

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO**  
**CENTRO DE CIENCIAS AGRÁRIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROECOLOGIA**

**FLÁVIA ARRUDA DE SOUSA**

**ANTAGONISMO DE ISOLADOS DE *Bacillus* SOBRE *Pyricularia grisea***

**São Luís - Maranhão**

**Setembro de 2011**

**FLÁVIA ARRUDA DE SOUSA**

Engenheira Agrônoma

**ANTAGONISMO DE ISOLADOS DE *Bacillus* SOBRE *Pyricularia grisea***

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Agroecologia da Universidade Estadual do Maranhão, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Agroecologia.

Orientadora:

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Antonia Alice Costa Rodrigues

**São Luís - Maranhão**

**Setembro de 2011**

Sousa, Flávia Arruda de.

Antagonismo de isolados de *Bacillus* sobre *Pyricularia grisea* / Flávia Arruda de Sousa.– São Luís, 2011.

64 f

Dissertação (Mestrado) – Curso de Agroecologia, Universidade Estadual do Maranhão, 2011.

Orientador: Profa. Antônia Alice Costa Rodrigues

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO**  
**CENTRO DE CIENCIAS AGRÁRIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROECOLOGIA**

**Flávia Arruda de Sousa**

ANTAGONISMO DE ISOLADOS DE *Bacillus* SOBRE *Pyricularia grisea*

Dissertação defendida e aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA:**

---

**Profa. Dra. Antonia Alice Costa Rodrigues (Orientadora)**

---

**Profa. Dra. Adenilde Ribeiro Nascimento (1ª examinadora)**

---

**Prof. Dr. Cláudio Belmino Maia (2ª examinador)**

***DEDICO***

*A meus pais e minha irmã, que me apoiaram e me deram força para concluir mais esta etapa da minha formação acadêmico-científica.*

*Aos amigos que sempre me deram apoio incondicional, aos colegas de laboratório que participaram desta etapa e à minha orientadora pela disponibilidade, apoio e orientação.*

***OFEREÇO***

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por me conceder paz de espírito para realizar esse projeto.

A meus pais, pelo amor, carinho, dedicação e por me apoiarem e incentivarem em todas as etapas da minha vida.

A minha irmã, Arima, por me apoiar incondicionalmente, pelo carinho e amor.

A professora e orientadora Antonia Alice Costa Rodrigues, que com seu jeito de ser me conquistou, me dando sempre liberdade para aprofundar minhas capacidades e chamando a atenção de tal forma a me fazer querer sempre buscar meu melhor, pela paciência, compreensão e dedicação.

À pesquisadora da EMBRAPA arroz e feijão, Marta Cristina Corsi de Filippi, pela disponibilidade, estágio, ensinamentos, por permitir e auxiliar na realização de uma das etapas fundamentais desta dissertação.

A João Batista Zonta, por se fazer sempre disponível quando solicitado e ter me dado auxílio imprescindível na estatística deste trabalho.

À Mônica companheira de projeto, pela ajuda, troca de conhecimentos e disponibilidade, indispensáveis para execução deste trabalho.

Ao Diogo Sardinha pela ajuda, paciência, companheirismo no decorrer do projeto e pelas trocas de conhecimento.

A Daniele Paz, sempre disposta a ajudar, pelo companheirismo nos trabalhos científicos, pelos momentos vividos da graduação até o mestrado, pela amizade.

À Ivaneide Oliveira pela troca de conhecimento, parceria e boa convivência.

A meus companheiros de laboratório e amigos, Leonardo, Natália, José Ribamar, pelos auxílios no projeto e momentos agradáveis vividos no Laboratório de Fitopatologia.

Às amigas Natália Moura, Jarlene Nina, Fabiana Viana, Cristiane Italiano, por estarem presentes nessa etapa da minha vida, me apoiando e acreditando no meu potencial.

Aos professores da UEMA/Mestrado em Agroecologia, pela dedicação e ensinamentos durante o período do curso e à CAPES-UEMA pela concessão da bolsa.

Aos colegas de turma, pelos maravilhosos dias de convivência e troca de experiências.

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para realização deste trabalho e na minha formação acadêmica, os meus sinceros agradecimentos.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	viii
<b>RESUMO</b> .....	ix
<b>ABSTRACT</b> .....	x
<b>CAPÍTULO I – REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	11
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	13
Origem, características botânicas e composição nutricional do arroz .....	14
Importância econômica e social do arroz .....	15
Principais doenças da cultura do arroz .....	16
A brusone do arroz .....	17
Controle biológico e o uso de antagonistas .....	22
Bactérias do gênero <i>Bacillus</i> como antagonistas .....	24
<b>REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA</b> .....	28
<b>CAPÍTULO II – ANTAGONISMO DE <i>Bacillus</i> sp. SOBRE <i>Pyricularia grisea</i></b> .....	36
<b>RESUMO</b> .....	37
<b>ABSTRACT</b> .....	38
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	39
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	40
Obtenção dos antagonistas e do patógeno.....	40
Avaliação do antagonismo de <i>Bacillus</i> spp. a <i>Pyricularia grisea in vitro</i> .....	41
Avaliação do efeito antagônico de <i>Bacillus</i> spp. à brusone do arroz <i>in vivo</i> .....	43
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	44
Antagonismo de <i>Bacillus</i> spp. a <i>Pyricularia grisea in vitro</i> .....	44
Antagonismo de <i>Bacillus</i> spp à Brusone do Arroz <i>in vivo</i> .....	47
<b>REFÊRENCIA BIBLIOGRÁFICA</b> .....	49
<b>CONCLUSÃO GERAL</b> .....	56
<b>ANEXOS</b> .....	57

## LISTAS DE TABELAS

Tabela 1. Avaliação da Inibição do crescimento micelial de <i>Pyricularia grisea</i> por isolados de <i>Bacillus</i> pelo método de pareamento, São Luís, 2011 .....	52
Tabela 2. Avaliação da Inibição do crescimento micelial de <i>Pyricularia grisea</i> por isolados de <i>Bacillus</i> , em teste com metabólitos, São Luís, 2011.....	53
Tabela 3. Avaliação da germinação de conídios de <i>Pyricularia grisea</i> confrontados com isolados de <i>Bacillus</i> , São Luís, 2011 .....	54
Tabela 4. Avaliação da redução de área foliar afetada por <i>Pyricularia grisea</i> com a utilização de isolados de <i>Bacillus</i> como biocontroladores, São Luís, 2011 .....	55

## ANTAGONISMO DE ISOLADOS DE *Bacillus* SOBRE *Pyricularia grisea*

**Autor: Flávia Arruda de Sousa**

**Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Antônia Alice Costa Rodrigues**

### RESUMO

A Brusone do arroz, causada pelo fungo *Pyricularia grisea* é a principal doença do arroz, para o seu controle há grande emprego de agrotóxicos. A utilização de espécies de *Bacillus* como agentes de controle biológico, dentro de um manejo integrado, apresenta eficiência, além de segurança aos agricultores e ao meio ambiente, portanto, objetivou-se neste trabalho, selecionar espécies de *Bacillus*, oriundos de municípios maranhenses, através de testes de antagonismo *in vitro* e *in vivo*. Os ensaios *in vitro* realizados foram, o método de pareamento do círculo e o teste de metabólitos, ambos para avaliar a inibição do crescimento micelial de *P. grisea*. Foi também realizado o teste de germinação dos conídios de *P. grisea*. No ensaio *in vivo*, utilizou-se a cultivar Primavera, plantada em bandejas, após nove dias de plantio procedeu-se a inoculação dos isolados de *Bacillus*, através da pulverização da parte aérea das plantas; após a colonização do antagonista por cinco dias, inoculou-se o patógeno desafiante *P. grisea*, através de pulverização da parte aérea do arroz, a avaliação da severidade foi realizada oito dias após a inoculação da *P. grisea* estimada através de escala de severidade de 10 graus de acordo com Notteghem (1981). Em todos experimentos, os dados foram submetidos à Análise de Variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott, utilizando-se o software SISVAR. No pareamento pelo teste do Círculo o isolado B22', propiciou a maior inibição do crescimento micelial (57,7 %) de *P. grisea*, diferindo dos demais isolados. No teste de metabólitos, os isolados que apresentaram maior efeito inibitório foram B22', B12, B7, B41 e B47 e os metabólitos se mostraram termoestáveis. No teste de germinação de conídios todos possibilitaram germinação inferior a da testemunha nos dois períodos avaliados, exceto o isolado B47, na avaliação após 2 horas de incubação. No teste *in vivo* os isolados B41, B47, B12, B7 e B22' permitiram a menor severidade da doença. Os resultados *in vivo* confirmaram o potencial antagonista dos isolados de *Bacillus* demonstrados nos testes *in vitro*.

**Palavras-chave:** Biocontrole, Brusone do Arroz, *Oryza sativa*

## ANTAGONISM OF *Bacillus* ISOLATES AGAINST *Pyricularia grisea*

**Author: Flávia Arruda de Sousa**

**Adviser: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Antônia Alice Costa Rodrigues**

### ABSTRACT

The rice blast caused for the fungus *Pyricularia grisea* is the main disease of the rice, for its control there is a large use of pesticides. The use of *Bacillus* spp. as agents of biological control, inside of an integrated handling, presents efficiency, in addition to security for agriculturists and at the environment. Therefore, the objective of this work was to select species of *Bacillus*, deriving of cities located in Maranhão - Brazil, through antagonism test *in vitro* and *in vivo*. The *in vitro* tests realized were the method of pairing the Circle and metabolites tests, both of them to evaluate the inhibition of mycelial growth of the *P. grisea*. It was also performed the conidial germination test of *P. grisea*. In the *in vivo* test, it was cultivated Spring, planted in trays, after nine days of plantation if it proceeded inoculation from the isolated of *Bacillus*, through the spraying of the aerial part of the plants; after colonization of the antagonist for five days, the challenger pathogen *P. grisea* it was inoculated, through aerial spraying of rice, the assessment of severity was performed eight days after inoculation of *P. grisea* estimated by severity scale of 10 degrees according to Notteghem (1981). In all the experiments, the data were submitted to Variance Analysis and means were compared by Skott-Knott test, using the software SISVAR. In pairing by the Circle test, the isolated B22', propitiated the biggest inhibition of the mycelial growth (57.7%) of *P. grisea*, differing from the other isolates. In the metabolites test, them isolated that they had presented the greater inhibitory effect were B22', B12, B7, B41 e B47, and the metabolites proved thermostable. In the test of germination of conidial all make possible inferior germination of the witness in the two evaluated periods, except the B47 isolated, in the evaluation after 2 hours of incubation. In the *in vivo* test, isolates B41, B47, B12, B7 and B22' allowed a less severity of the illness. The *in vivo* results, confirmed the antagonistic potential of the isolated *Bacillus* demonstrated in the *in vitro* tests.

**Key words:** Biocontrol, Blast of rice, *Oryza sativa*

**CAPÍTULO I**  
**REFERENCIAL TEÓRICO**

---

## 1 INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.), pertencente à família Poaceae, é um dos cereais mais consumidos no mundo e uma das principais fontes de carboidratos, minerais, como zinco e ferro, e vitaminas, como B1 e B2 para a população mundial (SILVA et al., 2002).

Para a safra 2011/2012 a FAO (2011) projeta uma produção recorde de 713 milhões de toneladas de arroz, para abastecer o mercado mundial.

De acordo com Pereira (2002), no Brasil, o arroz assumiu grande importância social, econômica e política, desde os tempos coloniais, impulsionando o país à condição de maior produtor no hemisfério ocidental. Segundo o IBGE, no relatório de julho/2011 o Brasil apresentou uma produção de 13,35 milhões de toneladas de arroz com casca, com uma área colhida de 2,7 milhões de ha e um rendimento médio de 4.856 kg/ha.

A rizicultura é praticada em todos os estados brasileiros, sendo o Rio Grande do Sul o maior produtor nacional (66,5 % da produção), seguido de Santa Catarina (7,3 % da produção) e do Maranhão (5,2 % da produção) (IBGE, 2011).

A renda e a importância econômica e social diferem de acordo com as condições agroclimáticas e a tradição da cultura na região (FERREIRA et al., 2005). Segundo Del Villar et al. (2001), em relação aos outros estados orizícolas do Brasil, o Maranhão apresenta vantagens agroecológicas e uma situação geográfica favorável, na perspectiva do abastecimento do mercado interno e regional.

No Maranhão o arroz é cultivado em diferentes sistemas e ambientes, no entanto, estima-se que 90 % do arroz produzido no estado são oriundos do sistema de sequeiro (FERRAZ JÚNIOR, 1993). A dependência total dos plantios em regime de sequeiro, da disponibilidade de água e das condições de clima, tornam a cultura de alto risco, principalmente em relação à incidência de doenças (TEIXEIRA et al., 1991), as quais afetam a produtividade da cultura e qualidade das sementes, sendo as doenças fúngicas as mais expressivas em relação aos demais patógenos.

A brusone do arroz, causada pelo fungo *Pyricularia grisea* (Cooke) Saccardo [teleomorfo *Magnaporthe grisea* (Hebert) Barr], é uma das doenças mais destrutivas e está amplamente disseminada em todas as regiões do mundo onde o arroz é cultivado. Ocorre endemicamente nas regiões produtoras, podendo adquirir caráter epidêmico quando as condições ambientais forem favoráveis, tanto em condições de cultivo inundado como de terras altas (MALAVOLTA et al., 2008). Nas cultivares de arroz de terras altas, a brusone é responsável por perdas de aproximadamente 50% na produtividade da cultura (PRABHU et

al., 2006). A redução no rendimento também é causada pelas manchas nos grãos, que podem causar perdas variáveis entre 12 e 30 % no peso e redução de 18 a 22 % no número de grãos cheios por panícula (FILIPPI; PRABHU, 1998) e causar esterilidade da semente de arroz (SOLIGO et al., 2004), de acordo com a suscetibilidade de cada cultivar.

O controle dessas doenças é feito através do uso de fungicidas, mas a ausência de especificidade e os riscos à saúde humana e ao ambiente apresentado por este tipo de defensivo agrícola acentuam a necessidade de novas formas de controle, principalmente o controle biológico através de microorganismos, como vírus, bactérias e outros (ALVES, 1998),

Dentre as alternativas para a redução no uso de agrotóxicos o controle biológico é um dos mais discutidos, entretanto, apenas a substituição de um produto químico por um biológico não é a situação adequada, mas sim, um componente a mais para o desenvolvimento de sistemas de cultivo sustentáveis e, portanto, menos dependentes do uso de agrotóxicos (BETTIOL; MORANDI, 2009).

Segundo Kupper et al. (2003), dentre os antagonistas mais estudados atualmente, encontra-se a bactéria *Bacillus subtilis* Ehrenberg, a qual vem se destacando no controle de doenças do filoplano e em pós-colheita. Bettiol (1997) demonstrou a atividade antagônica de *B. subtilis* a *P. oryza* de arroz através de sua aplicação em sementes e parte aérea, considerando bastante promissor o seu emprego e/ou de seus metabólitos para o controle da brusone do arroz.

Na perspectiva de possibilitar uma produção de arroz voltada para os princípios agroecológicos, objetivou-se desenvolver uma pesquisa fundamentada na utilização do controle biológico. Método este, capaz de reduzir ou inibir a população de fitopatógenos do arroz, utilizando uma prática potencialmente eficaz, condizente com os princípios agrônômicos e ecológicos que regem o desenvolvimento sustentável de um agroecossistema.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

Esta revisão objetiva abordar de forma abrangente a temática desta dissertação, como forma de justificar a importância e embasamento desta pesquisa. Assim, a abordagem será uma revisão sobre os principais aspectos da cultura do arroz e de sua principal doença a Brusone, o controle biológico, o uso de antagonistas com ênfase em *Bacillus* e, ainda, os métodos utilizados para seleção de microorganismos em programas de biocontrole.

## 2.1 Origem, características botânicas e composição nutricional do arroz

A espécie *Oryza sativa* L. é amplamente cultivada e usada na alimentação humana em todo o mundo. Para Galli (1978), o mais provável é que o centro de origem dessa espécie seja a região situada a sudoeste do Himalaia.

