ao contrário das plantas de mandioca não inoculadas que apresentaram envelhecimento e sintomas de deficiência nutricional (FREITAS et al., 2015).

Compostos orgânicos voláteis produzidos por *B. subtilis*, ainda, estariam envolvidos na regulação hormonal, conferindo a auxina, citocinina e ao ácido abscísico função de mediadores da promoção de crescimento (RYU et al., 2003). Estudos mostraram que a transcrição ativada por *B. subtilis* GB03 reduz a produção vegetal do ácido abscísico (ZHANG et al., 2008). Redução dos níveis de ácido abscísico resulta em retardo da senescência de plantas (ALONSO et al., 1999).

Dos 24 isolados bacterianos endofíticos utilizados no experimento (MB4CR1a, MB4CR5b-A, MB4CR3b, MB21AM1a, MB31AM1a, IIR TSA21, IIRAC10, IIRAC11, AMRTSA18, AMRAC31, AMRTSA03, AMCTSA04, AMCTSA28, AMRAC32, AMCAC29, MGRTSA05, MB3DR3b, MAIVR2a, MAIR1b, MAIR1a, MAIR2b, MAIM1b, MAIIM4a e MAIF2a), garantiram a sanidade das plantas os isolados IIRCA11, AMRCA31, AMCAC29, MAIR1a, AMRTSA03, MAIF2a, MAIM1b e MB21AM1a. Dentre eles, AMRCA31, AMRTSA03, AMCAC29 e MAIF2a foram capazes de proporcionar biocontrole de *F. solani*, em condições de casa de vegetação, permanecendo as plantas saudáveis e com valores significativos quanto à altura das plantas em relação às plantas testemunha.

*In vitro* os isolados MB21AM1a, IIRCA10, AMRTSA 18, AMCAC29, AMRAC31 e AMRTSA03, MGRTSA05 apresentaram resultados positivos para antibiose. MAIF2a, AMRCA 31, MB21AM1a, IIRCA10, AMCAC29, MGRTSA05 proteção de gemas destacadas a colonização de *F. solani* e MAIF2a, IIRAC11, AMRAC31, AMCAC29, MGRTSA05, MAIR1b, MAIIM4a retardo do crescimento de colônias de *F. solani* quando expostas aos voláteis bacterianos. O isolado bacteriano MAIF2a proporcionou aumento da altura das plantas (242%) e biomassa seca (189%) em relação às testemunhas (Figura 1 D-I e Tabela 2), com resultados positivos para efeito fungicida *in vitro* (Figura 3).

Para as hastes tratadas com os isolados MAIF2a, MGTSRA05, AMRCA31 e GBO3 contra *F. solani*, foi verificado que, em todos os tratamentos ocorreu germinação dos conídios, com a presença de hifas colonizando os tecidos, no entanto, em menor densidade, quando comparada ao tratamento controle, atuando os isolados bacterianos como agentes de biocontrole (Figura 4 A-E). Dentre os quatro isolados avaliados, MAIF2a apresentou menor crescimento fúngico, quando em comparação com a testemunha, com a presença de conídios não germinados ao contrário dos demais tratamentos (Figuras 4 A e E). Por se tratar de um isolado endofítico autóctone, MAIF2a possui mecanismos de ação que podem ser potencializados em um ambiente favorável ao seu desenvolvimento (HALLMANN et al., 1997).

Segundo autores, tais resultados se devem a fato de que Bactérias endofíticas e organismos fitopatogênicos possuem habilidade de penetrar a planta e dela tornar seu habitat, colonizando de forma sistêmica ou localizada o hospedeiro, podendo habitar o apoplasto (QUANDT-HALLMANN; HALLMANN; KLOEPPER, 1997), vasos condutores (HALLMANN et al., 1997) e, ocasionalmente, espaços intracelulares (QUANDT-HALLMANN; KLOEPPER, 1996).

Uma vez a bactéria possuindo a habilidade acessar e colonizar o mesmo nicho ecológico do fitopatógeno, torna-a favorável como agente de biocontrole (HALLMANN et al., 1997). O biocontrole pode ocorrer devido atuação direta sobre o patógeno por antagonismo (ALTINDAG et al., 2006; KOZDROJ; TREVORS; TREVORS, 2004), por indução de resistência sistêmica (KAVINO et al., 2004; VISWANTHAN; SAMIYAPPAN, 2002) e/ ou por competição (MARI; GUIZZARDI; PRATELLA, 1996).

Conclui-se com os resultados que os isolados mais eficientes foram GBO3 (*Bacillus subtilis*), MAIF2a (*Microbacterium imperiale*) e AMRCA 31 (*Rhizobium radiobacter*), os tratamentos mantiveram as plantas saudias, livres de

sintomas de *F. solani*, aumentaram significativamente a altura das plantas em relação às testemunhas. GBO3 e MAIF2a apresentaram aumento significativo da biomassa das plantas e os três tratamentos foram capazes de proporcionar efeito fungicida nos ensaios *in vitro*, apresentando inibição do crescimento fúngico. Tais resultados tornam este grupo de microrganismos agentes de biocontrole para *F. solani* na cultura da mandioca.

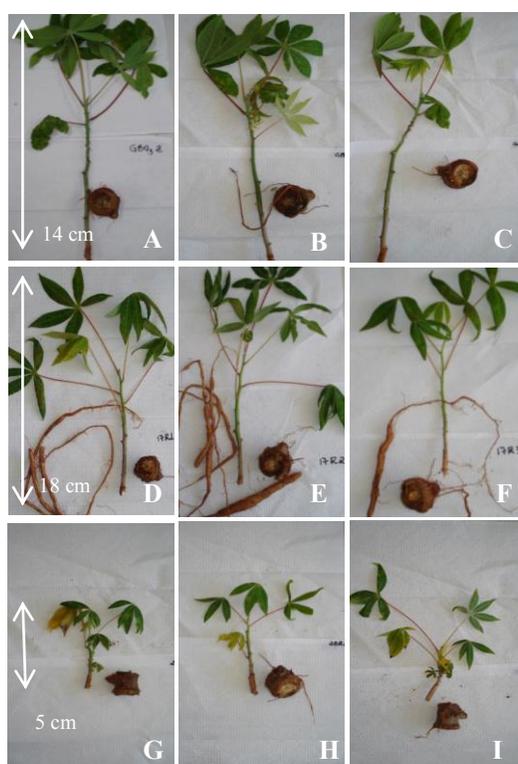


Figura 1 Biocontrole de *F. solani* por isolados bacterianos, (A-C) Plantas tratadas com GBO3, (D-F) plantas tratadas com MAIF2a, (G-I) plantas testemunha, apresentando subdesenvolvimento, morte apical, amarelecimento em decorrência da infecção de *F. solani*