Com o processo evolutivo e de domesticação a que se submeteu a espécie *O. sativa*, ao longo do tempo, foram surgindo tipos geneticamente divergentes, os quais foram se adaptando as mais variadas condições ecológicas. Assim sendo, com base na distribuição geográfica, na morfologia da planta e do grão, na esterilidade do híbrido e na reação sorológica, em 1928, esta espécie foi subdividida em duas principais subespécies, grupos ou raças ecogeográficas: Indica e Japônica (PEREIRA, 2002). As novas cultivares de alta qualidade de grãos desenvolvida para as condições de terras altas do país, como Canastra, Primavera e Maravilha, são híbridos de Indica e Japônica (PINHEIRO, 1998). Outras cultivares tais como: Caiapó, Carajás, Carisma e Bonança também são indicadas para o cultivo em terras altas. Sendo todas elas suscetíveis, moderadamente suscetíveis ou moderadamente resistentes à brusone, principal doença do arroz.

Botanicamente a espécie *O. sativa* pertence à família Poaceae, apresenta ramificações secundárias nas panículas, espiguetas persistentes no pedicelo e lígulas com até 10 mm de comprimento. A cultivar Primavera possui folhas verdes, com pubescência ausente, aurícula verde-claro e lígula de incolor a verde. A planta é de porte ereto, alcança a altura de 103,3 cm, ciclo cultural de 110 dias, com comprimento de colmo de 77,7 cm e espessura de 4,35 mm e comprimento da panícula de 25,7 cm, com peso de 1000 grãos em média de 23,90 g e comprimento do grão de 8,07 mm sem casca, apresentam forma muito alongada e cor branca (FONSECA et al., 2001).

O arroz é constituído principalmente por amido, sendo uma excelente fonte de energia, apresentando quantidades menores de proteínas, lipídios, fibras e cinzas. Entretanto, a composição do grão e de suas frações está sujeita a diferenças varietais, variações ambientais, de manejo, de processamento e de armazenamento (ZHOU et al., 2002), produzindo grãos com características nutricionais diferenciadas. Além disso, os nutrientes não estão uniformemente distribuídos nas diferentes frações do grão. As camadas externas apresentam maiores concentrações de proteínas, lipídios, fibra, minerais e vitaminas, enquanto o centro é rico em amido (WALTER et al., 2008).

## 2.2 Importância econômica e social do arroz

O arroz é cultivado nos cinco continentes, tanto em regiões tropicais como temperadas. É um dos cereais mais produzidos e consumidos no mundo, caracterizando-se como principal alimento para mais da metade da população mundial. Sua importância é destacada principalmente em países em desenvolvimento, tais como o Brasil, desempenhando papel estratégico em níveis econômico e social (FAO, 2006).

Só na Ásia, mais de 2 milhões de pessoas obtêm de 60 a 70 % do consumo da energia do arroz e seus derivados. Ele é a fonte alimentar com o crescimento mais rápido na África e de grande importância para segurança alimentícia em países com renda escassa (FAO, 2004).

Segundo a FAO (2011), a produção mundial em 2010/2011 alcançou volume recorde de 696 milhões de toneladas (464 milhões de toneladas de arroz branco) contra 683 milhões de toneladas de arroz em casca em 2009/2010, aumento de 1,8 %. As colheitas têm crescido em quase todas as regiões arrozeiras do mundo, graças a uma extensão das áreas de cultivo, as quais alcançariam cerca de 162 milhões de hectares. O aumento da produção tem ocorrido principalmente nas regiões asiáticas, especialmente na China, Índia, Indonésia e Bangladesh, os maiores produtores mundiais, que juntos totalizam dois terços da produção mundial. As primeiras projeções para a temporada 2011/2012 indicam um novo incremento da produção, graças a boas condições climáticas, para 713 milhões de toneladas (476 milhões de toneladas de arroz branco), alta de 2,6%.

De acordo com Pereira (2002), no Brasil, o arroz assumiu grande importância social, econômica e política, desde os tempos coloniais, impulsionando o país à condição de maior produtor no hemisfério ocidental. No entanto a importância econômica e social difere de acordo com as condições agro-climáticas e a tradição da cultura em cada região (FERREIRA et al., 2005).

Segundo o IBGE (2011) a safra Brasileira de arroz em 2010, atingiu 11,3 milhões toneladas de arroz em casca, com uma área de colhida de 2,7 milhões de ha e uma produtividade média de 4.114 kg/ha. Em 2011 o Brasil apresentou um aumento em relação à safra de 2010 de 18,9 % na produção, com 13,35 milhões de toneladas de arroz com casca, aumento da área colhida de 1,6 %, para 2,75 milhões de ha e aumento no rendimento médio de 17,1 %, chegando a 4.856 kg/ha (IBGE, 2011).

A rizicultura é praticada em todos os estados brasileiros, sendo o Rio Grande do Sul o maior produtor nacional (66,5 % da produção), seguido de Santa Catarina (7,3 % da produção) e do Maranhão (5,2 % da produção). Em 2011, só o Rio Grande do sul foi

responsável pela produção de 8,942 milhões toneladas de arroz, numa área de aproximadamente 1,2 milhões de ha, correspondendo a 42,5 % da área plantada com essa cultura no Brasil (IBGE, 2011).

No nordeste, a safra de 2011 atingiu 1,17 milhões de toneladas de arroz, onde o Maranhão foi responsável por cerca de 703,4 mil toneladas, sendo o maior produtor de arroz do nordeste, com aproximadamente 60,1 % da produção regional. Quanto a área plantada, o Maranhão apresenta 467,7 mil ha, o que corresponde a 17 % da área nacional plantada com essa cultura. O rendimento médio de 1.504 kg/ha, esta bem abaixo da média nacional de 4.856 kg/ha (IBGE, 2011).

Segundo Del Villar et al. (2001), em relação aos outros estados rizícolas do Brasil, o Maranhão apresenta vantagens agroecológicas e uma situação geográfica favorável, na perspectiva do abastecimento do mercado interno e regional. No Maranhão o arroz é cultivado em diferentes sistemas e ambientes, no entanto, estima-se que 90 % do arroz produzido no estado são oriundos do sistema de sequeiro (FERRAZ JÚNIOR, 1993).

A dependência total dos plantios em sequeiro, da disponibilidade de água e das condições de clima, torna a cultura de alto risco, principalmente em relação aos riscos de incidência de doenças, como a brusone. Segundo Del Villar et al. (2001), aproximadamente 52 % da produção do arroz do Maranhão é oriunda de lavouras com utilização de baixa tecnologia; porém, existem regiões, como a de Balsas, que utilizam tecnologias mais avançadas.

A importância econômica do arroz reflete sua grande importância na alimentação humana, onde nos países em desenvolvimento, o arroz é um dos principais alimentos da dieta, sendo responsável por fornecer, em média, 715 kcal *per capita* dia, 27 % dos carboidratos, 20 % das proteínas e 3 % dos lipídios da alimentação. No Brasil, o consumo *per capita* é de 108 g por dia, fornecendo 14 % dos carboidratos, 10 % das proteínas e 0,8 % dos lipídios da dieta (KENNEDY et al., 2002).

### **2.3 Principais doenças da cultura do arroz**

A produtividade do arroz é afetada por diversos fatores, encontrando-se entre eles as doenças fúngicas que podem causar redução ou perda total no rendimento da orizicultura. Dentre as principais doenças do arroz, destacam-se a brusone (*Pyricularia grisea*), mancha parda (*Drechslera oryzae*) (sin. *Bipolaris oryzae*), mancha estreita (*Cercospora janseana*), escaudadura (*Microdochium oryzae*), queima das bainhas (*Rhizoctonia oryzae*) e manchas dos

grãos (*Phoma* sp., *Dreschlera oryzae*, *Curvularia lunata*, *Nigrospora oryzae*, *Alternaria* sp., *Fusarium* sp.) (AMARAL et al., 1985). Outros fungos como *Fusarium oxysporum*, que causa o mal do colo, e *Fusarium solani*, que ocorre em sementes, (MENDES et al., 1998) podem ocasionar grandes perdas na cultura do arroz irrigado.

Dentre as doenças citadas dar-se-á ênfase à brusone causada pelo fungo *P. grisea*.

### 2.3.1 A brusone do arroz

#### Aspectos históricos e danos econômicos

Segundo Bedendo (1997), os primeiros registros de ocorrência da brusone datam de 1600 e foram feitos na China. De acordo com o autor, o termo “brusone” foi adaptado do italiano “bruzone” e foi adotado na tradução para o português. Na Itália, relatos demonstram a ocorrência da doença de longa data, desde 1828.

A Brusone é uma das doenças mais difundidas pelo mundo e foi registrada em 70 países e praticamente ocorre em todos os locais onde o arroz é plantado (OU, 1985). A primeira constatação da brusone em arroz, no Brasil, ocorreu em 1912 em amostras enviadas de Santos e de Iguape no Estado de São Paulo (PRABHU; FILIPPI, 2006).

Atualmente, ocorre em todas as regiões do território brasileiro, do Rio Grande do Sul, em arroz irrigado, até o Amazonas, em arroz de terras altas. Os prejuízos causados pela Brusone são variáveis, em condições favoráveis à doença, na Região Centro - Oeste do Brasil, as perdas podem chegar até 100 % (FILIPPI; PRABHU, 1998). No Estado do Tocantins, que cultiva anualmente cerca de 70 mil hectares de arroz irrigado, embora não existam estimativas quantificadas, os prejuízos são significativos com a ocorrência da alta severidade da brusone nas folhas, devido à falta de água na fase vegetativa. Na Região Nordeste e nos Estados do Pará e Amazonas, a incidência da brusone é baixa e de menor importância que as outras doenças que ocorrem no arroz (FILIPPI et al., 2004).

A brusone do arroz é uma das doenças mais destrutivas e está amplamente disseminada em todas as regiões do mundo onde o arroz é cultivado. Ocorre endemicamente nas regiões produtoras, podendo adquirir caráter epidêmico quando as condições ambientais forem favoráveis, tanto em condições de cultivo inundado como de terras altas (MALAVOLTA et al., 2008).

A redução no rendimento também é causada pelas manchas nos grãos, que podem causar perdas variáveis entre 12 e 30 % no peso e redução de 18 a 22 % no número de grãos

cheios por panícula (FILIPPI; PRABHU, 1998) e causar esterilidade da semente de arroz (SOLIGO et al., 2004), de acordo com a suscetibilidade de cada cultivar.

### **Etiologia e epidemiologia**

A brusone do arroz é causada pelo fungo *Pyricularia grisea* (Cooke) Saccardo [teleomorfo *Magnaporthe grisea* (Hebert) Barr] (PRABHU; FILIPPI, 2006).

Atualmente com o advento da biologia molecular é possível conectar a fase anamorfa com a teliomorfa e, mesmo se não há a teleomorfa, é possível estabelecer as relações do gênero anamófico dentro da categoria hierárquica teleomórfica acima do nível de gênero, como família, ordem e classe, tornando a classificação mais natural. Portanto, os fungos anamórficos devem ser classificados como fungos dos filos Ascomycota ou Basidiomycota quando for conhecida a conexão anamorfa-teleomorfa, fato facilitado, principalmente porque há um crescente aumento de espécies e gêneros sendo sequenciados (LUZ, 2011).

A fase perfeita (teleomorfo) *Magnaporthe grisea* pertence à classe Ascomycetos, Ordem Diaporthales e família Physoporellaceae. Os ascósporos são hialinos, fusiformes, com três septos e os ascos unitunicados (PRABHU; FILIPPI, 2006).

A fase imperfeita (anamorfo) *Pyricularia grisea* pertence a classe dos fungos Mitosporicos, subclasse Hyphomycetidae, ordem Moniliales, e família Moniliaceae (MENEZES; OLIVEIRA, 1993).

As espécies do gênero *Pyricularia* parasitam principalmente gramíneas. Os conídios são piriformes, obclavados, com a base circular e o ápice fino, levemente escuros ou hialinos, com pequeno hilo na base, a maioria possui um ou dois septos transversais; ligam-se ao conidióforo pelo seu lado mais dilatado e medem entre 17-23 µm de comprimento por 8- 11 mm de largura (PRABHU; FILIPPI, 2006). As colônias são muito variáveis quanto à densidade e à cor do micélio: são encontradas desde colônias ralas até cotonosas e desde colônias esbranquiçadas até acinzentadas escuras, em função do meio de cultura e do isolado do fungo (BEDENDO, 1997).

A quantidade de lesões esporulativas depende das práticas culturais adotadas e muitos fatores afetam a produção e a liberação de conídios tais como temperatura, precipitação pluviométrica, umidade, vento e a resistência do hospedeiro. A esporulação aumenta quando a umidade relativa é superior a 93 % e não ocorre abaixo de 89 %, enquanto que a temperatura ideal varia entre 25 e 28 °C. Sob condições ideais, alta taxa de produção de conídios ocorre entre três e oito dias após o aparecimento da lesão e estende-se por mais de 20 dias (KIM,

1994). A luz também influencia o micélio e os esporos, em geral a esporulação em meio de cultura é favorecida por períodos alternados de luz fluorescente e escuro (PRABHU; FILIPPI, 2006).

As lesões mantêm sua capacidade de esporulação por períodos mais prolongados quando a temperatura varia entre 16 e 24 °C, do que com temperatura constante de 28 °C. A produção e a liberação de conídios atingem o máximo entre meia-noite e 6 h e são disseminados pelo vento ou chuvas (WEBSTER; GUNELL, 1992). Cada lesão formada no hospedeiro pode dar origem a até 20mil conídios ao longo de vários dias, proporcionando inoculo para o próximo ciclo de infecção (EBBOLE, 2007). Os conídios do agente causal da brusone são comumente disseminados num raio de 230 m da fonte de inóculo (KINGSOLVER et al., 1984).

As chuvas lavam os conídios das plantas, reduzindo a quantidade de inóculo e, em dias chuvosos, a disseminação de conídios é menor. Precipitações com intensidade superior a 3,5 mm/dia são importantes na redução da doença (KIM, 1994). Deste modo, a incidência da brusone em arroz de terras altas em anos chuvosos tem sido menor do que em anos com deficiência hídrica (PRABHU et al., 2002).

O fungo *P. grisea* pode sobreviver, na forma de micélio ou conídio, em restos de cultura, sementes, hospedeiros alternativos e plantas de arroz que permanecem no campo. A disseminação ocorre principalmente através do vento. Uma vez depositado na superfície da planta e na presença de água livre, o conídio germina, produzindo tubo germinativo e apressório. A penetração é feita diretamente através da cutícula, raramente pelos estômatos. A colonização dos tecidos é facilitada por toxinas, que provocam a morte de células, e por hifas, que se desenvolvem no tecido morto (PRABHU; FILIPPI, 2006).

### **Ciclo de vida de *Pyricularia grisea***

O ciclo de vida de *P. grisea* inicia-se quando os conídios produzidos nas lesões são disseminados e entram em contato com a superfície das folhas de arroz . Os conídios são produzidos nas folhas de arroz quando a umidade do ar for superior a 93 %. A germinação dos conídios ocorre geralmente em água livre ou em condições de umidade que variam de 92 a 96 %. A intensidade da luz afeta negativamente o alongamento do tubo germinativo e a produção de esporos, por isso a liberação e a disseminação dos conídios ocorrem geralmente durante a noite (PRABHU; FILIPPI, 2006).

Os conídios disseminados pelo vento e depositados na superfície da folha são aderidos à folha pela liberação de um adesivo chamado de mucilagem, armazenada no ápice do esporo. A mucilagem tem como função, permitir a aderência do conídio em qualquer superfície, mesmo na água. A produção ótima de mucilagem depende da idade do isolado e da maturidade do conídio (PRABHU; FILIPPI, 2006). Logo após a aderência, os conídios iniciam a germinação com a emissão do tubo germinativo. Quanto ao tempo para a germinação do conídio, Prabhu; Filippi (2006), citam que inicia-se após 30 a 90 minutos de contato com a água, Bouret; Howard (1990) dentro de duas horas após contato com o hospedeiro e na presença de água livre, e Kato (1974) em até três horas após o contato com a folha úmida. Os conídios não são viáveis por mais de 4 horas expostos ao sol e por esta razão precisam aderir-se à superfície foliar o mais rápido possível (PRABHU; FILIPPI, 2006).

A superfície onde os conídios são depositados tem pouco efeito sobre a germinação, podendo germinar mesmo em suspensão de água (LEE; DEAN, 1993). O tubo germinativo é produzido pela célula basal ou pela célula apical, raramente pela célula mediana (PRABHU; FILIPPI, 2006).

O apressório é uma estrutura vegetativa desenvolvida por vários fungos para romper a superfície foliar do hospedeiro. Sua formação ocorre pelo inchaço no ápice do tubo germinativo (LENGELER et al., 2000).

Os apressórios variam em forma e tamanho, apresentando em geral, de 5 a 15 micras em diâmetro e formas que variam entre globosas, ovóides ou oblongas. Cada célula do conídio contém um núcleo. Uma delas dá origem ao tubo germinativo. Enquanto o tubo germinativo alonga-se, simultaneamente, o núcleo desta célula submete-se a uma divisão mitótica. Um núcleo permanece no conídio e o outro é transferido para o futuro apressório, o qual separa-se do tubo germinativo através da formação de um septo. A parede celular do apressório imaturo começa a engrossar-se através da deposição de uma camada de melanina. O apressório adere à superfície, utilizando uma camada grossa de material adesivo que parcialmente infiltra na cutícula, abaixo do apressório imaturo. Este processo completa-se com a emergência da estrutura de penetração “peg”, que rompe a cutícula e entra na epiderme da folha de arroz. A camada de melanina que é depositada sobre a parede celular do apressório em formação é considerada essencial para o processo de penetração. O apressório quebra mecanicamente a cutícula das folhas de arroz, evento que necessita de elevada pressão de turgor interna para a penetração durante a patogênese (PRABHU; FILIPPI, 2006).

A penetração ocorre diretamente na epiderme da folha do hospedeiro, logo após a formação do apressório, que exerce força mecânica gerada pela atividade enzimática das

reservas acumuladas no conídio (HOWARD, 1994). A estrutura de penetração rompe a cutícula da planta, atravessa a parede celular da epiderme e forma a hifa de infecção. Esta, por sua vez, dá origem a hifas secundárias e subseqüentes dentro das células da epiderme e do mesófilo, resultando na colonização do tecido invadido e na formação das lesões (PRABHU; FILIPPI, 2006).

As lesões nas folhas de arroz, visíveis 72 horas após a inoculação, crescem em tamanho e número até coalescerem. Em 144 horas e sob condições de alta umidade, começam a produzir esporos em abundância, os quais são liberados e dispersos pelo vento, fornecendo o inóculo para um ciclo de infecção subseqüente (PRABHU; FILIPPI, 2006).

### **Sintomatologia**

A brusone ocorre desde o estágio de plântula até a fase de maturação da cultura. De acordo com Teng et al. (1991), durante os estágios de crescimento as lesões são principalmente formadas nas folhas, e após a emissão das panículas, o patógeno infecta a panícula ou a sua haste (“pescoço”).

Os sintomas nas folhas iniciam-se com a formação de pequenas lesões necróticas, de coloração marrom, que evoluem, aumentando de tamanho, tornando-se elípticas, com margem marrom e centro cinza ou esbranquiçado. Em condições favoráveis, as lesões coalescem, causando a morte das folhas e, muitas vezes, da planta inteira (PRABHU et al., 2002).

Infecções em outras partes da planta incluem aurícula e lígula da folha bandeira e nós do colmo, que apresentam manchas de cor marrom, principalmente em arroz irrigado (PRABHU; BEDENDO, 1995). Os sintomas nos nós e entrenós, mais comuns em cultivares suscetíveis, aparecem geralmente na fase de planta madura. A área infectada do nó torna-se escura, e a circulação da seiva na planta é interrompida, causando o acamamento da planta ou a quebra do colmo no ponto do nó infectado. A infecção no primeiro nó, abaixo da panícula, é referida como brusone no pescoço (FILIPPI; PRABHU, 1998). Nas panículas, a doença pode atingir o ráquis, as ramificações e o nó basal, estas se apresentam esbranquiçadas, sendo facilmente identificadas no campo. Pode ocorrer quebra da panícula na região afetada, caracterizando o sintoma conhecido como “pescoço quebrado”. Os grãos, quando atacados, apresentam manchas marrons localizados nas glumas e glumelas, as quais são facilmente confundidas com manchas causadas por outros fungos (FUNK et al., 2011). A brusone afeta também todas as ramificações dos cachos, provocando a formação de grãos chochos nas partes atacadas (PRABHU; BEDENDO, 1995).

## 2.4 Controle biológico e o uso de antagonistas

O termo controle biológico pode ser descrito como a influência de um organismo, o antagonista, sobre outro, o patógeno, causando uma diminuição da quantidade de inóculo ou dos efeitos provocados por esse último em determinada planta hospedeira. O biocontrole é, portanto, composto por três agentes: o patógeno, a planta hospedeira e o antagonista, estando esses três componentes sob influência do meio ambiente. O antagonista é um agente biológico com potencial para interferir nos processos vitais de fitopatógenos (MARIANO, 2000).

Segundo Mariano (1993) um programa de controle biológico é embasado na seleção de microorganismos antagônicos, que pode ser realizada *in vitro* ou *in vivo*. Romeiro (2007) ressalta que testes *in vitro* não podem substituir *in totum* os testes *in vivo*, mas eles são extremamente úteis, não só para que se conheça a potencialidade antagonística dos organismos com os quais se trabalha, assim como para auxiliar no processo de seleção.

A utilização do teste *in vitro* para a seleção de isolados microbianos é uma etapa que não deveria ser desconsiderada. É possível, através deste ensaio avaliar centenas de microorganismos com a vantagem de permitir o acesso ao conhecimento do mecanismo de ação se este for relacionado à antibiose, parasitismo e competição (MARIANO, 1993). O ensaio *in vitro* abrevia tempo, espaço e custos. Porém, em muitos casos o desempenho de antagonistas em condições controladas não corresponde ao desempenho a campo. Isto pode estar relacionado ao fato de que dificilmente é usado mais que um isolado do patógeno nos testes *in vitro* e em casa de vegetação. A campo o potencial microbiano é submetido, além das condições variadas, a diferentes isolados dos patógenos. O sucesso de um bioagente resulta de uma seqüência de eventos que descortinarão diferentes atributos do microorganismo (ANDREWS, 1992).

Na seleção de microorganismos antagônicos *in vitro*, geralmente são testadas grandes populações, através de métodos qualitativos e quantitativos, sendo que para seleção de biocontroladores os métodos qualitativos são menos frequentemente utilizados que os quantitativos. Dentre os métodos quantitativos o método da cultura pareada ou pareamento é o mais comumente utilizado. O método da cultura pareada consiste em diversas formas de plaqueamento de antagonista e fitopatógeno em placa de Petri, contendo meio de cultura adequado ao crescimento de ambos os organismos (MARIANO, 1993).

Dentre os microorganismos antagonistas envolvidos no biocontrole, estão incluídos vários gêneros de bactérias, como por exemplo, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Rhizobium* (WELLER, 1988). Esses microorganismos podem ser encontrados em diferentes

partes da planta, podendo ser isolados de raízes ou regiões em torno delas (rizoplano e rizosfera, respectivamente), bem como nas folhas (filoplano) e no interior das plantas, sendo então classificados como microorganismos endofíticos (THOMSON, 1993).

O controle biológico exercido por um ou mais microorganismos, age reduzindo a intensidade de inóculo ou na capacidade de um patógeno incitar doença. Os mecanismos envolvidos são: parasitismo direto, predação, competição por nutrientes e nichos ecológicos, antibiose e produção de substâncias antibióticas e bacteriocinas, metabólitos ácidos ou tóxicos (todos incompatíveis com a vida do patógeno), competição trófica de elementos essenciais ao desenvolvimento do patógeno e pelo estímulo do hospedeiro por microorganismos não necessariamente antagonistas, ativando mecanismos de resistência antagonistas (ROMEIRO, 1995).

Para o controle biológico de doenças, as chances de obtenção de agentes antagonistas são maiores, quando os isolamentos são feitos a partir do ambiente onde serão usados. Assim, os originários do filoplano serão os mais adequados a esse ambiente. Entretanto, antagonistas de outros habitats podem ser empregados com sucesso. Vários estudos vêm sendo feitos sobre a seleção e o uso de antagonistas para o controle de doenças em culturas agrícolas (BETTIOL; KIMATI, 1989), destacando-se as espécies de bactérias do gênero *Bacillus* e de fungos do gênero *Trichoderma* (BETTIOL, 1997).

Vários microorganismos têm sido apontados como potenciais agentes de biocontrole, sendo eles os fungos *Trichoderma* spp., *Gliocladium roseum* Bainier, *Talaromyces flavus* (Klöcker) Stolk & Samson, *Pythium oligandrum* Drechsler, *Sporidesmium sclerotivorum* Uecker, W.A. Ayers & P.B. Adams, *Peniophora gigantea* (Fr.) Masee, *Ampelomyces quisqualis* Ces., *Penicillium* spp. e as bactérias *Bacillus subtilis* Ehrenberg, *Pseudomonas putida* Trevisan, *P. fluorescens* (Flügge) Migula, *Agrobacterium radiobacter* Smith & Townsend e *Streptomyces* spp. (MELO, 1998).

Romeiro et al. (2000), isolaram 129 bactérias residentes no filoplano de plantas sadias de tomateiro, não expostas previamente a pesticidas ou fertilizantes químicos e testaram quanto à sua potencialidade como agentes de biocontrole de doenças da mesma cultura. Utilizaram *Pseudomonas syringae* pv. tomato como patógeno modelo para a seleção massal. Três antagonistas foram selecionados e identificados. Os pesquisadores verificaram a eficiência dos antagonistas selecionados, no controle biológico experimental, em casa de vegetação, contra dois patógenos do tomateiro.

Segundo Kupper et al. (2003), dentre os antagonistas mais estudados atualmente, encontra-se a bactéria *Bacillus subtilis*, a qual vem se destacando no controle de doenças do

filoplano e em pós-colheita e, espécies do gênero *Trichoderma*, até mesmo no que se refere a fitopatógenos de parte aérea, quando aplicado em pulverizações.

## 2.5 Bactérias do gênero *Bacillus* como antagonistas

O gênero *Bacillus* compreende um grupo heterogêneo de bactérias quimiorganotróficas. São eubactérias Bacillaceae, geralmente Gram-positivas, formadoras de endósporos, aeróbias ou anaeróbias facultativas. Uma das suas principais características é a capacidade para produzir endósporos resistentes ao calor (MELO, 1998).

Por conta da grande resistência de seus esporos e da alta habilidade metabólica das células vegetativas, este gênero representa um dos grupos de microorganismos mais importantes comercialmente e, conseqüentemente, um dos mais estudados. *Bacillus* spp., por possuírem esporos de resistência, são adequadas para formulação e comercialização, podendo ser empregadas no tratamento de sementes, de parte aérea e também podem ser introduzidas no solo, para o controle de fitopatógenos e para a promoção de crescimento de plantas (MELO, 1998). O Antagonismo exercido por *Bacillus* contra fitopatógenos, pode ser direto com o envolvimento dos conhecidos mecanismos de antibiose, como síntese de substância antimicrobianas, a competição por espaço e nutrientes e a síntese de compostos voláteis, ou indireto envolvendo o fenômeno de resistência sistêmica induzida (LEELASUPHAKUL et al., 2008). O somatório destas características tem atraído grande interesse dos setores industriais (SCHALLMEY et al., 2004).

As espécies do gênero *Bacillus* são atualmente reconhecidas como produtoras de antibióticos, inseticidas, biosurfactantes, compostos químicos e enzimas (IVANOVA et al., 1999). Dentre as espécies de importância comercial, estão: *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. sphaericus*, *B. pumilis* e *B. brevis*. *Bacillus* spp. que podem secretar metabólitos comercialmente importantes como: enzimas amilolíticas, enzimas proteolíticas, antibióticos, muitos dos quais com atividades antifúngicas (MELO, 1998). Isolados de *B. subtilis* produzem uma grande variedade de metabólitos antifúngicos, entre os quais se encontram lipopeptídeos das famílias da surfactina, iturina e fengicina (ONGENA et al., 2005).

Quanto à indução de resistência sistêmica, moléculas sintetizadas por *B. subtilis* podem atuar como eliciadoras, proporcionando a sistemicidade da resposta de defesa contra patógenos (RYU et al., 2004; ONGENA et al., 2007). Como exemplo, Ongena et al. (2007) estudaram a síntese de lipopeptídeos da família das surfactinas e fengicinas, pelo isolado 168

de *B. subtilis*, que atuava no processo de ativação da indução de resistência sistêmica em plantas de feijão e tomate. Isso abre possibilidades para a investigação de novas moléculas, ou de um complexo, que estejam envolvidos na expressão de genes de defesa em plantas.

Outra característica das bactérias do gênero *Bacillus* é a promoção do crescimento de plantas, no caso de *B. subtilis*, este crescimento é consequência do aumento da fixação de nitrogênio, solubilização de nutrientes, síntese de fitormônios e melhoria das condições do solo. Além dos benefícios indiretos pela supressão deste ambiente contra microorganismos maléficos (MANJULA; PODILE, 2005). O gênero *Bacillus*, portanto, representa um grupo importante e bastante diversificado, com características de interesse em vários segmentos da biotecnologia (EICHLER, 2001).

Esses microorganismos apresentam grande plasticidade fisiológica no que se refere às condições de temperatura, pH e salinidade dos ambientes nos quais são encontrados, como água, solo, associadas às plantas, ambientes poluídos, sedimentos marinhos e etc. (ENCINAS et al., 1996). Possuem ainda um grande potencial para serem usadas como agentes de controle biológico, pois mantêm sua viabilidade quando estocadas por longos períodos (PETRAS; CASIDA, 1985).

Bactérias do gênero *Bacillus*, principalmente *B. subtilis*, além de componentes da população microbiana do solo, rizoplano e filoplano, apresentam características atrativas para os estudos de controle biológico de doenças de plantas (NORONHA et al., 1995).

Um ponto importante a ser considerado como determinante no uso do controle biológico é a persistência dos microorganismos controladores e reaplicações. Collins et al. (2003), considerando a dificuldade em desenvolver um biofungicida para doenças foliares devido às influências ambientais e com base nas hipóteses de colonização com um isolado de *Bacillus subtilis*, concluíram que, embora dependa de nutrientes, o crescimento da colônia de bactérias não é influenciado pela quantidade de nutrientes disponível e também não depende dela para sua agregação. Apesar de resultados positivos quanto ao antagonismo de *Bacillus* aos fungos fitopatogênicos, o controle das doenças não é satisfatório para todos os patossistemas e muitos devem ser testados no campo (SHODA, 2000).

O potencial antagônico de bactérias foi estudado em vários trabalhos de controle biológico de doenças em plantas. Ao verificar a inibição do crescimento micelial de *Pyricularia oryzae* por *B. subtilis*, Bettiol; Kimatti (1989) notaram que, com o aumento da concentração da solução ou “caldo”, onde os isolados de *B. subtilis* foram multiplicados, no meio de cultura, houve um aumento na porcentagem de inibição do crescimento micelial de *P. oryzae*, ocorrendo diferenças entre os isolados do antagonista.

Lazzaretti et al. (1994) estudando o antagonismo de *B. subtilis* aos principais patógenos associados às sementes, observaram a alta capacidade dos metabólitos produzidos por *B. subtilis* de inibirem os fungos patogênicos associados às sementes de feijão e trigo.

Ao verificarem o efeito de *B. subtilis* sobre a ferrugem do cafeeiro (*Hemileia vastatrix*), Bettioli et al. (1989) notaram que o controle foi efetivo 34 dias após a incubação, quando as células de *B. subtilis* foram pulverizadas 24 horas antes da inoculação do patógeno, sendo que alguns isolados apresentaram controle de 100 %. No entanto, a pulverização dos antagonistas 24 horas após a inoculação do patógeno não apresentou controle significativo.

Bettioli; Kimatti (1990) verificaram o efeito de *B. subtilis* sobre *P. grisea*, em plantas de arroz e relataram que esta bactéria possui grande potencial inibitório ao desenvolvimento micelial deste fungo.

Um estudo sobre a atividade antagonista de *Bacillus pumilus* sobre *Pyricularia grisea*, mostrou o efeito inibitório deste, sobre a germinação dos conídios e formação de apressórios de *P. grisea*, com uma taxa de inibição de 97 % da germinação dos conídios (XIANNING; MINGXING, 2002).