Tabela 1 Variáveis biomassa seca e fotossíntese em plantas de mandioca tratadas com *B. subtilis*

Tratamento	Biomassa Seca (g)	Altura (cm)
<b>Controle</b>	2,44 b	5,37
<b>GBO3</b> <i>Bacillus subtilis</i>	5,72 a	14,5 a
<b>CV(%)</b>	12,88	9,09
<b>p-valor</b>	0,0005	0,0001

\*As médias seguidas por mesma letra nas colunas não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F

Tabela 2 Variáveis, biomassa seca, fotossíntese em plantas de mandioca tratadas com isolados endofíticos autóctones

Tratamentos	Biomassa seca (g)	Altura (cm)
<b>IIRCA11</b> - <i>Bacillus megaterium</i>	1,4 b	4,2 c
<b>AMRCA31</b> - <i>Rhizobium radiobacter</i>	5,3 b	15,7 b
<b>AMCAC29</b> - <i>Bacillus subtilis</i>	4,2 b	13,2 b
<b>MAIR1a</b> - <i>Bacillus cereus</i>	3,3 b	13,1 b
<b>AMRTSA03</b> - <i>Bacillus pumilus</i>	3,9 b	12,3 b
<b>MAIIF2a</b> - <i>Microbacterium imperiale</i>	5,9 a	18,3 a
<b>MAIM1b</b> - <i>Brachybacterium paraconglomeratum</i>	2,3 b	10,2 b
<b>MB21AM1a</b> - <i>Bacillus atrophaeus</i>	2,9 b	11,8 b
<b>Controle</b>	2,1 b	5,4 c
<b>p-valor</b>	0,0004	0,0001
<b>CV(%)</b>	4,53	34,26

\*As médias seguidas por mesma letra nas colunas não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F

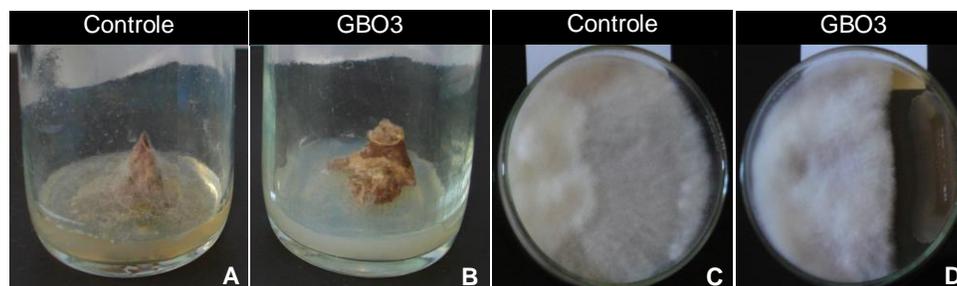


Figura 2 Controle de *F. solani* por *B. subtilis* GBO3 em gemas de mandioca destacadas (A-B) e antibiose in vitro (C-D). (A) Gemas não tratadas com GBO3, apresentando colonização fúngica de *F. solani*. (B) Gemas tratadas com GBO3, ausência de colonização fúngica de *F. solani*. (C) Crescimento fúngico de *F. solani* na ausência de GBO3. (D) GBO3 inibindo o crescimento fúngico de *F. solani*

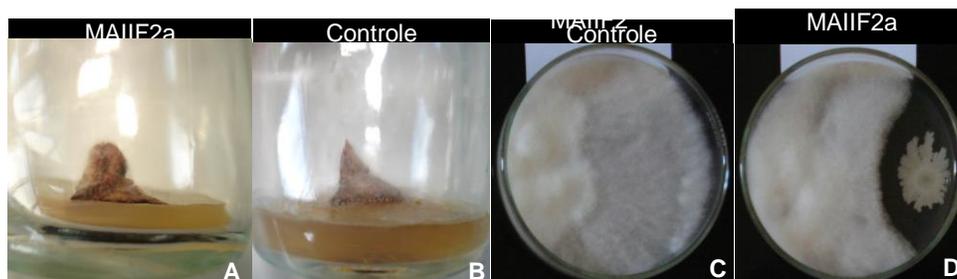


Figura 3 Controle de *F. solani* por MAIIF2a em gemas de mandioca destacadas (A-B), e antibiose in vitro (C-D). A) Gemas não tratadas com MAIIF2a, apresentando colonização fúngica por *F. solani*. B) Gemas tratadas com MAIIF2a, ausência de colonização fúngica de *F. solani*. C) Crescimento fúngico de *F. solani* na ausência de MAIIF2a. D) MAIIF2a inibindo o crescimento fúngico de *F. solani*