Kavitha et al. (2005), isolou e caracterizou parcialmente proteínas antifúngicas produzidas por *Bacillus polymyxa*, capazes de inibir o crescimento micelial de *Pyricularia grisea* e *Rhizoctonia solani*, ocasionando alterações morfológicas, dando origem a hifas inchadas e arredondadas, tendo a proteína apresentado termo-estabilidade e resistência à hidrólise. Analisando o biocontrole sobre esses mesmos patógenos do arroz, Leelasuphakul et al. (2006), obteve filtrados de compostos antifúngicos produzidos por *Bacillus subtilis*, que inibiram o crescimento micelial de *Pyricularia grisea* e *Rhizoctonia solani*, e se apresentaram termoestáveis; os filtrados esterilizados apresentaram maior atividade do que aqueles autoclavados, embora para *P. grisea* essa diferença tenha ocorrido apenas até o 3º dia de avaliação, ambos apresentando após isto, inibição de 100%.

Karthikeyan; Gnanamanickam (2008), testaram duas cepas de bactérias *Pseudomonas fluorescens* e duas cepas de *Bacillus polymyxa* contra 30 isolados de *M. grisea*, avaliando a inibição micelial do fungo em testes em laboratório e a supressão da Brusone da Setaria à campo, obtendo uma zona de inibição em 12 isolados de *Magnaporthe grisea*, que variaram de 2,5 a 3,0 cm de diâmetro e suprimindo a doença a campo em até 88,87 % com a mistura das quatro cepas, em até 86,64 %, como uma cepa de *B. polymyxa* e em 87,87 % com uma cepa de *P. fluorescens*.

Ao avaliar o efeito *in vitro* de cepas de *Bacillus thuringiensis* e proteínas Cry sintetizadas por eles, sobre fitopatógenos do arroz, *Rhizoctonia solani*, *Pyricularia grisea*,

*Fusarium oxysporum* e *F. solani*, Kanaak et al. (2007), observaram inibição do crescimento micelial destes fungos na presença das cepas, porém não houve halo de inibição ocasionado por proteínas Cry. Romeiro et al. (2010) demonstrou evidências da síntese de uma proteína por *Bacillus cereus* e sua atividade eliciadora de resistência contra o patógeno *Corynespora cassiicola* em folhas de tomateiro.

Em testes conduzidos por Tendulkar et al. (2007), uma molécula identificada como surfactina produzida pelo isolado *Bacillus licheniformis* BC98, inibiu o crescimento micelial de *M. grisea* em  $96,9 \pm 2,7$  %, provocando alterações morfológicas nas hifas, inibindo a germinação dos esporos e ocasionando formação anormal do tubo germinativo nos esporos germinados. Jia et al. (2011), obteve filtrados de *Bacillus subtilis*, com atividade antifúngica sobre *M. oryzae*, inibindo em até 67 % seu crescimento micelial e inibindo a formação do tubo germinativo com formação anormal dos apressórios.

Em um estudo para triagem e identificação de bactérias antagonicas a *Pyricularia grisea*, Zhang et al. (2011) identificou um isolado de *Bacillus subtilis* inibindo a brusone em mudas de arroz, com uma inibição de 69,4 %, demonstrando a eficácia dessa bactéria no biocontrole.

Existem alguns produtos à base de *Bacillus subtilis* sendo comercializados para fins de controle de doenças de plantas ou como condicionadores de solo no Brasil, entretanto, sem registro no MAPA. Os produtos Serenade<sup>®</sup> (*Bacillus subtilis* isolado QST 713) e Sonata<sup>®</sup> (*Bacillus pumilus* isolado QST 2808), produzidos pela Agrquest Inc., registrados no “Environmental Protection Agency” (EPA, 2008) dos Estados Unidos, estão sendo avaliados quanto à viabilidade no Brasil. O Serenade<sup>®</sup> é recomendado para mancha bacteriana, oídio e pinta-preta em tomate e pimentão; mofo-cinzento, oídio e podridão ácida em uva; oídio e crestamento gomoso em curcubitáceas; sigatoka negra em banana; antracnose em manga; podridão de *Sclerotinia* em alface; podridão de *Erwinia* em maçã e pêra e mofo- branco em feijão. O Sonata<sup>®</sup> é recomendado para oídio em tomate, pimentão, uva, curcubitáceas, morango, alface, maçã e pêra; pinta-preta e queima em tomate e míldio em curcubitáceas e alface (EDGECOM; MANKER, 2007).

**REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA**

- ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. 1163 p.
- AMARAL, H. M.; FURLAN, S. H.; MENTEM, J. O. Localização de *Drechslera oryzae*, *Rhizosporium oryzae* e *Trichoconiella padwickii* em sementes de arroz (*Oryza sativa* L.). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SEMENTES, 4, 1985, Brasília. **Resumos...** Brasília : Associação Brasileira de Tecnologia de sementes, 1985. p.118.
- ANDREWS, J.H. Biological control in the phyllosphere. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.30, p.603-635. 1992.
- ATLAS SOCIO ECONÔMICO RIO GRANDE DO SUL. ARROZ (2011). Disponível em: <<http://www.scp.rs.gov.br/atlas/atlas.asp?menu=264> >. Acesso em: 20 de agosto de 2011.
- BEDENDO, I. P. **Doença do arroz**. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. **Manual de fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**. São Paulo: Ceres, 1997. p.85-104.
- BETTIOL, W. **Biocontrole na Filosfera: problemas e perspectivas**. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.5, p.59-97, 1997.
- BETTIOL, W.; KIMATTI, H. Efeito de *Bacillus subtilis* sobre *Pyricularia oryzae* agente causal da brusone no arroz. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.25, p.1165 – 1174, 1990.
- BETTIOL, W.; KIMATTI, H. Seleção de microorganismos antagônicos a *Pyricularia oryzae* Cav. para o controle da brusone do arroz (*Oryza sativa* L.). **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.15, p.257 – 266, 1989.
- BETTIOL, W.; GALVÃO, J. A. H.; GHINI, R.; MENDES, M. D. L. Efeito de *Bacillus subtilis* sobre a ferrugem do cafeeiro (*Hemileia vastatrix*). **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 15, n. 1, p. 43, 1989.
- BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. (Ed.). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. 341 p.
- BOURETT, T.M., HOWARD, R.J. In vitro development of penetration structures in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Canadian Journal of Botanic**, v.68, p.329-42, 1990.
- COLLINS, D. P.; JACOBSEN, B. J.; MAXWELL, B. Spatial and temporal population dynamics of a phyllosphere colonizing *Bacillus subtilis* biological control agent of sugar beet *Cercospora* leaf spot. **Biological Control**, v. 26, p. 224-232, 2003.
- DEL VILLAR, P. M.; DUCOS, A.; FERREIRA, N. L. S.; PEREIRA, J. A.; YOKOYAMA, L.P.. **Cadeia produtiva do arroz no Estado do Maranhão**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2001. 136p.

EBBOLE, D. J. Magnaphorte as a model for understanding host-pathogen interactions. **Annual Review of Phytopathology**, v. 45, p.437-456, 2007.

EDGECOMB D.W.; MANKER D. C. Serenade (*Bacillus subtilis* strain QST713) and Sonata (*Bacillus pumilus* strain QST2808), new biological tools for integrated and organic disease control programs. **IX Reunião Brasileira sobre controle biológico de doenças em plantas**, São Paulo, Campinas, 2007. (Resumo)

EICHLER, J. Biotechnological uses of archaeal extremozymes. **Biotechnology Advances**. Oxford, v.19, p.261-278, 2001.

ENCINAS, J. P.; SANZ-GOMES, J.; GARCIA-LOPEZ, M. L.; GARCIA-ARMESTO, M. R.; OTERO, A. Evaluation of different systems for identification of *Bacillus* strains isolated from spanish fermented sausages. **Meat Science**. Barking, v.42, p.127-131, 1996.

EPA - Environmental Protection Agency (2008). Disponível em: <<http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/>>. Acesso em 23 de ago de 2011.

FAO (2011). Rice Market Monitor. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/014/am721e/am721e00.pdf>> Acesso em: 10 de ago de 2011.

FAO. Statistical databases (2006). Disponível em: <http://www.fao.org>. Acesso em: 12 de ago de 2011.

FAO. International year of Rice (2004). Disponível em: <[http://www.fao.org/rice2004/es/index\\_es.htm](http://www.fao.org/rice2004/es/index_es.htm)> Acesso em: 22 de ago de 2011.

FERRAZ JÚNIOR, A. S. S. de L. **Estudo do teor de proteína e eficiência no uso de N em cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.)** 1993. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1993.

FERREIRA, C.M.; SOUSA, I.S.F. de; VILLAR, P.M. del(eds.). **Desenvolvimento tecnológico e dinâmica da produção de arroz de terras altas no Brasil**. Santo Antônio de Goiás(GO): Embrapa Arroz e Feijão, 118 p. 2005.

FILLIPI, M. C.; PRABHU, A. S. Doenças do arroz e seu controle. In.: BRESEGHELLO, F.; STONE, L. F. **Tecnologia para o arroz de terras altas**. Santo Antonio de Goiás (GO): Embrapa Arroz e Feijão, 1998. p. 139 – 156.

FILLIPI, M. C.; PRABHU, A. S.; SILVA, G. B. (2004) Cultivo do Arroz Irrigado no Estado do Tocantins. Embrapa. Disponível em: <[http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Arroz/ArrozIrrigadoTocantins/doencas\\_metodo\\_controle.htm#bruosne](http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Arroz/ArrozIrrigadoTocantins/doencas_metodo_controle.htm#bruosne)>. Acesso em: 12 de julho de 2011.

FONSECA, J. R.; CASTRO, E. M. de; SILVEIRA, P. M. **Características botânicas e agrônômicas de cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.)**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2001. 41p.

FUNK, G.R.D.; ALVES, R.C.A.; DEL PONTE, E.M.(2008) Mancha parda do arroz. In: DEL PONTE, E.M. (Ed.) Fitopatologia. Net – herbário virtual. Departamento de Fitossanidade.

Agronomia, UFRGS. Disponível em: <<http://www6.ufrgs.br/agronomia/fitossan/fitopatologia/ficha.php?id=5>>. Acesso em: 20 de ago de 2011.

GALLI, J. Origem, distribuição e domesticação do arroz. **Lavoura Arrozeira**, Porto Alegre, v.31, n.307, p.63-68, 1978.

HOWARD, R. J. Cell biology of pathogenesis. In: ZEIGLER, R. S.; LEONG, S. A.; TENG, P. S. (Ed.). **Rice blast disease**. Wallingford: CAB International, 1994. P. 3-22.

IBGE (2011). Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/defaulttab.shtm>>. Acesso em: 20 de ago de 2011.

IVANOVA, E. P.; VYSOTSKII, M. V.; SVETASHEV, V. I.; NEDASHKOVSKAYA, O. I.; GORSHKOVA, N. M.; MIKHAILOV, V. V.; YUMOTO, N.; SHIGERI, Y.; TAGUCHI, T.; YOSHIKAWA, S. Characterization of *Bacillus* strains of marine origin. **International Microbiology**. Barcelona, v.2, p.267-271, 1999.

JIA, S.; ZENG, D.; WU, X.; TU, G.. Inhibitory of an Antifungal Protein Produced by *Bacillus subtilis* C-D6 against *Magnaporthe oryzae*. **Chinese Journal of biological Control**, v. 27, n. 3, 362-367, 2011.

KNAAK, N., ROHR, A.A. E FIUZA, L.M. In vitro effect of *Bacillus thuringiensis* strains and cry proteins in phytopathogenic fungi of paddy rice-field. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p.1-7, 2007.

KARTHIKEYAN, V.; GNANAMANICKAM, S.S.. Biological control of *Setaria* blast (*Magnaporthe grisea*) with bacterial strains. **Crop Protection**, v. 27, p. 263-267, 2008.

KAVITHA, S.; SENTHILKUMAR, S.; GNANAMANICKAM, S.; INAYATHULLAH, M.; JAYAKUMAR, R. Isolation and partial characterization of antifungal protein from *Bacillus polymyxa* strain VLB16. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 3236-3243, 2005.

KATO, H. Epidemiology of rice blast disease. **Review of Plant Protection**, v.7, p. 1-20. 1974

KENNEDY, G. et al. Nutrient impact assessment of rice in major rice-consuming countries. **International Rice Commission Newsletter**, v.51, p.33-42, 2002.

KIM, C. K. Blast management in high input, high potential temperature rice ecosystem. In: Zeigler, R.S., Leong, S.A. & Teng, P.S. (Eds.) **Rice blast disease**. Wallingford. CAB International. 1994. p.451-464.

KINGSOLVER, C. H., BARKSDALE, T. H.; MARCHETTI, M. A. **Rice blast epidemiology**. University Park: Pennsylvania State University, Bulletin, 853, 1984.

KUPPER, K. C.; FERNANDES, N. G.; GOES, A. Controle biológico de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.28, n.3, P. 251-257, 2003.

LAZZARETTI, E.; MENTEN, J.O.M.; BETTIOL, W. *Bacillus subtilis* antagonísticos aos principais patógenos associados a sementes de feijão e trigo. **Fitopatologia Venezuelana**. Maracay, n. 7, p. 42 - 46, 1994.

LEELASUPHAKUL, W.; SIVANUNSAKUL, P.; PHONGPAICHIT, S. Purification, characterization and synergistic activity of  $\beta$ -1,3-glucanase and antibiotic extract from an antagonistic *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 against rice blast and sheath blight. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, p.990–997, 2006.

LEELASUPHAKUL, W. et al. Growth inhibitory properties of *Bacillus subtilis* strains and their metabolites against the green mold pathogen (*Penicillium digitatum* Sacc.) of citrus fruit. Postharvest. **Biology and Technology**, v.48, p.113-121, 2008.

LEE, Y. H.; DEAN, R. A. Camp regulates infection structure formation in the plant pathogenic fungus *Magnaphorthe grisea*. **The Plant Cell**, Rockville, v. 5, n. 6, p. 693-700, 1993.

LENGELER, K. B.; DAVIDSON, R. C.; D'SOUZA, C.; HARASHIMA, T.; SHEN, W. C.; ANG, X.; AUGH, M. Signal transduction cascades regulation fungal development and virulence. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v.64, n. 4, p. 746-785, 2000.

LUZ, W.C. Micologia Avançada – Taxonomia de Fungos Anamórficos – I Hifomicetos. Revisão Anual de Patologia de Plantas, Passo Fundo, v.3A, 2011.

MALAVOLTA, V.M.A.; AZZINI, L.E.; BASTOS, C.R.; SALOMON, M.V.; CASTRO, J.L. Progresso da brusone nas folhas e panículas de genótipos de arroz de terras altas. **Summa Phytopathologica**, v.34, n.2, p.186-188, 2008

MANJULA, K.; PODILE, A.R.. Increase in seedling emergence and dry weight of pigeon pea in the field with chitin-supplemented formulations of *Bacillus subtilis* AF 1. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.21, p.1057–1062, 2005.

MARIANO, R. L. R. **Manual de Práticas em Fitobacteriologia**. UFRPE: Recife, 2000. 171p.

MARIANO, R.L.R. Métodos de seleção *in vitro* para o controle microbiológico de patógenos de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.1, p.369-409, 1993.

MELO, I. S. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: MELLO, I. S.; AZEVEDO, J. L.(Ed.). **Controle biológico**. Jaguariúna: EMBRAPA, v. 1, 264p., 1998.

MENDES, M. A. S.; SILVA, V. L.; DIANESE, J. C.; FERREIRA, M. A. S.; SANTOS, C. E. N.; NETO, E. G.; URBEN, A. F.; CASTRO, C. **Fungos em plantas no Brasil**. Brasília: Embrapa-Cenargen. 1998. 569p.

MENEZES, M.; OLIVEIRA, S. M. A. **Fungos Fitopatogênicos**. Recife: UFRPE, Imprensa Universitária, 1993.

NORONHA, M.A., MICHEREFF, S.J., MARIANO, R.L.R. Efeito do tratamento de sementes de caupi com *Bacillus subtilis* no controle de *Rhizoctonia solani*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.20, n.2, p.174-178, 1995.