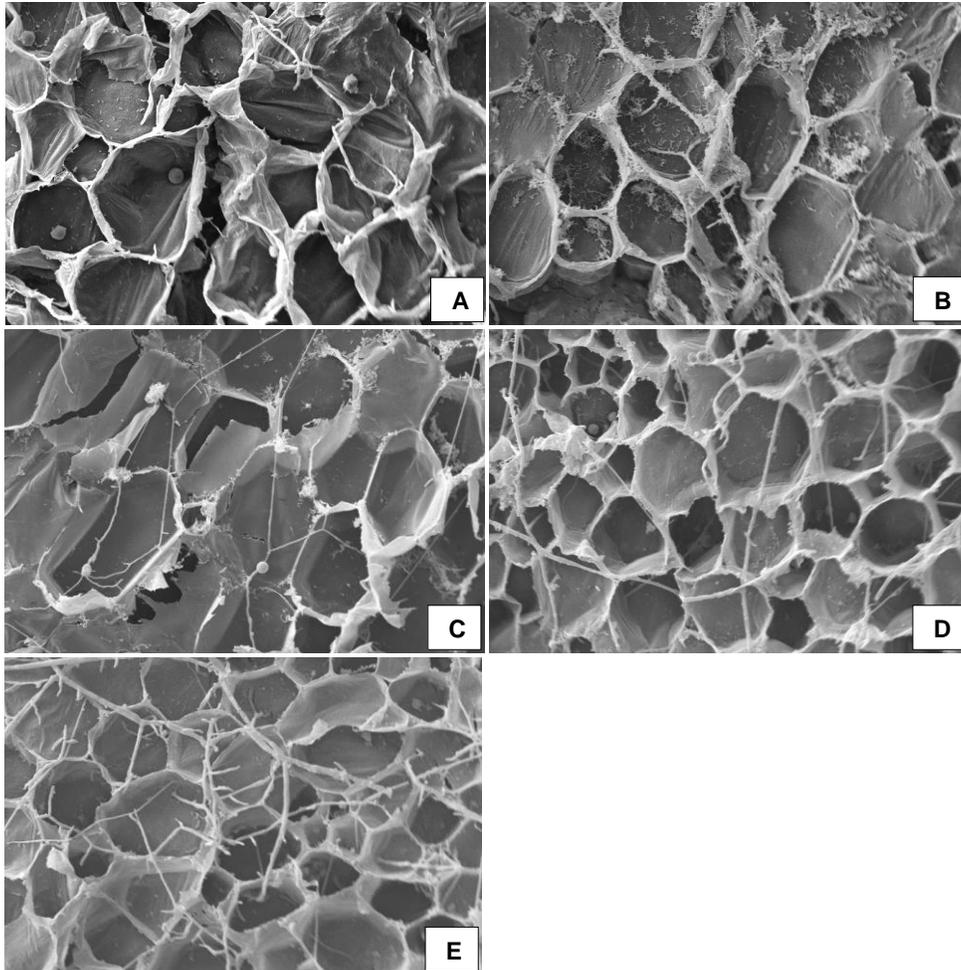


Figura 4 Antagonismos *in vitro*, (A) MAIF2a, (B) MGTSRA05, (C) AMRCA31, (D) GBO3 e (E) Testemunha

## ABSTRACT

This research had the objective of evaluating the potential of *Bacillus subtilis* (GBO3), endophytic and autochthone bacterial isolates in the biocontrol of *Fusarium solani* over the cassava culture. For this, stem cuttings were bacterialized by immersion in bacterial suspension and, subsequently planted in soil infested with *F. solani*. These were maintained in greenhouse for 140 days and, passed this period, the plants were evaluated regarding height, dry biomass, photosynthesis and incidence to the disease. The fungicide and fungistatic effects of the *F. solani* isolates were determined *in vitro* by means of antibiosis tests, gem colonization and detached stems and inhibition of fungal growth by volatile organic compounds produced by the bacterial isolates. The colonization of the stems and gems were evaluated by means of scan electron microscopy. The results showed that the GBO3 isolates (*B. subtilis*), MAIIF2a (*Microbacterium imperiale*) and AMRCA31 (*Rhizobium radiobacter*) were efficient in controlling *F. solani*. GBO3 and MAIIF2a provided increase in biomass, and all treatments presented significant increase in plant height in relation to the control plants, with fungicide and fungistatic effects in the *in vitro* trials, inhibiting fungal growth in gems and reducing mycelial growth in cassava stems.

Keywords: *Manihot esculenta* Crantz. Root rot. Volatile organic compounds. Antibiosis.

## REFERÊNCIAS

- ALONSO, J. M. et al. Bifunctional transducer of ethylene and stress responses in Arabidopsis. **Science**, London, v. 5423, n. 284, p. 2148-2152, 1999.
- ALTINDAG, M. et al. Biological control brown rot (*Moniliana laxa* Ehr.) on apricot (*Prunus armeniaca* L. cv. Hacihaliloglu) by *Bacillus*, *Burkholderia* and *Pseudomonas* application under *in vitro* and *in vivo* condition. **Biological Control**, Orlando, v. 38, n. 3, p. 369-372, 2006.
- BRANNEN, P. M.; KENNEY, D. S. Kodiak registered: a successful biological control product for suppression of soilborne pathogens of cotton. **Journal of Industrial and Microbial Biotechnology**, Heidelberg, v. 19, n. 3, p. 169-171, Sept. 1997.
- CASTILHO, E.; FUKUDA, C.; TUPINAMBÁ, E. A. Podridão radicular da mandioca no Estado de Sergipe. I. Isolamento e patogenicidade. **Revista Brasileira de Mandioca**, Cruz das Almas, v. 9, n. 1-2, p. 91-95, June 1990.
- FARIAS, A. B. N. **Aspectos sócio econômicos e agrônômicos da mandioca**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006. 817 p.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia** Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, nov./dez. 2011.
- FREITAS, L. G. Controle biológico dentro do contexto de manejo integrado de nematóides. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, p. 24-30, 2003.
- FREITAS, M. A. et al. Augmenting iron accumulation in cassava by the beneficial soil bacterium *Bacillus subtilis* (GBO3). **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 6, p. 596, Aug. 2015.

FUKUDA, C. Doenças da mandioca. In: CENTRO NACIONAL DE PESQUISA DE MANDIOCA E FRUTICULTURA TROPICAL. **Instruções práticas para cultivo da mandioca**. Cruz das Almas: Embrapa, 1993. p. 53-56.

FUKUDA, C. **Podridão das raízes da mandioca**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 1991. (Mandioca em Foco, 08).

FUKUDA, C.; OTSUBO, A. A. **Cultivo da mandioca na região centro sul do Brasil**. Dourados: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2003. Disponível em: <[http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mandioca/mandioca\\_centrosul/index.htm](http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mandioca/mandioca_centrosul/index.htm)>. Acesso em: 15 jun. 2013.

FUKUDA, C.; OTSUBO, A. A. **Cultivo da mandioca na região centro sul do Brasil**. Dourados: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004. 116 p.

GLICK, B. R. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 41, n. 2, p. 109-117, 1995.

HALLMANN, J. et al. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, n. 10, p. 895-914, 1997.

KADO, C. I.; HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 60, n. 6, p. 969- 979, June 1970.

KAVINO, M. et al. Rhizosphere and endophytic bacteria for induction of systemic resistance of banana plantlets against bunchy top virus. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 39, n. 5, p. 1775-1784, May 2004.

KLOEPPER, J. W.; SCHROTH, M. N. Relationship of in vitro antibiosis of plant growth-promoting Rhizobacteria to plant growth and the displacement of root microflora. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 71, n. 10, p. 1020-1024, 1981.

KOZDRÓJ, J.; TREVORS, J. T.; VAN ELSAS, J. D. Influences of introduced potencial biocontrol agentes on maize seedling growth and bacterial community structure in the rhizosphere. **Oil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 36, n. 11, p. 1775-1784, Nov. 2004.

LORENZI, J. O. **Mandioca**. Campinas: CATI, 2003. 116 p. (Boletim Técnico da CATI, 245).

MARI, M.; GUIZZARDI, M.; PRATELLA, G. C. Biological control of gray mold in pears by antagonistic bactéria. **Biological Control**, Orlando, v. 7, n. 1, p. 30-37, Aug. 1996.

MELO, I. S. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Controle Biológico**; volume 1. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 1998. p. 17-67.

MELO, I. S.; FARIA, R.; TEIXEIRA, M. A. Diversidade de bactérias endofíticas na cultura da mandioca. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, Jaguariúna, v. 33, p. 6-24, dez. 2005.

PEER, R. V.; SCHIPPERS, B. Plant growth responses to bacterization with selected *Pseudomonas* spp. strains and rhizosphere microbial development in hydroponic cultures. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 35, n. 4, p. 456-463, Apr. 1989.

QUANDT-HALLMANN, A.; HALLMANN, J.; KLOEPPER, J. W. Bacterial endophytes in cotton: location and interation with other plant-associated bacteria. **Journal of Microbiology**, Seul, v. 43, n. 3, p. 254-259, Mar. 1997.

QUANDT-HALLMANN, A.; KLOEPPER, J. W. Immunological detection and localization the cotton endophyte *Enterobacter asburiae* JM22 in diferente plant species. Canadia. **Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 42, n. 11, p. 1144-1154, 1996.

ROBBS, C. F. Bactérias como agentes de controle biológico de fitopatógenos. In: BETTIOL, W. **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: Embrapa, 1991. p. 121-133.

ROMEIRO, R. S. **Bactérias fitopatogênicas**. Viçosa: Editora da UFV, 2005. 417 p.

RYU, C. M. et al. Bacterial volatiles promote growth in Arabidopsis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 100, n. 8, p. 4927-4932, Apr. 2003.

SERRA, I. M. R. S. et al. *Scytalidium lignicola* em mandioca: ocorrência no Estado do Maranhão e reação de cultivares ao patógeno. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 35, n. 4, p. 327-328, out./dez. 2009.

SILVEIRA, H. M. et al. Características fotossintéticas de cultivares de mandioca tratadas com fluazifop-p-butyl e fomesafen. **Revista Agrombiente**, Boa Vista, v. 6, n. 3, p. 222-227, set./dez. 2012.

TYSON, G. W. et al. The role of bacterial motility in the survival and spread of *Pseudomonas fluorescens* in soil and the attachment and colonization of wheat roots. **FEMS Microbial Ecology**, Amsterdam, v. 36, n. 1, p. 21-31, June 2001.

VAN PEER, R.; NIEMANN, G. J.; SCHIPPER, B. Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of *Fusarium* wilt of carnation by *Pseudomonas* sp. Strain WC-417r. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 31, n. 7, p. 728-734, 1991.

VISWANATHAN, R.; SAMYAPPAN, R. Induced systemic resistance by fluorescent *Pseudomonas* against red rot disease of sugarcane caused by *Colletotrichum falcatum*. **Crop Protection**, Guildford, v. 21, n. 1, p. 1-10, Feb. 2002.

WEI, G.; KLOEPPER, J. W.; TUZUN, S. Induction of systemic resistance of *cucumber* to *Colletotrichum orbiculare* by select strains of plant growth-promoting rhizobacteria. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 81, n. 12, p. 1508-1512, 1991.

ZHANG, H. et al. Soil bacteria augment Arabidopsis photosynthesis by decreasing glucose sensing and abscisic acid levels in planta. **Plant Journal**, Oxford, v. 56, n. 2, p. 264-273, Oct. 2008.

**ARTIGO 3 *Bacillus subtilis* e bactérias endofíticas autóctones induzem o acúmulo de ferro na cultura da mandioca<sup>1</sup>**

M. A. Freitas<sup>2</sup>

F. H. V. Medeiros<sup>3\*</sup>

P. W. Pare<sup>4</sup>

S. P. Carvalho<sup>5</sup>

A. S. Freitas<sup>6</sup>

J. S. Aleixo<sup>7</sup>

**Artigo formatado de acordo com a NBR 6022 (ABNT, 2003).**

---

<sup>1</sup> Parte da Tese da primeira autora.

<sup>2</sup> Aluna de pós - graduação da Universidade Federal de Lavras, Brasil.

<sup>3</sup> Professor, Universidade Federal de Lavras, Brasil.

<sup>4</sup> Professor, Texas Tech University, USA.

<sup>5</sup> Professor, Universidade Federal de Lavras, Brasil.

<sup>6</sup> Aluno de pós - graduação da Universidade Federal de Lavras, Brasil.

<sup>7</sup> Aluno de pós - graduação da Universidade Federal de Lavras, Brasil. Autor por correspondência: Universidade Federal de Lavras, Departamento de Fitopatologia, Lavras, MG, Brasil. CEP 37200000, e-mail: flaviohvmedeiros@gmail.com.

## RESUMO

Bactérias podem promover o acúmulo de ferro em folhas de mandioca, mas ainda não foi comprovado seu potencial em raízes. Inicialmente sete cultivares (“Amarelo Vermelha”, “Amarelo Verde”, “IAC 576-70”, “Pinheirinho”, “Vassourinha cristais”, “Roxa Cristais” e “Sobradona”) foram avaliadas quanto a produtividade, dessas foram selecionadas após 12 meses, “IAC 576-70” e “Pinheirinho” para dar sequência ao experimento. Em casa de vegetação os isolados endofíticos e a rizobactéria GBO3 foram avaliadas quanto ao potencial indutor no acúmulo de ferro por plantas de mandioca. Para tanto, foram selecionados previamente em uma coleção de isolados endofíticos autóctones os isolados MGRTSA05 (*Bacillus subtilis*), MAIIF2a (*Microbacterium imperiale*) e a rizobactéria GBO3 (*Bacillus subtilis*), bactérias reconhecidamente benéficas no biocontrole de *Fusarium solani* e aumento da biomassa na cultura da mandioca. Elas foram então avaliadas quanto ao potencial indutor em vasos de Leonard contendo solução padrão de Hoagland e Arnon (50% e 100% do teor de ferro indicado para cultura da mandioca), a fim de se determinar o comportamento dos isolados em condições ideais e de deficiência em ferro. A partir da combinação dos resultados obtidos foram levados a campo as cultivares “IAC 576” e “Pinheirinho”, bacterizadas com os isolados endofíticos MGRTSA05, MAIIF2a e a rizobactéria GBO3, que apresentaram resultados significativos em relação a testemunha para bioacúmulo de ferro em plantas de mandioca em solução nutritiva. Em campo concluiu-se que os isolados MGRTSA05 e GBO3, ambas identificadas como *Bacillus subtilis* foram capazes de proporcionar bioacúmulo de ferro aumentando significativamente o teor de ferro presente nas raízes das plantas.