ONGENA, M.; DUBY, F.; JOURDAN, E.; BEAUDRY, T.; JADIN, V.; DOMMES, J.; THONART, P. *Bacillus subtilis* M4 decreases plant susceptibility towards fungal pathogens by increasing host resistance associated with differential gene expression. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.67, 692-698, 2005.

ONGENA, M.; JOURDAN, E.; ADAM, A.; PAQUOT, M.; BRANS, A.; JORIS, B.; ARPIGNY, J.-L.; THONART, P. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. **Environmental Microbiology**, v.9, p.1084-1090, 2007.

OU, S.H. **Rice disease**. 2.ed. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1985, 380 p.

PEREIRA, J. A. **Cultura do arroz no Brasil: subsídios para a sua história**. Teresina: Embrapa Meio – Norte, 2002. 226 p.

PETRAS, S. F.; CASIDA, L. E. J. Survival of *Bacillus thuringiensis* spores in soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 50, p. 1496-1501, 1985.

PINHEIRO, B. da S. **Morfologia e crescimento da planta de arroz**. Goiânia: EMBRAPA/CNPAF, 1998. Não paginado. Palestra apresentada no I curso Internacional de Melhoramento Genético de Arroz, Goiânia, mar. 1998.

PRABHU, A. S.; BEDENDO, I.P. **Principais doenças do arroz no Brasil**. 3ed. Goiânia, Goiás: Embrapa/CNPAF, 1995.

PRABHU, A. S.; FILIPPI, M. C. C. **Controle genético, progresso e perspectivas**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2006. 388p.

PRABHU, A.S.; GUIMARÃES, C.M.; SILVA, G.B. **Manejo da brusone no arroz de terras altas**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2002. 6p. (Circular Técnica, 52).

ROMEIRO, R. da S. **Bactérias Fitopatogênicas**. Viçosa: UFV, 1995, 367p.

ROMEIRO, R. S. et al. Seleção de bactérias residentes de filoplano de tomateiro como agentes de biocontrole de enfermidades da parte aérea da cultura. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 26, p. 220-224, 2000.

ROMEIRO, Reginaldo da Silva. **Controle Biológico de Doenças de Plantas: Procedimentos**. Viçosa: Ed. UFV, 2007, 172p.

ROMEIRO, R. S.; LANNA FILHO, R.; MACAGNAN, D.; GARCIA, F. A. O.; SILVA, H. S. A. Evidence that biocontrol agente *Bacillus cereus* synthesizes protein that can elicit increased resistance of tomato leaves to *Corynespora cassicola*. **Tropical Plant Pathology**, v. 35, n.1, p. 11-15, 2010.

RYU, C.M.; FARAG, M.A.; HU, C.-H.; REDDY, M.S.; KLOEPPER, J.W.; PARE, P.W. Bacterial Volatiles Induce Systemic Resistance in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v.134, p.1017–1026, 2004.

SCHALLMEY, M.; SINGH, A.; WARD, O. P. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. **Canadian Journal of Microbiology**, Saskatoon, v. 50, p. 1-17, 2004.

SHODA, M. Review: Bacterial Control of Plant Diseases. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 89, n. 6, p. 515-521, 2000.

SILVA, M. P.; MAGALHÃES JÚNIOR, A. M; ANDRES, A.; FRANCO, D. F.; VILELA, F. A.; DODE, L. B.; SCHWANKE, A. M. L. Avaliação preliminar do rendimento industrial de híbridos de arroz irrigado em função da época de semeadura e da umidade na colheita. *In*: 1º Congresso da Cadeia produtiva de Arroz/ 7ª Reunião Nacional de Pesquisa de Arroz, Florianópolis, SC. Anais. 2002.

SOLIGO, E. A.; AZZINI, L. E.; VILELLA, O. V. Incidência de fungos e manchas em sementes de genótipos de arroz. *In*: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 37, 2004, Gramado. **Anais...** Brasília: SBF, 2004, p.204- 205.

TEIXEIRA, S. M.; ROBSON, D.; ALBUQUERQUE, J. M. **Agricultura de subsistência na produção de arroz**: experiência no Maranhão. Goiânia: Embrapa-CNPAP, 1991, 36 p.

TENDULKAR, S.R.; SAIKUMARI, Y.K.; PATEL, V.; RAGHOTAMA, S.; MUNSHI, T.K.; BALARAM, P.; CHATTOO, B.B. Isolation, purification and characterization of an antifungal molecule produced by *Bacillus licheniformis* BC98, and its effect on phytopathogen *Magnaporthe grisea*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, p. 2331–2339, 2007.

TENG, P.S.; KLEING-GEBLING, H.W.; PINNSCHIMIT, H. An analysis of the blast pathosystem to guide modeling and forecasting. *In*: **Rice blast modelin and forecasting**. International Rice Research Institute. Los Banos, Lacuna: Philippines. 1991. p.1-30.

THOMSON, J.A. Biological control of plant pests and pathogens: alternative approaches. *In*: CHET, Ian. **Biotechnology in plant disease control**. New York: editora Wiley-Liss, INC., p. 275-290,1993.

WALTER, M.; MARCHEZAN, E.; AVILA, L.A. Arroz: composição e características nutricionais. **Ciência Rural**, v.38, n.4, jul, 2008.

WEBSTER, R. K.; GUNELL, P. S. **Compendium of rice diseases**. Minnesota: APS Press. 1992.

WELLER, D. M. Biological Control of Soilborne Plant Pathogens in the Rhizosphere with Bacteria. **Annual Review of Phytopathology**. Palo Alto, v. 26, p. 379-407, 1988.

XIANNING, T.; MINGXING, Y. A study on the activity of antagonistic bacterium against pyricularia grisea. **ACTA Agriculture Universitatis Jaingxiensis**. Nanchang, v. 24, p. 24-26, 2002.

ZHANG, F.; LIU, Y.; YU, J.; NIE, Y.; LU, F.; LIU, Y.. Screening and identification of antagonistic bacteria against *Pyricularia grisea*. **Jiangsu Journal of Agricultural Sciences**, v. 27 (3), p. 505-509, 2011.

ZHOU, Z; ROBARDS , K.; HELLIWELL, S.; BLANCHARD, C. Composition and functional properties of rice. **International Journal of Food Science and Technology**, v.37, p.849-868, 2002.

## **CAPÍTULO II**

### **ANTAGONISMO DE ISOLADOS DE *Bacillus* SOBRE *Pyricularia grisea***

---

1                   **Antagonismo de isolados de *Bacillus* sobre *Pyricularia grisea***

2  
3                   Flávia Arruda de Sousa<sup>1,2</sup>; Antônia Alice Costa Rodrigues<sup>1,2</sup>

4   <sup>1</sup>Mestrado em Agroecologia - UEMA; <sup>2</sup>Laboratório de Fitopatologia - UEMA; Universidade  
5   Estadual do Maranhão, Cx. Postal 09, CEP:65054-970, São Luís, MA, e-  
6   mail:aacrodriques@bol.com.br; alicecosta@cca.uema.br; flaviaarruda@ifma.edu.br

7                   (Aceito para publicação em   /   /   )

8  
9   Autora para correspondência: Flávia Arruda de Sousa

10 \_\_\_\_\_  
11   SOUSA FA, RODRIGUES AAC (2011) Antagonismo de *Bacillus* sp. sobre *Pyricularia*  
12   *grisea*. Fitopatologia Brasileira.

**13 RESUMO**

14 O potencial de nove isolados de *Bacillus* no controle de *P. grisea*, foi avaliado tanto em testes  
15 *in vitro* como *in vivo*. Nos testes *in vitro* se avaliou a inibição do crescimento micelial por  
16 pareamento e metabólitos e verificou-se a germinação dos conídios. Nos testes *in vivo*  
17 avaliou-se a ação desses isolados na diminuição da severidade da doença. A pulverização de  
18 *Bacillus* spp. nas folhas de arroz, foi realizada cinco dias antes da inoculação do patógeno e a  
19 avaliação foi realizada após oito dias. No pareamento, o isolado B22', propiciou a maior  
20 inibição (57,7 %) de *P. grisea*. No teste de metabólitos, foram os isolados B22', B12, B7, B41  
21 e B47, com inibições entre 88,87 % e 91,94 %. No teste de germinação de conídios todos os  
22 isolados promoveram germinação inferior à testemunha, exceto o isolado B47 após 2 horas de  
23 incubação. No teste *in vivo* os isolados B41, B47, B12, B7 e B22' permitiram a menor  
24 severidade da doença, com uma redução de 50 a 80 % da área foliar afetada em relação à  
25 testemunha. Os resultados confirmaram o potencial antagonista de *Bacillus* spp. e  
26 possibilitaram identificar alguns mecanismos da interação *P. grisea* x *Bacillus* spp.

27

28 **Palavras-Chave:** Biocontrole, Brusone do Arroz, *Oryza sativa*

29 **ABSTRACT**30 **Antagonism of *Bacillus* isolates against *Pyricularia grisea***

31 The potential of nine *Bacillus* isolates in the control of *P. grisea* was evaluated both at *in vitro*  
32 and *in vivo* tests. In *in vitro* tests we evaluated the inhibition of mycelial growth by pairing  
33 and metabolites, and there was a conidial germination. In *in vivo* tests evaluated the action of  
34 these isolated in the decrease in severity of the disease. The spraying of *Bacillus* spp. in rice  
35 leaves was performed five days before to pathogen inoculation and evaluation was performed  
36 after eight days. In pairing, was the isolated B22' we provided the greatest inhibition (57.7 %)   
37 of *P. grisea*. In the test of metabolites were isolated B22', B12, B7, B41 e B47, with  
38 inhibitions between 88.87 % and 91.94 %. In the conidial germination test all the isolates  
39 promoted inferior germination of conidia than the control, except the isolated B47 after 2  
40 hours of incubation. In *in vivo* test isolated B41, B47, B12, B7 and B22' allowed for less  
41 severe disease with a reduction from 50 to 80 % leaf area affected in relation to the control.  
42 The results confirmed the antagonist potential of the *Bacillus* spp. and made it possible to  
43 identify some mechanisms of the interaction *P. grisea* x *Bacillus* spp.

44

45

46 **Key words:** Biocontrol, Blast of rice, *Oryza sativa*

47

## 48 INTRODUÇÃO

49

50 O arroz (*Oryza sativa* L.) é um dos cereais mais produzidos e consumidos no mundo,  
51 caracterizando-se como principal alimento para mais da metade da população mundial. Sua  
52 importância é destacada, principalmente em países em desenvolvimento, tais como o Brasil,  
53 desempenhando papel estratégico em níveis econômico e social (Walter, 2008).

54 Segundo o IBGE, em 2011 o Brasil apresentou uma produção de 13,35 milhões de  
55 toneladas de arroz com casca, com uma área colhida de 2,7 milhões de ha e um rendimento  
56 médio de 4.856 kg/ha.

57 A rizicultura é praticada em todos os estados brasileiros, sendo o Rio Grande do Sul o  
58 maior produtor nacional (66,5 % da produção), seguido de Santa Catarina (7,3 % da  
59 produção) e do Maranhão (5,2 % da produção) (IBGE, 2011). A renda e a importância  
60 econômica e social diferem de acordo com as condições agro-climáticas e a tradição da  
61 cultura na região (Ferreira et al., 2005). Segundo Del Villar et al. (2001), em relação aos  
62 outros estados orizícolas do Brasil, o Maranhão apresenta vantagens agroecológicas e uma  
63 situação geográfica favorável, na perspectiva do abastecimento do mercado interno e regional.

64 A produtividade do arroz é afetada por diversos fatores, encontrando-se entre eles as  
65 doenças fúngicas que podem causar redução no rendimento da cultura, na qualidade  
66 fisiológica e sanitária da semente (Dallagnol, 2006). A brusone do arroz, causada pelo fungo  
67 *Pyricularia grisea* (Cooke) Saccardo [teleomorfo *Magnaporthe grisea* (Hebert) Barr], é uma  
68 das doenças mais destrutivas e está amplamente disseminada em todas as regiões do mundo  
69 onde o arroz é cultivado (Malavolta et al., 2008).

70 O controle químico é o mais utilizado no controle da Brusone, no entanto, a ausência  
71 de especificidade e os riscos para a saúde humana e para o ambiente apresentados pelos

72 defensivos agrícolas sintéticos acentuam a necessidade de ferramentas como o controle  
73 biológico na otimização dos sistemas de agricultura sustentável (Batista Junior et al., 2002).

74 Os gêneros de bactérias antagonistas de maior prevalência no controle biológico são as  
75 *Pseudomonas* do grupo fluorescentes (*P. putida* e *P. fluorescens*), *Bacillus* spp., *Streptomyces*  
76 spp. e representantes da família Enterobacteriaceae (Campos Silva et al., 2008). Em especial,  
77 o gênero *Bacillus* se destaca por formar endósporo e apresentar uma multiplicidade de  
78 mecanismos antagônicos. Possibilitando dessa forma, a sua longa manutenção e sobrevivência  
79 em nichos ecológicos específicos, com grande versatilidade nos mecanismos de ação para  
80 driblar as defesas dos fitopatógenos (Lanna Filho et al., 2011)

81 Vários pesquisadores têm relatado os efeitos antagônicos de bactérias do gênero  
82 *Bacillus*, sobre o agente causal da brusone do arroz, entre eles, Bettioli & Kimatti (1989),  
83 Kavitha et al. (2005), Tendulkar et al. (2007), Kanaak et al. (2007). Segundo Yao et al. (2006)  
84 *Bacillus subtilis* tem sido usado comercialmente para o biocontrole de enfermidades de  
85 plantas, assim como para aumentar a produtividade de culturas.

86 Com este trabalho objetivou-se avaliar o antagonismo *in vitro* e *in vivo* de *Bacillus* spp  
87 a *Pyricularia grisea*, avaliando-se o crescimento micelial, a germinação de conídios, a  
88 redução da severidade da brusone.

89

## 90 MATERIAL E MÉTODOS

### 91 Obtenção dos antagonistas e patógeno

92 Como antagonistas foram utilizados nove isolados de *Bacillus*, já selecionados no  
93 Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal do Maranhão – UEMA, oriundos de  
94 plantas de arroz de municípios maranhenses (São Luís, Arari, Pindaré-Mirim, Davinópolis,  
95 Grajaú, Miranda), caracterizados e identificados por Nascimento (2009), sendo eles: B7

96 (*Bacillus licheniformes*); B16 (*B. macerans*); B22 (*B. polymyxa*); B22' (*B. pentothenicus*);  
97 B35 (*B. pumilus*); B41 e B47 (*B. cereus*); B12 e B40 (*Bacillus* spp).

98 O isolado de *Pyricularia grisea* foi proveniente da EMBRAPA arroz e feijão/Goiânia-  
99 GO.

100

### 101 **Avaliação do antagonismo de *Bacillus* spp. a *Pyricularia grisea* in vitro**

102 Para estudo do efeito do antagonismo *Bacillus* spp. x *P. grisea* foram realizados três  
103 experimentos em laboratório, nos quais os isolados de *Bacillus* foram cultivados em meio de  
104 cultura BDA (Batata-Dextrose-Agar) por 24 - 48 horas e o isolado de *P. grisea*, foi cultivado  
105 em meio de cultura BDA por 14 (quatorze) dias.

106 No primeiro, para avaliação do efeito dos isolados de *Bacillus* sobre o crescimento  
107 micelial de *P. grisea*, utilizou-se o Método do Círculo onde, transferiu-se assepticamente para  
108 placas de Petri, contendo meio de cultura BDA, um disco de 6 mm de diâmetro de  
109 fitopatógeno *P. grisea*, colocando-o no centro da placa. Utilizando um bastão de vidro  
110 inoculou-se a bactéria, formando um círculo de aproximadamente 5 cm de diâmetro (Mariano,  
111 1993). A avaliação do crescimento micelial foi realizada no décimo quarto dia, com  
112 delineamento experimental inteiramente casualizado (nove Isolados de *Bacillus* +  
113 testemunha) e com cinco repetições.