Palavras-chave: *Manihot esculenta* Crantz. Promoção de crescimento de planta.

## 1 INTRODUÇÃO

A cultura da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é fonte de carboidrato e subsistência, representando o produto grande importância socioeconômica para populações carentes em todo o mundo (FARIAS, 2006). No entanto, o valor nutricional da raiz é pobre, contém pouca proteína, vitaminas e nutrientes como o ferro. Por isso, cultivares melhoradas da mandioca poderiam reduzir efetivamente a subnutrição, que, segundo a Organização Mundial da Saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2008), é o distúrbio mais prevalente no mundo, sobretudo, nos países em desenvolvimento, onde é cultivada em pequenas áreas com baixo nível tecnológico (BORBA et al., 2012).

Segundo autores, *Bacillus subtilis* GB03 ativa os mecanismos de aquisição de ferro, aumentando a assimilação de íons metálicos em *Arabidopsis thaliana* (ZHANG et al., 2009). Estudos revelaram que GB03 regula a deficiência de Fe por um fator de transcrição FIT1, necessário para a indução da GB03 reductase e pelo transportador de ferro IRT1. Além disso, GB03 provoca a acidificação da rizosfera pelas raízes, facilitando, assim, a mobilidade do elemento ferro e bioacúmulo de ferro em folhas de mandioca sob condições controladas (FREITAS et al., 2015). No entanto, o acúmulo mediado por bactérias em raízes ou a eficiência em campo, ainda, não foi comprovada.

Além de *B. subtilis* GB03, há uma grande diversidade de bactérias endofíticas na cultura da mandioca, com potencial para promoção de benefícios à cultura. Segundo Melo, Faria e Teixeira (2005), foram identificadas 48 espécies bacterianas pertencentes a 27 gêneros, em plantios comerciais no estado de São Paulo e em etnovarietades coletadas em aldeias indígenas e pequenos agricultores nos estados do Amazonas e Bahia, sendo as mais frequentes do

gênero *Bacillus*, bactérias essas que podem vir a ser benéficas ao serem empregadas no manejo da cultura da mandioca.

Vários são os exemplos da aplicação de bactérias endofíticas no campo que proporcionaram aumento na produção agrícola. Efeito que pode ser explicado em decorrência da ação das bactérias: 1) Promovendo produção de fitohormônios (BARBIERI et al., 1986). 2) Maior disponibilidade de minerais (MURTY; LADHA, 1988). 3) Resistência a doenças (CHEN et al., 1995). 4) Assimilação biológica (WEBSTER et al., 1997). Nesse sentido, os objetivos da pesquisa foram estudar a assimilação induzida de ferro pela rizobactéria GBO3 e por bactérias endofíticas autóctones, da cultura da mandioca, de regiões diversas do Brasil.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 1. Seleção de cultivares de mandioca e obtenção dos isolados bacterianos

As sete cultivares utilizadas no ensaio (“Amarela vermelha”, “Amarela Verde”, “IAC 576-70”, “Pinheirinho”, “Vassourinha Cristais”, “Roxa Cristais” e “Sobradona”) foram disponibilizadas da coleção de clones de mandioca pelo professor Samuel Pereira de Carvalho do Departamento de Agricultura (Universidade Federal de Lavras). O isolado bacteriano *B. subtilis* (GBO3) foi cedido pelo professor pesquisador Paul W. Pará (Texas Tech University) e os isolados endofíticos pelo professor pesquisador Itamar Soares de Melo (Embrapa Meio Ambiente).

Os isolados endofíticos foram coletados de variedades comerciais de mandioca no estado de São Paulo e em etnovariedades, mantidas por pequenos agricultores e tribos indígenas nos estados do Amazonas e Bahia (MELO; FARIA; TEIXEIRA, 2005). Foram obtidos 113 isolados, desses 24 foram selecionados de acordo com o nível de biossegurança 1.

Os isolados bacterianos foram cultivados em meio de cultura líquido MCF (13,8 g de extrato de levedura, 2,5 g de  $K_2HPO_4$ , 1,0 g de  $KH_2PO_4$  anidro, 2,5 g de NaCl, 6,5 g de sacarose, 0,1 g de sulfato de manganês e de 0,25 g de sulfato de magnésio) até a fase exponencial de crescimento, quando, então, as suspensões de células bacterianas foram ajustadas, em espectrofotômetro  $OD_{570}$  nm, para absorvância 0,7.

Para escolha da melhor cultivar, quanto à produtividade, foram avaliadas em campo sete cultivares de mandioca. Ramas sadias de cada uma das cultivares foram seccionadas em três partes, sendo utilizadas para o plantio o terço médio (10 cm) contendo aproximadamente cinco gemas. O Delineamento foi Inteiramente Casualizado, com três parcelas por cultivar e cada parcela com três

plantas. As plantas foram avaliadas, após 12 meses, quanto à altura das plantas, comprimento e peso da raiz.

## 2.2 Bioacúmulo de ferro em ensaio em casa de vegetação

O potencial indutor do acúmulo de ferro em plantas de mandioca por isolados bacterianos foram avaliados em vasos de Leonard (VINCENT, 1970), que continham na parte inferior 600 ml de solução padrão nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) (com duas concentrações de ferro, 50 e 100% do teor recomendado para a cultura) e na parte superior uma mistura esterilizada 1: 2 de areia lavada (150 ml) e vermiculita expandida (300 ml).

As manivas, contendo apenas uma gema, foram plantadas previamente em vasos contendo areia lavada e autoclavada e mantidas por uma semana em câmara de crescimento a 28°C. Após esse período, as manivas, contendo plantas (altura aproximada de 10 cm), foram imersas em suspensão bacteriana por 30 minutos e, em seguida, transplantadas nos vasos de Leonard (VICENT, 1970).

A solução de Hoagland e Arnon era composta por 15 mL/L de N, 1 mL/L de P, 6 mL/L de K, 5 mL/ L de Ca, 2 ml/L de Mg, 2 mL/L de S e Fe nas concentrações de 50 e 100% dos valores recomendados para cultura da mandioca, 0,5 e 1 mL/L, respectivamente (50% representando condição de deficiência em Ferro para a cultura). Os isolados bacterianos utilizados foram MGRTSA05 (*B. subtilis*), MAIIF2a (*Microbacterium imperiale*) e a rizobactéria GBO3 (*B. subtilis*), selecionados por apresentarem melhores resultados para indução do acúmulo de ferro foliar e/ou acréscimo no desenvolvimento de plantas de mandioca.

Os vasos foram desinfestados e a água utilizada em todo processo deionizada. As soluções de Hoagland e Arnon eram trocadas a cada 14 dias, e o volume restaurado diariamente com a própria solução nutritiva. O ensaio contou

com cinco repetições, em delineamento inteiramente casualizado, sendo avaliado, após 150 dias, a altura das plantas, peso e teor de ferro da parte aérea e raiz.

As cultivares com os melhores resultados para crescimento de raiz e biomassa seca (IAC 576-70 e Pinheirinho) e os melhores isolados para indução do acúmulo de ferro em folhas de mandioca e/ou acréscimo na altura das plantas (MGTRSA05, MAIF2a e GBO3) foram selecionadas para ensaio de indução do bioacúmulo de ferro, em condições de campo. Para tanto, doze horas antes do plantio, manivas de 10 cm, contendo, aproximadamente, quatro gemas, foram bacterizadas por 30 minutos por imersão em cada uma das suspensões bacteriana ( $OD_{570\text{ nm}} = 0,7$ ), como descrito anteriormente.

Cada uma das suspensões bacterianas contou como um tratamento, com três parcelas por tratamento e três plantas por parcela, para ambas cultivares. As plantas foram arrançadas em delineamento experimental inteiramente casualizado. O solo presente na área experimental era um latossolo vermelho distrófico, típico da região de Lavras-MG, apresentando pela análise química ( $\text{mg dm}^{-3}$ ): potássio = 16; fósforo = 2,3; cálcio = 2,4; zinco = 0,84; ferro = 32,06; manganês = 23,67; cobre = 1,88; boro = 0,19, enxofre = 23,11, matéria orgânica = 1,18 e pH 6,3. Os isolados foram utilizados individualmente como tratamentos e as testemunhas foram o meio de cultura MCF, meio de crescimento dos isolados.

As plantas foram mantidas em campo por 9 meses. Após esse período, foram avaliados a biomassa, o comprimento e os teores de ferro presentes na parte aérea e raiz. O teor de ferro foi quantificado pela análise química no laboratório de solos em Viçosa-MG. Seguindo a mesma metodologia, todos os ensaios biológicos realizados foram repetidos e avaliados para confirmação dos resultados obtidos. Todos os dados foram submetidos à análise de variância

(ANOVA), analisados pelo programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2011) sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das sete cultivares avaliadas em campo (Tabela 1) (“Amarelo Vermelha”, “Amarelo Verde”, “IAC 576-70”, “Pinheirinho”, “Vassourinha Cristais”, “Roxa Cristais” e “Sobradona”), “Roxa Cristais” e “Sobradona” apresentaram melhores resultados para altura de plantas, apresentando acréscimo significativo em relação às demais cultivares. “IAC 576-70” e “Pinheirinho” apresentaram resultados mais satisfatórios, quanto ao rendimento de produção de mandioca, apresentando resultados significativos em relação às demais quanto à biomassa e comprimento da raiz após 12 meses do plantio. Estas cultivares, também, apresentaram acréscimo no comprimento da raiz, com valores significativos em relação às demais cultivares.

Constatou-se que, para o teor de ferro em plantas (Tabela 2), crescidas a 50% do teor de ferro recomendado para a cultura, ocorreu diferença significativa para o teor de ferro foliar apenas para as plantas tratadas com MGTRSA05, com acréscimo em 47% em relação à testemunha, e no sistema radicular diferença significativa para os isolados GBO3, MGTRSA05 e MAIIF2a, proporcionando acréscimo de 19,4, 26,25 e 25 % no teor de ferro em relação às plantas testemunhas, respectivamente. Para teor de ferro presente nas plantas a 100% apenas GBO3 foi capaz de induzir o acúmulo de ferro foliar e radicular com acréscimo em 33,5 e 41,18%, respectivamente.

Tabela 1 Altura e fatores de produtividade entre cultivares de mandioca em condições de campo

Cultivares	Altura das plantas (cm)	Comprimento da raiz (cm)	Biomassa raiz (g)
“Amarelo Verde”	93,6 c	31,9 b	1185,4 b
“Amarelo Vermelho”	129,6 b	22,6 b	1348,0 b
“IAC 576-70”	139,2 b	50,3 a	1890,6 a
“Pinheirinho”	148,0 b	43,0 a	1632,3 a
“Roxa Cristais”	154,5 a	40,9 b	1401,9 b
“Sobradona”	167,5 a	34,4 b	834,50 b
“Vassourinha cristais”	97,3 c	30,2 b	1317,3 b
CV(%)	11,17	16,94	29,11

As médias seguidas por mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Scott-Knott.

Para cultivar “Pinheirinho” não houve diferença significativa (Tabela 3) quanto às variáveis comprimento e biomassa da raiz, altura das plantas e teor de ferro foliar em todo os tratamentos, o teor de ferro presente no sistema radicular apresentou acréscimo para os isolados MGRTSA05 e GBO3 na ordem de 176 e 99,32 %, respectivamente em relação à testemunha.

Para cultivar “IAC 576-70”, também, não ocorreu diferença significativa (Tabela 3) para as variáveis comprimento e biomassa da raiz e altura das plantas, no entanto, plantas tratadas com o isolado MGRTSA05 apresentaram valor significativo em relação à testemunha quanto ao teor de ferro foliar na proporção de 44,74% e plantas tratadas com GBO3 apresentaram acréscimo no teor de ferro foliar e radicular na proporção de 108,47 e 99,79 %, respectivamente em relação à testemunha.