114 No segundo, avaliou-se o efeito dos metabólitos produzidos pelos isolados de *Bacillus*  
115 sobre *P. grisea*. Utilizou-se o método para detecção qualitativa de antibióticos (MDA)  
116 adaptado de Kupper et al. (2003), foram acondicionadas porções de 200 ml de BD (Batata-  
117 Dextrose) em frascos de Erlenmeyer, e nestes foram transferidos discos de meio BDA  
118 contendo a bactéria. Os frascos permaneceram durante 15 dias, sem agitação, a uma  
119 temperatura de  $26 \pm 0,5$  °C, na presença de luz. Após esse período, foram adicionadas 3 g de  
120 ágar em cada frasco e estes foram autoclavados por 20 minutos a 120° C, o caldo agarizado

121 foi vertido em placas de Petri, de 9 cm de diâmetro. No centro das placas foram colocados  
122 discos de cultura do patógeno e estas foram mantidas por 14 dias a uma temperatura de  $26 \pm$   
123  $0,5^\circ\text{C}$ , na presença de luz, em câmara tipo BOD. A avaliação do crescimento micelial foi  
124 realizada no décimo quinto dia. O delineamento experimental adotado foi inteiramente  
125 casualizado, (nove isolados de *Bacillus* + testemunha), e com cinco repetições.

126 Nos dois experimentos a testemunha constou somente de *P. grisea* em BDA, onde  
127 cada placa constituiu-se em uma unidade experimental. A avaliação foi realizada medindo-se  
128 o diâmetro das colônias, em dois sentidos diametralmente opostos, com auxílio de uma régua  
129 milimetrada, definindo-se uma média para cada colônia, comparando com a testemunha. Os  
130 dados foram submetidos à Análise de Variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-  
131 Knott, utilizando-se o software SISVAR.

132 No terceiro experimento, avaliou-se a germinação dos conídios de *P. grisea*, adaptado  
133 de Barra et al. (2008). Uma alíquota de 50  $\mu\text{L}$  de uma suspensão de  $0,5 \times 10^5$  conídios/mL de  
134 *P. grisea* ajustada em câmara de Newbauer, foi misturada a uma alíquota de 50  $\mu\text{L}$  da  
135 suspensão dos isolados de *Bacillus*, ajustada no espectrofotômetro para  $\text{OD}_{540}=0,1$ . Como  
136 tratamento testemunha foi utilizada a mistura composta de 50  $\mu\text{L}$  de água destilada estéril +  
137 50  $\mu\text{L}$  da suspensão de conídios. Com o auxílio de uma micropipeta, transferiu-se os 100  $\mu\text{L}$ ,  
138 para uma lâmina de vidro, mantida em uma placa de Petri com papel filtro úmido, para  
139 favorecer a germinação dos conídios. A avaliação foi realizada após duas e quatro horas de  
140 incubação em lâminas distintas, contando-se os esporos totais e aqueles germinados,  
141 estimando-se o percentual de germinação em cada visualização ao microscópio. A contagem  
142 dos conídios foi realizada ao microscópio óptico na objetiva de 40x, cobrindo-se a lâmina  
143 com uma lamínula, com três visualizações em áreas distintas nos bordos das gotas. A  
144 testemunha foi utilizada como comparativo. O delineamento experimental foi inteiramente  
145 casualizado com esquema fatorial  $9 \times 2 + 1$  (nove isolados de *Bacillus* x avaliação +

146 testemunha), com três repetições. Os dados foram submetidos à Análise de Variância e as  
147 médias comparadas pelo teste de Scott-Knott, utilizando-se o software SISVAR.

148

#### 149 **Avaliação do efeito antagônico de *Bacillus* spp à Brusone do Arroz *in vivo***

150 O experimento foi conduzido em casa de vegetação na EMBRAPA arroz e  
151 feijão/Goiânia-GO. Foram utilizadas sementes de arroz da variedade Primavera e avaliou-se  
152 nove isolados de *Bacillus*, utilizados nos testes *in vitro*.

153 O ensaio consistiu na semeadura da variedade primavera previamente desinfetada  
154 (hipoclorito de sódio por 20 minutos) em bandejas plásticas, medindo 30x15x10 cm, contendo  
155 3 kg de solo adubado com 5 g de NPK (5-30-15), 1 g de sulfato de zinco e 3 g de sulfato de  
156 amônio. Foram feitos oito sulcos no solo em cada bandeja e seguiu-se com a semeadura em  
157 linha.

158 Após nove dias de plantio procedeu-se a inoculação dos isolados de *Bacillus*, através  
159 da pulverização da parte aérea das plantas, com concentração ajustada no espectrofotômetro  
160 para  $OD_{540} = 0,1$ , preparada previamente através da raspagem das colônias cultivadas em  
161 meio de cultura BDA. Cada isolado foi pulverizado em três bandejas. Após a colonização do  
162 antagonista por cinco dias, inoculou-se o patógeno desafiante *Pyricularia grisea*, através de  
163 pulverização da parte aérea das plantas com suspensão de  $3 \times 10^5$  conídios / mL, obtida  
164 através da raspagem das colônias e ajustada através de câmara de Neubauer. Após a  
165 inoculação de *P. grisea*, as plantas foram incubadas em uma bandeja de 24 x 10 cm<sup>2</sup> com 10  
166 cm de profundidade, onde foi mantido uma lâmina de água de aproximadamente 3 cm, cada  
167 três bandejas foram mantidas em gaiolas de plástico e alumínio, com abertura nos dois lados,  
168 utilizando-se uma cobertura de plástico para fechar a gaiola e manter a umidade, essa gaiola  
169 permaneceu fechada por 24 horas após inoculação, decorrido isto, descobriu-se a gaiola

170 durante o dia e cobria-se ao entardecer, no intuito de manter a temperatura sem grande  
171 variação. As temperaturas variaram entre 25 a 29 °C e alta umidade (> 80 %).

172 A avaliação foi realizada oito dias após a inoculação da *P. grisea* estimando a  
173 severidade através de escala de 10 graus (0; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16; 32; 64; e 82 % de área foliar  
174 afetada) de acordo com Notteghem (1981), avaliando-se quarenta plantas/bandeja. O  
175 delineamento estatístico adotado foi inteiramente casualizado, com nove tratamentos,  
176 constituídos de isolados de antagonistas, com três repetições, sendo que cada bandeja  
177 constituiu uma unidade experimental. A testemunha constou somente de plantas inoculadas  
178 com *P. grisea*. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas  
179 pelo teste de Scott-Knott, utilizando-se o software SISVAR.

180

## 181 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

182

### 183 **Antagonismo de *Bacillus* spp. a *Pyricularia grisea* in vitro**

184 No primeiro ensaio, onde se avaliou o efeito dos isolados de *Bacillus* sobre o  
185 crescimento micelial de *P. grisea*, todos os isolados promoveram inibição de *P. grisea*, cujo  
186 crescimento, diferiu significativamente em relação à testemunha e os isolados apresentaram  
187 inibitórias diferenciadas (Tabela 1).

188 O isolado B22' (*B. pentothenicus*), propiciou a maior inibição do crescimento  
189 micelial (57,7 %) de *P. grisea*, diferindo dos demais isolados. Seguido dos isolados, B41 (*B.*  
190 *cereus*) e B22 (*B. polymyxa*), apresentando respectivamente, 48,46 %, e 47,06 % de inibição  
191 ao décimo quarto dia.

192 Em testes conduzidos por Tendulkar et al. (2007), uma molécula identificada como  
193 surfactina produzida pelo isolado *Bacillus licheniformis* BC98, inibiu o crescimento micelial  
194 de *Magnaporthe grisea* em  $96,9 \pm 2,7$  %, provocando alterações morfológicas nas hifas.

195 Bettiol & Kimatti (1989), verificaram a inibição do crescimento micelial de *Pyricularia*  
196 *oryzae* por *B. subtilis*.

197 A atuação de bactérias deste gênero é relatada por Knox et al. (2000), que encontraram  
198 dois isolados de *Bacillus subtilis* com forte inibição contra fungos, como *Fusarium*  
199 *oxysporum*, e obtiveram dados que essa inibição se devia, também, à produção de compostos  
200 voláteis. Duffy et al. (2003) relataram atividade micolítica de enzimas sintetizadas por  
201 isolamentos de *B. subtilis* contra micélio e hifas de *Fusarium udum*. Whipps (2001) menciona  
202 que enzimas quitinolíticas (quitinases) produzidas por *Bacillus cereus* degradam hifas de  
203 *Rhizoctonia solani*. Vários pesquisadores, entre os quais Remuska & Pria (2007), Kupper et  
204 al. (2003), Ludwig & Moura (2007) têm desenvolvido estudos que demonstraram a eficiência  
205 dessas bactérias.

206 No segundo ensaio, onde se avaliou o efeito dos metabólitos produzidos pelos isolados  
207 de *Bacillus* à *P. grisea*, todos diferiram significativamente da testemunha. No entanto, os que  
208 apresentaram maior efeito inibitório foram B22', B12, B7, B41 e B47, apresentando  
209 respectivamente, 91,94 %, 91,82 %, 91,69 %, 91,56 % e 88,87 %, de inibições do  
210 crescimento micelial de *P. grisea* (Tabela 2).

211 O antagonismo observado se deu por antibiose. Kupper et al. (2003), cita que  
212 microorganismos que agem por antibiose, geralmente tem amplo espectro de ação, de forma  
213 que na inibição dos fungos a produção de substâncias tóxicas é mais efetiva do que qualquer  
214 outro mecanismo de ação envolvido. Um dos mecanismos de antibiose exercidos por *B.*  
215 *cereus* é a produção de dois antibióticos de largo espectro, zwittermicina e kanosamina (Silva  
216 et al., 2004).

217 Os resultados permitiram inferir que há efeito inibitório das substâncias  
218 antimicrobianas produzidas pelos isolados de *Bacillus*. Tendo em vista que as colônias  
219 bacterianas foram autoclavadas, observou-se que estas substâncias apresentaram termo-

220 estabilidade, e que o controle nesse caso, pode ocorrer sem a presença de células vivas do  
221 antagonista. Corroborando com esses resultados, Santos et al. (1998), testando *B. subtilis*  
222 contra *Puccinia psidii*, verificaram inibição de germinação de uredíniosporos, tanto em caldo  
223 natural como autoclavado, considerando a termoestabilidade dos metabólitos produzidos por  
224 *B. subtilis*, independente da presença de células vivas. Kavitha et al. (2005), isolou e  
225 caracterizou parcialmente proteínas antifúngicas produzidas por *Bacillus polymyxa*, capazes  
226 de inibir o crescimento micelial de *Pyricularia grisea* ocasionando alterações morfológicas  
227 das hifas, tendo a proteína apresentado termo-estabilidade e resistência à hidrólise.  
228 Leelasuphakul et al. (2006), obteve filtrados de compostos antifúngicos produzidos por *B.*  
229 *subtilis*, que inibiram o crescimento micelial de *P. grisea* em até 100 % e se apresentaram  
230 termoestáveis.

231 A identificação da produção de metabólitos eficientes na inibição de *P. grisea*, é  
232 importante para a compreensão dos mecanismos antagônicos exercidos pelos isolados de  
233 *Bacillus*, bem como ferramenta que amplia as alternativas de controle, assim, além da  
234 utilização massal dos agentes biocontroladores, pode-se pensar na utilização das substâncias  
235 tóxicas produzidas por eles.

236 No terceiro ensaio, onde se avaliou o efeito antagônico dos isolados de *Bacillus* na  
237 germinação dos conídios de *P. grisea*, estes, apresentaram respostas inibitórias variáveis em  
238 relação ao tempo de avaliação e entre os diferentes isolados (Tabela 3). Na avaliação após 2  
239 horas de incubação, apenas o isolado B47 não diferiu da testemunha e os isolados B35, B41,  
240 B12, B7, B22', B22 permitiram o menor percentual de germinação. Na avaliação após 4 horas  
241 de incubação, todos os isolados diferiram da testemunha e os isolados B35, B41, B16 e B22'  
242 apresentaram o menor percentual de germinação.

243 Em relação ao tempo de incubação avaliado apresentaram diferenças significativas, a  
244 testemunha em água estéril, os isolados B40, B7, B22, com germinação superior na avaliação

245 após 4 horas de incubação e o isolado B16, que apresentou germinação inferior nesta em  
246 relação à avaliação de 2 horas de incubação.

247 A eficiência de bactérias do gênero *Bacillus* na inibição de esporos fitopatogênicos, foi  
248 demonstrada por Yoshida et al. (2001) que verificaram que a germinação de conídios de  
249 *Colletotrichum dematium* foi completamente inibida em folhas de amoreira tratadas com  
250 filtrado de cultura de *B. amyloliquefaciens*. Tendulkar et al. (2007), identificou uma surfactina  
251 produzida por *Bacillus licheniformis*, provocando inibição na germinação dos esporos de  
252 *Magnaporthe grisea* e ocasionando formação anormal do tubo germinativo nos esporos  
253 germinados.

254 Este mecanismo antagônico demonstra uma forma de atuação importante no controle  
255 do fungo *P. grisea*, onde há a necessidade de germinação do conídio, que se estabelece na  
256 superfície foliar para que haja infecção da planta de arroz.

257

#### 258 **Antagonismo de *Bacillus* spp. à brusone do arroz *in vivo***

259 Todos os isolados testados apresentaram diferença significativa em relação à  
260 testemunha, isto é, permitiram a redução da área foliar afetada nas plantas de arroz inoculadas  
261 com o patógeno *P. grisea*, refletindo assim uma diminuição na severidade da doença. Os  
262 isolados B41, B47, B12, B7 e B22' proporcionaram a menor severidade da doença, com uma  
263 redução de 50 a 80 % da área foliar afetada em relação à testemunha (Tabela 4).

264 Os resultados coincidiram com aqueles obtidos nos teste *in vitro*, onde no teste de  
265 metabólitos os isolados que permitiram melhor efeito inibitório foram os mais eficazes no  
266 teste em casa de vegetação. Este resultado reforça dados da literatura que citam a antibiose  
267 pela produção de substâncias tóxicas como um dos principais mecanismos antagônicos de  
268 bactérias do gênero *Bacillus*. Corroborando com os resultados encontrados, Karthikeyan &  
269 Gnanamanickam (2008) em experimento de campo, obtiveram uma redução de 86,64 % da

270 brusone da setaria, com um isolado de *Bacillus polymyxa*, além de inibir o crescimento  
271 micelial de *Magnaphorte grisea* em ensaios *in vitro*. Bettiol & Kimatti (1990), verificaram o  
272 efeito de *B. subtilis* sobre *Pyricularia grisea*, em plantas de arroz e relataram que esta bactéria  
273 possui grande potencial inibitório ao desenvolvimento micelial desse fungo. Bettiol & Várzea  
274 (1992), verificaram que suspensões de células de *B. subtilis*, esterilizadas ou não, pulverizadas  
275 24 h antes de inocular *Hemileia vastatrix*, reduziram a severidade da ferrugem em cafeeiros  
276 em casa de vegetação, no entanto, houve maior eficiência de controle quando se aplicaram  
277 células vivas do antagonista.

278 O isolado B41 apresentou o maior percentual de inibição da área foliar afetada por *P.*  
279 *grisea*, permitindo também uma baixa germinação dos conídios nos dois períodos avaliados, o  
280 que permite inferir que a inibição da germinação dos conídios foi fator importante para os  
281 resultados *in vivo*.

282 Embora as condições do experimento tenham sido favoráveis à *P. grisea*, e o  
283 desenvolvimento de bactérias antagonista sobre o filoplano seja um desafio no controle  
284 biológico (Kupper et al., 2003), houve eficiência da maioria dos isolados de *Bacillus* testados,  
285 sugerindo que estes encontraram condições apropriadas para seu desenvolvimento,  
286 provavelmente em virtude destes serem provenientes da própria filosfera do arroz.

287 Os efeitos antagônicos de *Bacillus* spp. à *P. grisea*, comprovam a potencialidade  
288 destes para um programa de controle biológico, com resultados apoiados tanto em testes *in*  
289 *vitro* como *in vivo*.