Tabela 2 Acúmulo de ferro em plantas de mandioca, mediado por isolados bacterianos. Plantas cultivadas em solução de Hoagland e Arnon a 50% e 100% do teor de ferro recomendado para a cultura

Tratamento	Teor de ferro (mg/Kg)			
	Foliar 50%*	Foliar 100%**	Raiz 50%*	Raiz 100%**
GBO3	356,5 b	435,8 a	1309,4 a	1503,9 a
MGTRSA05	521,9 a	339,1 b	1383,5 a	1042,1 b
MAIIF2a	394,6 b	313,4 b	1377,4 a	1199,5 b
AMRCA31	331,6 b	317,9 b	1170,4 b	1153,3 b
Controle	353,3 b	325,7 b	1099,4 b	1058,9 b
Cv(%)	22,31	21,18	17,21	23,40

As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Scott-Knott. \* Plantas cultivadas em solução de Hoagland e Arnon com 50% do teor de ferro recomendado para cultura da mandioca. \*\* Plantas cultivadas em solução de Hoagland e Arnon com 100% do teor de ferro recomendado para cultura da mandioca.

Tabela 3 Acúmulo de ferro mediado por isolados bacterianos em plantas de mandioca cultivar “Pinheirinho” e “IAC-576”. Plantas avaliadas em campo

Tratamento	Cultivar “Pinheirinho”		Cultivar “IAC576-70”	
	Teor de ferro (mg/Kg)			
	Foliar	Raiz	Foliar	Raiz
Controle	277,7 a	568,3 b	282,3 b	621,3 c
MGRSA05	270,3 a	1570,0 a	409,0 a	1296,6 a
GBO3	284,6 a	1087,0 a	337,3 ab	1057,0 ab
MAIIF2a	291,6 a	672,3 b	254,6 b	895,6 bc
CV	16,33	32,25	11,28	14,82

As médias seguidas por mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F

Dos três isolados avaliados, os mais promissores foram a bactéria endofítica MGTRSA05 e a rizobactéria GBO3, pelos resultados significativos para o aumento do teor de ferro foliar e/ou ferro presente no sistema radicular das plantas de mandioca.

Resultado que corrobora com autores que mencionam que bactérias são conhecidas pelo potencial promotor de crescimento, biocontrole e assimilação biológica (CURIE; BRIAT, 2003; ZHANG et al., 2009). Assimilação, como do elemento ferro, que é possível em razão de mecanismos como a acidificação do solo elevando a solubilidade do ferro férrico (RYU et al, 2003), por moléculas que capturam ferro do solo, os sideróforos (ROMEIRO; GARCIA, 2003) e mais recentemente descoberto, por transportadores e pela produção de voláteis que ativam os próprios mecanismos de aquisição das plantas (ZHANG et al., 2009).

Sideróforos são moléculas peptídicas com altíssima afinidade por ferro (NEILANDS; LEONG, 1986). Varias bactérias, incluindo as de solo, podem produzir e secretar sideróforos, ligando-se com alta afinidade ao elemento (GRAY; SMITH, 2005), fornecendo ferro em quantidade suficiente à planta (LEONG, 1986). Elas são produzidas e utilizadas sob estresse de ferro, sequestrando-o do ambiente externo na proximidade da raiz (BARNES et al., 1992; GLICK et al., 1999), indisponibilizando para outros organismos (ROMEIRO; GARCIA, 2003).

*B. subtilis* GB03 é uma rizobactéria simbiote capaz de aumentar o bioacúmulo de ferro e promover o crescimento das plantas (ZHANG et al., 2009). Dentre seus mecanismos, *B. subtilis* GB03 proporciona a fortificação sem utilizar sideróforos, produção de hormônios e contato físico com as plantas.

Em trabalho realizado em plantas *Arabidopsis thaliana* *B. subtilis* GB03, foi capaz de sintetizar mais de 30 compostos voláteis (PARE 'et al., 2005; RYU et al, 2003; ZHANG et al., 2009;), que ativaram cerca de 600 transcrições, relacionadas com modificações da parede celular, metabolismos

primários e secundários, resposta ao estresse, regulação hormonal e homeostase do elemento ferro (FARAG et al., 2006; RYU et al., 2003; ZHANG; KIM; KRISHNAMACHARI, 2007).

Este complexo de compostos orgânicos voláteis não só induz a expansão das células da folha (ZHANG; KIM; KRISHNAMACHARI, 2007), mas também amplia atividades fotossintéticas, com o aumento da síntese de maquinário fotossintético das plantas (ZHANG et al., 2008). Voláteis produzidos por GBO3 estimulam a absorção do ferro pela planta por elevar a sua própria capacidade de aquisição (ZHANG et al., 2009). Segundo Zhang et al. (2009), GBO3 direta e indiretamente induz acidificação da rizosfera, elevando a capacidade de liberar prótons pelas raízes em três vezes. Além de aumentar liberação de prótons, os voláteis emitidos acidificam o meio de crescimento da planta (FARAG et al., 2006).

GBO3, também, foi capaz de ativar a captação de ferro por meio da regulação da  $Fe^{3+}$  - quelato redutase e do transportador de ferro ferroso ( $Fe^{2+}$  IRT1) em resposta à demanda por ferro. Plantas de *Arabidopsis thaliana*, expostas a GBO3, apresentavam três dias após o tratamento um aumento de 30% em comparação com as plantas controle (ZHANG; KIM; KRISHNAMACHARI 2007). Consistentemente a tais fatos, resultados recentes demonstram que GBO3 foi eficiente na indução do acúmulo de ferro foliar em plantas de mandioca, proporcionando acréscimo de até 400 % em relação a testemunhas, retardo da senescência das folhas e acréscimo na biomassa seca (FREITAS et al., 2015).

Conclui-se, assim, que dentre os isolados endofíticos testados, MGTRSA05 e a rizobactéria GBO3, ambas identificadas como *B. subtilis* foram as mais promissoras na indução do bioacúmulo de ferro, sobretudo na cultivar “IAC576-70”. No entanto, novos trabalhos se fazem necessários a fim de se determinar os mecanismos envolvidos e os benefícios gerados pela interação entre os isolados bacterianos MGTRSA05 e GBO3 e a cultivar “IAC 576-70”.

O conhecimento sobre os benefícios das rizobactérias e bactérias endofíticas, no sistema de produção da mandioca, sua relação com o biocontrole de fitopatógenos e com o bioacúmulo de ferro representa uma nova estratégia na busca de soluções mais apropriadas para a produção de mandioca, otimizando o emprego de estratégias multidisciplinares, reduzindo o impacto ambiental, resultando no aumento da produtividade e qualidade do produto.