290 **REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA**

- 291 Barra VR, Romeiro RS, Ferraz HGM, Macagnan D, Silva HSA, Moura, AB, Halfeld-Vieira,  
292 BA, Mendonça HL, Vieira Júnior JR (2008) Potencialidade antagonística em alguns  
293 procariotas agentes de biocontrole de enfermidades de plantas. *Summa Phytopathologica*, 34  
294 (2): 121-126.
- 295 Batista Junior CB, Albino UB, Martines AM, Saridakis DP, Matsumoto LS, Avanzi MA,  
296 Andrade G (2002) Efeito fungistático de *Bacillus thuringiensis* e de outras bactérias sobre  
297 alguns fungos Fitopatogênicos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 37: 1189-1194.
- 298 Bettiol W, Kimatti H (1989) Seleção de microorganismos antagônicos a *Pyricularia oryzae*  
299 Cav. para o controle da brusone do arroz (*Oryza sativa* L.). *Summa Phytopathologica* 15: 257  
300 – 266.
- 301 Bettiol W, Kimatti H (1990) Efeito de *Bacillus subtilis* sobre *Pyricularia oryzae* agente causal  
302 da brusone no arroz. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 25: 1165 – 1174.
- 303 Bettiol W, Várzea VMP (1992) Controle biológico da ferrugem (*Hemileia vastatrix*) do  
304 cafeeiro com *Bacillus subtilis* em condições controladas. *Fitopatologia Brasileira* 17: 91-95.
- 305 Campos Silva JR, Souza RM, Zacarone AB, Silva LHCP, Castro MAS (2008) Bacterias  
306 endofíticas no controle e inibicao in vitro de *Pseudomonas syringae* pv. tomato, agente da  
307 pinta bacteriana do tomateiro. *Ciência e Agrotecnologia*, 32: 1062-1072.
- 308 Dallagnol LJ, Navarini L, Balardin RS, Gosenheimer A, Maffini AA (2006) Dano das  
309 doenças foliares na cultura do arroz irrigado e eficiência de controle dos fungicidas. *Revista*  
310 *Brasileira Agrociência* 12: 313-318.
- 311 Del Villar PM, Ducos A, Ferreira NLS (2001) Cadeia produtiva do arroz no Estado do  
312 Maranhão. Teresina: EMBRAPA Meio-Norte, 136p.
- 313 Duffy B, Schouten A, Raaijmakers JM (2003) Pathogen self-defense: mechanisms to  
314 counteract microbial antagonism. *Annual Review of Phytopathology* 41: 501-538.
- 315 Ferreira CM, Sousa ISF, Del Villar PM (eds.) (2005). Desenvolvimento tecnológico e  
316 dinâmica da produção de arroz de terras altas no Brasil. Santo Antônio de Goiás (GO):  
317 Embrapa Arroz e Feijão, 118 p.
- 318 IBGE (2011) Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. Rio de Janeiro, 24(7): 1-82.
- 319 Karthikeyan V, Gnanamanickam SS (2008) Biological control of *Setaria* blast (*Magnaporthe*  
320 *grisea*) with bacterial strains. *Crop Protection*, 27: 263-267.
- 321 Kavitha, S, Senthilkumar S, Gnanamanickam S, Inayathullah M, Jayakumar R (2005)  
322 Isolation and partial characterization of antifungal protein from *Bacillus polymyxa* strain  
323 VLB16. *Process Biochemistry*, 40: 3236-3243.

- 324 Knaak N, Rohr AA, Fiuza LM (2007) In vitro effect of *Bacillus thuringiensis* strains and cry  
325 proteins in phytopathogenic fungi of paddy rice-field. Brazilian Journal of Microbiology 38:1-  
326 7.
- 327 Knox OGG, Killham K, Leifert C, Atkinson D, Gollotte A, Harling R, Harrier LA, Hocart M  
328 (2000). Effects of increased nitrate availability on the control of plant pathogenic fungi by the  
329 soil bacterium *Bacillus subtilis*. Applied Soil Ecology 15: 227-231.
- 330 Kupper, KC, Fernandes NG, Goes A (2003) Controle biológico de *Colletotrichum acutatum*,  
331 agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. Fitopatologia Brasileira 28: 251-257.
- 332 Lanna Filho R, Ferro HM, Pinho RS (2010) Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*.  
333 Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas, 4(2):12.
- 334 Leelasuphakul W, Sivanunsakul P, Phongpaichit S (2006) Purification, characterization and  
335 synergistic activity of  $\beta$ -1,3-glucanase and antibiotic extract from an antagonistic *Bacillus*  
336 *subtilis* NSRS 89-24 against rice blast and sheath blight. Enzyme and Microbial Technology,  
337 38: 990–997.
- 338 Ludwig J, Moura AB (2007) Controle biológico da queima-das-bainhas em arroz pela  
339 microbiolização de sementes com bactérias antagonistas. Fitopatologia Brasileira 32:381–386.
- 340 Malavolta VMA, Azzini LE, Bastos CR, Salomon MV, Castro JL (2008) Progresso da  
341 brusone nas folhas e panículas de genótipos de arroz de terras altas. Summa  
342 Phytopathologica, 34(2):186-188.
- 343 Mariano RLR (1993) Métodos de seleção *in vitro* para o controle microbiológico de  
344 patógenos de plantas. In: Luz WC, Fernandes JM, Prestes AM, Picinini EC. Revisão Anual de  
345 Patologia de Plantas. Passo Fundo, pp. 369-409.
- 346 Nascimento IO (2009) Isolamento, identificação e seleção de *Bacillus* spp. para o biocontrole  
347 de fitopatógenos do arroz. Dissertação de mestrado, UEMA, Universidade Estadual do  
348 Maranhão. São Luis. MA.
- 349 Notteghem JL (1981) Cooperative experiment on horizontal resistance to rice blast. In:  
350 International Rice Research Institute (Los Baños, Filipinas). Blast and upland rice: report and  
351 recommendations from the meeting for international collaboration in upland rice  
352 improvement. Los Baños, pp. 43-51.
- 353 Remuska AC, Pria MD (2007) Efeito de *Bacillus thuringiensis* no crescimento de fungos  
354 fitopatogênico. Publicatio UEPG. Ciências Exatas e da Terra, Ciências Agrárias e  
355 Engenharias. 13: 31-36.
- 356 Santos CFC, Castro HA, Bettioli W, Angeli Júnior A (1998) Sensibilidade *in vitro* de  
357 urediniosporos de *Puccinia psidii* a *Bacillus subtilis*. Summa Phytopathologica. 24: 183-185.
- 358 Silva HAS, Romeiro RS, Macagnan D, Halfeld-Vieira BA, Baracat-Pereira MC, Mounter A  
359 (2004) Rhizobacterial induction of systemic resistance in tomato plants: non-specific  
360 protection and increase in enzyme activities. Biological Control 29: 288 – 295.

- 361 Tendulkar SR, Saikumari YK, Patel V, Raghotama S, Munshi TK, Balaram P, Chattoo BB  
362 (2007) Isolation, purification and characterization of an antifungal molecule produced by  
363 *Bacillus licheniformis* BC98, and its effect on phytopathogen *Magnaporthe grisea*. Journal of  
364 Applied Microbiology 103: 2331–2339.
- 365 Walter M, Marchezan E, Avila LA (2008) Arroz: Composição e características nutricionais.  
366 Ciência Rural 38: 1184-1192.
- 367 Whipps JM (2001) Roots and their environment: microbial interactions and biocontrol in the  
368 rhizosphere. Journal of Experimental Botany 52: 487-511.
- 369 Yao A, Bochow H, Karimov S, Boturov U, Sanginboy S, Sharipov A (2006) EFFECT OF  
370 FZB 24R *Bacillus subtilis* as a biofertilizer on cotton yields in field tests. Archives of  
371 Phytopathology and Plant Protection 39: 323-328.
- 372 Yoshida S, Hiradate S, Tsukamoto K, Hatakeda K, Shirata A (2001) Antimicrobial activity of  
373 culture filtrate of *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2 isolated from mulberry leaves.  
374 Phytopathology 91: 181-187.

Tabela 1. Avaliação da Inibição do crescimento micelial de *Pyricularia grisea* por isolados de *Bacillus* pelo método de pareamento, São Luís, 2011

Tratamento	Diâmetro da Colônia		Inibição
	(cm)		(%)
	14 dias		14 dias
Testemunha	7,14	a	-
B35 ( <i>Bacillus</i> sp)	4,76	b	33,33
B12 ( <i>Bacillus</i> sp)	4,72	b	33,89
B47 ( <i>B. cereus</i> )	4,04	c	43,42
B40 ( <i>Bacillus</i> sp)	4,24	c	40,62
B16 ( <i>B. macerans</i> )	4,30	c	39,78
B7 ( <i>Bacillus licheniformes</i> )	4,04	c	43,42
B41 ( <i>B. cereus</i> )	3,68	d	48,46
B22 ( <i>B. polymyxa</i> )	3,78	d	47,06
B22' ( <i>B. pentothenticus</i> )	3,02	e	57,70

Médias seguidas da mesma letra, não diferem entre si, pelo teste de Scott-knott, ao nível de 5 % de significância.

<sup>1</sup>CV= 14,42.

Tabela 2. Avaliação da Inibição do crescimento micelial de *Pyricularia grisea* por isolados de *Bacillus*, em teste com metabólitos, São Luís, 2011

Tratamento	Diâmetro da Colônia	Inibição
	(cm) 15 dias	(%) 15 dias
Testemunha	7,82 a	-
B40 ( <i>Bacillus</i> sp)	7,46 b	4,60
B22 ( <i>B. polymyxa</i> )	7,41 b	5,24
B16 ( <i>B. macerans</i> )	7,28 b	6,91
B35 ( <i>Bacillus</i> sp)	4,69 c	40,03
B47 ( <i>B. cereus</i> )	0,87 d	88,87
B41 ( <i>B. cereus</i> )	0,66 d	91,56
B7 ( <i>Bacillus licheniformes</i> )	0,65 d	91,69
B12 ( <i>Bacillus</i> sp)	0,64 d	91,82
B22' ( <i>B. pentothenticus</i> )	0,63 d	91,94

Médias seguidas da mesma letra, não diferem entre si, pelo teste de Skott-Knot, ao nível de 5 % de significância.

<sup>1</sup>CV= 10,11.

Tabela 3. Avaliação da germinação de conídios de *Pyricularia grisea* confrontados com isolados de *Bacillus*, São Luís, 2011

Tratamento	Conídios germinados (%)	
	2 horas	4 horas
Testemunha	65,8 Aa	81,7 Ba
B47 ( <i>B. cereus</i> )	56,4 Aa	46,6 Ac
B35 ( <i>Bacillus</i> sp)	37,1 Ac	25,7 Ad
B41 ( <i>B. cereus</i> )	23,7 Ac	30,8 Ad
B12 ( <i>Bacillus</i> sp)	32,7 Ac	46,0 Ac
B40 ( <i>Bacillus</i> sp)	43,2 Ab	62,5 Bb
B16 ( <i>B. macerans</i> )	49,0 Ab	30,0 Bd
B7 ( <i>Bacillus licheniformes</i> )	21,1 Ac	43,4 Bc
B22' ( <i>B. pentothenticus</i> )	32,6 Ac	35,9 Ad
B22 ( <i>B. polymyxa</i> )	33,0 Ac	50,3 Bc

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna e minúsculas nas linhas, não diferem entre si, pelo teste de Scott-knott, ao nível de 5 % de significância. CV=21,46.

Tabela 4. Avaliação da redução de área foliar afetada por *Pyricularia grisea* com a utilização de isolados de *Bacillus* como biocontroladores, São Luís, 2011.

<b>Tratamento</b>	<b>Médias (percentual de área foliar afetada)</b>	<b>Redução da área foliar afetada (%)</b>
Testemunha	34,75 a	-
B16 ( <i>B. macerans</i> )	24,51 b	29,5
B22 ( <i>B. polymyxa</i> )	24,45 b	29,5
B40 ( <i>Bacillus</i> sp)	22,86 b	34
B35 ( <i>Bacillus</i> sp)	19,71 b	43
B22' ( <i>B. pentothenticus</i> )	17,38 c	50
B7 ( <i>Bacillus licheniformes</i> )	12,79 c	63
B47 ( <i>B. cereus</i> )	12,14 c	65
B12 ( <i>Bacillus</i> sp)	10,23 c	70,5
B41 ( <i>B. cereus</i> )	6,96 c	80

Médias seguidas da mesma letra, não diferem entre si, pelo teste de Skott-knott, ao nível de 1 % de probabilidade. CV= 25,55.

## CONCLUSÃO GERAL

Os isolados de *Bacillus* apresentam respostas variáveis quanto à eficiência antagônica sobre *P. grisea*.

Nos testes *in vitro* todos os isolados de *Bacillus*, atuaram na inibição do crescimento micelial de *P. grisea*. Quanto a germinação dos conídios, todos ocasionaram germinação inferior a da testemunha nos dois períodos avaliados, exceto o isolado B47, na avaliação após 2 horas de incubação.

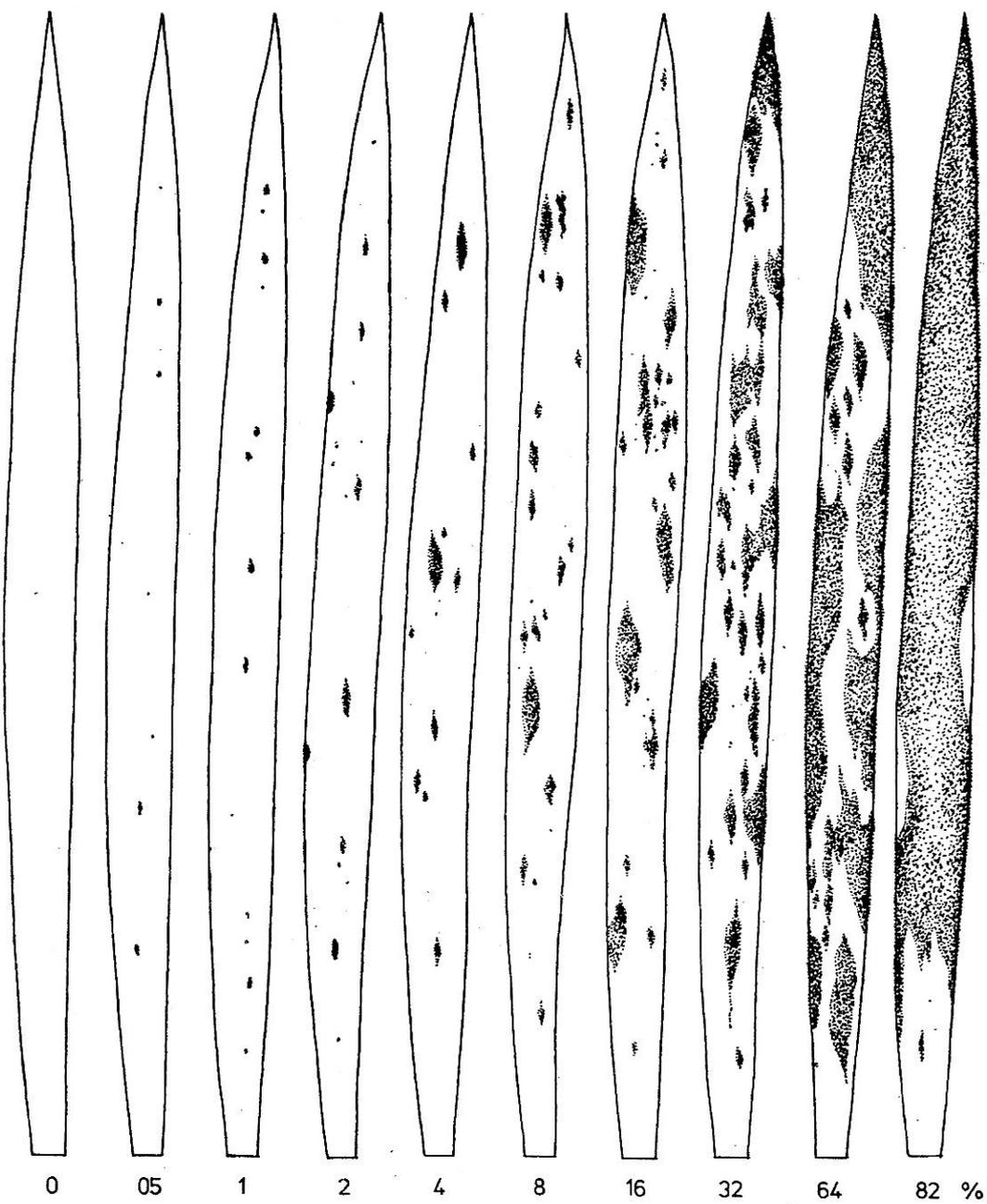
Os metabólitos produzidos pelos isolados de *Bacillus* se apresentaram termoestáveis.