## ABSTRACT

Bacteria can promote the accumulation of iron in cassava leaves, however, its potential for roots has not yet been proven. Initially, seven cultivars (Amarelo Vermelha, Amarelo Verde, IAC 576-70, Pinheirinho, Vassourinha Cristais, Roxa Cristais and Sobradona) were evaluated regarding productivity. Of these, IAC 576-70 and Pinheirinho were selected, after 12 months, to give sequence to the experiment. Endophytic and rhizobacteria GBO3 isolates were evaluated in greenhouses regarding the potential for inducing iron accumulation by cassava plants. For this, a collection of endophytic autoctone isolates, MGRTSA05 (*Bacillus subtilis*), MAIIF2a (*Microbacterium imperiale*) and Rhizobacteria GBO3 (*Bacillus subtilis*), recognized as beneficial in controlling *Fusarium solani* and increasing biomass in the cassava culture were previously selected. They were evaluated regarding the inducing potential in Leonard vases containing Hoagland and Arnon standard solution (50% and 100% of iron content indicated for the cassava culture), in order to determine the behavior of the isolates in ideal and iron deficiency conditions. With the results obtained, cultivars IAC 576 and Pinheirinho were taken to field, bacteriazied with endophytic isolates MGRTSA05, MAIIF2a and Rhizobacteria GBO3, which presented significant results when compared to the control for iron bioaccumulation in cassava plants under nutritive solution. In field, we concluded that isolates MGRTSA05 and GBO3, both identified as *Bacillus subtilis*, were capable of providing iron bioaccumulation, significantly increasing the content of iron present in the roots of the plants.

Keywords: *Manihot esculenta* Crantz. Plant growth promotion.

## REFERÊNCIAS

- BARBIERI, P. et al. Wheat inoculation with *Azospirillum brasiliense* Sp6 and some mutants altered in nitrogen fixation and indole-3-acetic acid production. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 36, n. 1, p. 87-90, Aug. 1986.
- BARNESS, E. et al. Iron uptake by plants from microbial siderophores: a study with 7-nitrobenz-2 oxa-1,3-diazole desferrioxamine as fluorescent ferrioxamine B analog. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 99, n. 4, p. 1329-1335, Aug. 1992.
- BENSALIM, S.; NOWAK, J.; ASIEDU, S. K. A plant growth promoting rhizobacterium and temperature effects on performance of 18 clones of potato. **American Journal of Potato Research**, Orono, v. 75, n. 3, p. 145-152, May 1998.
- BORBA, A. L. C. et al. Fungos fitopatogênicos na pós-colheita de mandioca sob processamento mínimo. **Revista Técnico Científica**, Santa Catarina, v. 3, n. 1, p. 762, 2012.
- CHEN, C. et al. Biological control of *Fusarium* wilt on cotton by use of endophytic bacteria. **Biological Control**, Orlando, v. 5, n. 1, p. 83-91, Mar. 1995.
- CURIE, C.; BRIAT, J. F. Iron transport and signaling in plants. **Annual Review Plant Biology**, Palo Alto, v. 54, p. 183-206, 2003.
- FARAG, M. A. et al. GC-MS SPME profiling of rhizobacterial volatiles reveals prospective inducers of growth promotion and induced systemic resistance in plants. **Phytochemistry**, Oxford, v. 67, n. 20, p. 2262-2268, Oct. 2006.
- FARIAS, A. B. N. **Aspectos sócio econômicos e agronômicos da mandioca**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006. 817 p.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia** Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, nov./dez. 2011.

FREITAS, M. A. et al. Augmenting iron accumulation in cassava by the beneficial soil bacterium *Bacillus subtilis* (GBO3). **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 6, p. 596, Aug. 2015.

GLICK, B. R. et al. **Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth promoting bacteria**. London: Imperial college Press, 1999. 200 p.

GLICK, B. R. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 41, n. 2, p. 109-117, 1995.

GRAY, E. J.; SMITH, D. L. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 37, n. 3, p. 395-492, Mar. 2005.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. **The water-culture method for growing plants without soil**. Califórnia: Califórnia Agricultural Experiment Station, 1950. 347 p. (Circular, 347).

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

MELO, I. S.; FARIA, R.; TEIXEIRA, M. A. Diversidade de bactérias endofíticas na cultura da mandioca. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, Jaguariúna, v. 33, p. 6-24, dez. 2005.

MURTY, M. G.; LADHA, J. K. Influence of *Azospirillum* inoculation on the mineral uptake and growth of rice under hydroponic conditions. **Plant and Soil**, The Hague, v. 108, n. 2, p. 281-285, May 1988.

NEILANDS, J. B.; LEONG, S. A. Siderophores in relation to plant growth and disease. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 37, p. 187-208, June 1986.

PARE, P. W. et al. Elicitors and priming agents initiate plant defense responses. **Photosynthesis Research**, Hague, v. 85, n. 2, p. 149-159, Aug. 2005.

ROMEIRO, R. S.; GARCIA, F. A. O. Controle biológico de enfermidades de plantas incitadas por bactérias. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 11, n. 1, p. 195-228, 2003.

RYU, C. M. et al. Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 100, n. 8, p. 4927-4932, Apr. 2003.

VINCENT, J. M. A. **Manual for the practical study of the root-nodule bacteria**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1970. 164 p. (International Biological Programme Handbook, 15).

WEBSTER, G. et al. Interactions of rhizobia with rice and wheat. **Plant and Soil**, The Hague, v. 194, n. 1, p. 115-122, July 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global database on iron deficiency and anaemia, micronutrient deficiency information system**. Geneva: WHO, 2008. 115 p.

ZHANG, H. et al. A soil bacterium regulates plant acquisition of iron via deficiency-inducible mechanisms. **Plant Journal**, Oxford, v. 58, n. 4, p. 568-577, May 2009.

ZHANG, H. et al. Soil bacteria augment *Arabidopsis* photosynthesis by decreasing glucose sensing and abscisic acid levels in planta. **Plant Journal**, Oxford, v. 56, n. 2, p. 264-273, Oct. 2008.

ZHANG, H.; KIM, M. S.; KRISHNAMACHARI, V. Rhizobacterial volatile emissions regulate auxin homeostasis and cell expansion in *Arabidopsis*. **Planta**, Berlin, v. 226, n. 4, p. 839-851, Sept. 2007.