No teste *in vivo*, todos os isolados apresentaram redução na severidade da doença, confirmando os resultados obtidos nos testes *in vitro*, comprovando o potencial biocontrolador de bactérias do gênero *Bacillus* sobre *P. grisea*.

Os isolados B41, B47, B12, B7 e B22', possibilitaram a menor severidade da doença.

## **ANEXOS**

---



Escala de severidade de 10 graus (Notteghem, 1981)

## **Tropical Plant Pathology**

### **NORMAS PARA PREPARO E SUBMISSÃO DE MANUSCRITOS**

#### **Escopo da Revista**

A revista **Tropical Plant Pathology** é um periódico internacional, de periodicidade bimestral, publicado pela Sociedade Brasileira de Fitopatologia. Tem como objetivo a publicação de resultados de pesquisa básica e aplicada sobre todos os aspectos da Fitopatologia. São recebidas contribuições das áreas de micologia, bacteriologia, virologia, nematologia, epidemiologia, interação planta-patógeno, genética de fitopatógenos, aspectos bioquímicos e moleculares de fitodoenças, doenças não infecciosas e de pós-colheita, e outros tópicos que tenham como objetivo o melhor entendimento ou a prevenção de doenças de plantas. Trabalhos sobre prospecção ou avaliação de produtos naturais e sintéticos ou sobre elementos de resistência a patógenos podem ser aceitos como artigo somente se apresentarem informações inéditas sobre o modo de ação ou mecanismos de resistência. Primeiros relatos de fitodoenças devem ser apresentados no formato ‘Comunicação’. A TPP não publica trabalhos que tem como objetivo exclusivo a avaliação de produtos.

#### **Política Editorial**

Embora **Tropical Plant Pathology** seja órgão oficial da Sociedade Brasileira de Fitopatologia, contribuições de membros e não-membros da Sociedade são bem vindas. É pré-requisito fundamental que manuscritos submetidos não tenham sido e nem serão publicados em outros periódicos. Com a aprovação do manuscrito para publicação, a Editora adquire plenos e exclusivos direitos sobre a matéria em todas as línguas e países. Incide custo somente para a produção de páginas coloridas. A pedido dos autores, separatas serão disponibilizadas em forma de arquivo pdf sem custo adicional. Manuscritos devem ser elaborados em língua inglesa. Por enquanto, manuscritos preparados em português ou espanhol ainda serão aceitos. Manuscritos considerados em consonância com o escopo da revista serão avaliados por um Editor de Seção e pelo menos dois revisores ad-hoc externos. A aceitação do manuscrito pelo Editor se baseia na qualidade do trabalho como contribuição original e substancial para a área e apresentação geral do manuscrito.

#### **Submissão de Manuscritos**

Manuscritos devem ser encaminhados por meio do sistema online, disponível na página do SciELO – Submission online <http://submission.scielo.br/index.php/tpp/index>. Sobre a submissão online não será cobrada a taxa de tramitação.

#### **Antes de submeter um manuscrito, os autores devem estar atentos que tem os seguintes itens em mãos:**

- a. uma carta de encaminhamento, onde se declara que (i) todos os autores concordam com a submissão do manuscrito; (ii) o manuscrito é original e que os resultados não foram apresentados ou publicados em outro periódico; (iii) que os autores transferem os direitos autorais à Sociedade Brasileira de Fitopatologia. Um autor para correspondência deve estar claramente indicado, ficando responsável por toda comunicação entre os autores e a Comissão Editorial.
- b. um arquivo contendo o texto do manuscrito, preparado de acordo com as normas de revista, as tabelas e legendas das figuras;
- c. arquivos suplementares, contendo uma figura cada, preparada em TIFF ou JPEG, alinhamentos de sequências de DNA, ou qualquer outro elemento pertinente ao processo.

A falta de qualquer elemento pode causar atrasos na tramitação ou devolução do manuscrito mesmo antes da revisão.

A Comissão Editorial aprecia os esforços envidados pelos autores para que o texto seja elaborado em linguagem correta antes da submissão.

## Formatos

### 1 Artigo Científico

O texto do manuscrito deve ser redigido em espaço duplo usando fonte 12 pt, impresso em papel A4 em um só lado, com margens de 2,5 cm, numeração contínua de páginas e linhas, começando pela primeira página, incluindo Agradecimento, Referências, Tabelas, Legendas e Apêndices.

Os seguintes elementos devem iniciar-se em uma nova página, na seqüência indicada:

a) A **página inicial** deve conter: um título conciso e informativo, de preferência com não mais de 150 caracteres com espaços; nome dos autores, sendo o primeiro e último sem abreviação; local de trabalho ou local da realização do trabalho, incluindo Departamento ou Setor, Instituição, CEP e cidade, estado e país; locais distintos devem ser indicados com numeração sobrescrita; nome do autor para correspondência, incluindo endereço de e-mail. O autor para correspondência é responsável pela leitura da prova tipográfica, o pagamento de ilustrações coloridas e qualquer outra tarefa inerente à correta tramitação do manuscrito.

b) O “**Abstract**” sumariza aspectos da metodologia, os principais resultados e conclusões do trabalho. Deve ser redigido em parágrafo único com não mais de 200 palavras, sem citações bibliográficas. Até seis palavras chave devem ser incluídas, diferentes de termos mencionados no título. Os manuscritos podem incluir também um título e Resumo em português. Todos os manuscritos redigidos em português ou espanhol incluem também um título e *Abstract* em inglês.

c) O **texto** deve ser redigido da forma mais sucinta e objetiva possível e inclui os seguintes elementos: Introdução - descrição do contexto que levou a condução do estudo; Material e Métodos – relata detalhes relevantes para a condução do estudo permitindo a sua repetição. Métodos da avaliação estatística devem ser explicados no final da seção; Resultados – deve-se evitar duplicação no texto e em tabelas. Comentários sobre o significado dos resultados procedem, entretanto a discussão mais aprofundada deve constar da seção Discussão; Discussão – resultados e descobertas do trabalho devem ser colocados no contexto com outras relevantes informações publicadas, perspectivas decorrentes do trabalho devem ser mencionadas e discutidas. Idéias e hipóteses de outras publicações não devem ser discutidas somente no intuito de incrementar a apresentação. Alguns manuscritos podem exigir um formato diferente em função de seu conteúdo.

Citações no texto devem indicar os sobrenomes dos autores e ano da publicação; quando o trabalho tiver dois autores cita-se o sobrenome de ambos, quando há três ou mais autores, cita-se o sobrenome do primeiro usando-se et al. Referências com a mesma citação devem ser listadas em ordem cronológica, referências com o mesmo ano de publicação devem ser listadas por ordem alfabética do sobrenome do primeiro autor. Trabalhos com o mesmo primeiro autor são listados em ordem cronológica, separados por vírgula (p.ex. Barreto et al., 2006a, 2006b, 2008). Somente trabalhos publicados ou no prelo devem ser citados. Quando se usa “Comunicação pessoal” ou “Dados não publicados”, todos os nomes devem ser citados com iniciais e sobrenome. Números: no texto, números de um a nove são escritos por extenso, exceto quando indicam datas, fração de decimal, porcentagem ou unidade de medida. A letra arábica é usada para números maior de nove. Deve-se evitar iniciar uma frase com número. URLs para programas, dados e outras fontes de informação da Web devem ser listados na seção Recursos da Internet (Internet Resources Section), imediatamente após da seção Referências Bibliográficas. URLs de citações bibliográficas de artigos publicados em periódicos eletrônicos, devem ser indicados na seção Referências Bibliográficas.

d) **Agradecimentos.** Único parágrafo inserido após a Discussão, que deve fazer referência a apoio financeiro, e contribuição técnica ou intelectual.

e) **Referências Bibliográficas** são listadas em ordem alfabética do sobrenome do primeiro autor. Referências com o mesmo primeiro autor são listadas conforme a seguir: primeiro, como único autor, em ordem cronológica; segundo, com somente um co-autor, em ordem alfabética de acordo com o sobrenome do co-autor e então, quando há dois ou mais co-autores, em ordem cronológica, independente do sobrenome dos co-autores. O título de periódicos é citado por extenso. Somente trabalhos publicados ou no prelo devem usados como referência. Artigos submetidos e em avaliação, não podem ser aceitos como referência. Os autores devem evitar a citação de Teses, Resumos ou Relatórios Técnicos, principalmente por questões de acessibilidade.

“Comunicação pessoal” ou “Dados não publicados” são citados somente no texto. “Comunicação pessoal” se refere a informações fornecidas por indivíduos que não são autores do trabalho; “Dados não publicados” se refere a dados gerados por pelo menos um dos autores do manuscrito em análise.

#### ***Artigo científico***

Reis RF, Goes A, Timmer LW (2006) Effect of temperature, leaf wetness, and rainfall on the production of *Guignardia citricarpa* ascospores and on black spot severity on sweet orange. *Fitopatologia Brasileira* 31:29-34.

Arnold AE, Medjía LC, Kyllö D, Rojas EI, Maynard Z, Robbins N, Herre EA (2003) Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 26:15649-15654.

#### ***Capítulo de livro***

Campos VP, Villain L (2005) Nematode parasites of coffee and cocoa. In: Luc M, Sikora RA, Bridge J (Eds.) *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture*. Wallingford UK. CAB International. pp. 529-580.

#### ***Livro de autor***

Agrios GN (2005) *Plant Pathology*. 5<sup>th</sup> Ed. Amsterdam. Elsevier Academic Press.

#### ***Livro editado***

Kimati H, Amorim L, Rezende JAM, Bergamin Filho A, Camargo LEA (Eds.) (2005) *Manual de Fitopatologia*. Vol. 2. *Doenças das Plantas Cultivadas*. 4<sup>a</sup>. Ed. São Paulo SP. Ceres.

#### ***Documento eletrônico***

CONAB. Cana-de-açúcar. Safra 2006 -2007.

[www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/BoletimCana-Novembro2006-07.pdf](http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/BoletimCana-Novembro2006-07.pdf)

Uma cópia da primeira página ou carta de aceitação deve ser enviada para cada artigo citado que não esteja publicado. Cópias de Comunicações pessoais também devem ser disponibilizadas, permitindo sua verificação.

f) **Recursos da Internet** indica os endereços (URL's) onde dados apresentados no trabalho são disponibilizados, programas de software e demais recursos da Internet utilizados na avaliação e processamento de informação. Na citação de bancos de dados, a data do acesso deve ser indicada.

Exemplo:

CoreNucleotides, [www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez) (Dezembro 12, 2007)

LEM Software, [http://dir.niehs.nih.gov/dirbb/weinbergfiles/hybrid\\_design.htm](http://dir.niehs.nih.gov/dirbb/weinbergfiles/hybrid_design.htm)

g) **Tabelas.** Cada tabela deve iniciar em uma nova página e receber um título conciso e informativo no cabeçalho. Um subtítulo deve ser indicado para cada coluna. Tabelas devem ser numeradas de acordo com sua citação no texto. Rodapés devem ser indicados com números sobrescritos, e redigidos logo abaixo da tabela. As tabelas devem ser inseridas após a seção Referências Bibliográficas.

h) **Figuras** são numeradas de acordo com sua citação no texto e devem ser formatadas conforme a largura das colunas da revista, aproximadamente. Gráficos e fotografias devem ser apresentados em formato TIFF ou JPEG, gravados em arquivos separados, no tamanho aproximado em que aparecerão na revista. Legendas são apresentadas em página própria, após a seção Referências Bibliográficas. Os autores devem inserir chaves e barra diretamente na figura. Deve-se evitar figuras que foram digitalizadas a partir de versões impressas. Para reprodução com qualidade na revista, imagens precisam ter resolução mínima de 300 dpi. Desenhos e gráficos necessitam resolução mínima de 600-1200 dpi. Essas resoluções se referem ao tamanho em que as ilustrações serão publicadas. Quando se prevê redução ou aumento, a resolução precisa ser ajustada. Ilustrações coloridas são aceitas, mas os autores devem assumir os custos.

i) **Nomenclatura** de nomes científicos deve seguir o padrão internacional atual, disponível para acesso público na Internet.

Plantas: *The International Plant Names Index*, [www.ipni.org/index.html](http://www.ipni.org/index.html)

Fungos: *Index Fungorum*, [www.speciesfungorum.org/Names/Names.asp](http://www.speciesfungorum.org/Names/Names.asp)

Bactérias: [www.isppweb.org/names\\_bacterial.asp](http://www.isppweb.org/names_bacterial.asp)

Nematóides: [www.iczn.org/iczn/index.jsp](http://www.iczn.org/iczn/index.jsp)

Vírus: International Code for Classification and Nomenclature, publicado no 8o. Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses - ICTV (2005).

Nomes científicos de gêneros, espécie e taxons infra-específicos devem ser impressos em itálico, na primeira citação no Resumo e no “Abstract” por extenso. As citações subseqüentes devem ser abreviadas no nível genérico. Na primeira menção no texto deverão ser escritos por extenso. A autoridade do nome científico de seres vivos deve ser citada no corpo principal do texto, na ocasião de sua primeira aparição, somente quando os organismos são objeto do estudo.

j) **Culturas e outro material de referência.** A origem e o depósito de culturas deve ser indicado. Os autores são incentivados a depositar material de referência (*vouchers*) de culturas e espécimes em coleções certificadas ou reconhecidas para fins de documentação de sua pesquisa, e indicar o local do depósito no texto.

k) **Sequências.** Números de acesso citados de Genbank ou outros bancos de dados precisam ser citados e disponibilizados para o público no momento da publicação do artigo.

l) **Acesso a dados.** Acesso a informação detalhada sobre dados e material usado para a realização de estudos citados deve ser facilitado.

m) **Abreviações e Unidades.** Unidades SI devem ser usados, como p. ex. mg, g, m, mm, L, mL, µL, h, min, s, mol, kg/ha. Uma abreviação para qual não há padrão, precisa ser definida por extenso em sua primeira menção.

n) **Defensivos agrícolas.** Deve-se utilizar apenas nomes técnicos ou princípios ativos. Não é recomendável a menção de nomes comerciais de produtos ou de empresas que os produzem e que sugira sua utilização. As fórmulas químicas devem ser escritas em uma linha e obedecer ao padrão de nomenclatura atual.

## 2 Comunicação

Destinado à publicação de resultados e observações que não justifiquem a publicação de um artigo completo. Não devem se basear em resultados meramente preliminares. Destina-se ainda à publicação de relatos originais de fitodoeças para o território brasileiro ou outros países. Registros novos para regiões ou estados da Federação são aceitos somente em casos específicos, como no caso de patógenos quarentenários, patógenos com alta especificidade em relação ao hospedeiro ou em plantas de valor comercial relevante. Esses manuscritos devem conter ilustrações do patógeno, indicação do depósito de material de referência de acesso público, de preferência no país de origem, depósito de seqüências de DNA e ser acompanhados da documentação exigida pela legislação específica, quando couber. Devem possuir 12 páginas ou menos, digitadas em espaço duplo em fonte 12, já incluindo referências. Todos os manuscritos incluem também um Resumo em português. Manuscritos redigidos em português ou espanhol incluem também um *Abstract* em inglês, não excedendo 200 palavras cada. O texto deve ser redigido em seqüência única, incluindo Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão. São aceitáveis até duas figuras e duas tabelas. O formato da primeira página e da seção Bibliografia segue o do Artigo.

## 3 Carta ao Editor

Relata ou responde a questões publicadas recentemente. A discussão de assuntos políticos, sociais ou éticos de interesse para fitopatologistas também é bem vinda.

## 4 Artigo de revisão

Artigos de revisão são bem vindos. Os autores devem consultar o Editor antes da submissão.

## Prova Tipográfica

A prova tipográfica será enviada ao autor para correspondência. Alterações maiores, que não representem erros cometidos durante a composição gráfica, sujeitam os autores ao pagamento de taxas. Comentários adicionados ao texto nessa fase exigem a aprovação do Editor. As provas devem ser devolvidas dentro de 72 horas.

## Separatas

Separatas são disponibilizadas sem custo na forma de arquivo pdf quando solicitadas.

## Autoria

Quem submete manuscritos para **Tropical Plant Pathology** deve respeitar a pesquisa de seus pares, evitando a desvalorização da co-autoria. Cada autor deve ter oferecido contribuição intelectual substancial quanto ao desenho, a condução, análise ou interpretação do estudo. Cada autor precisa aprovar a versão final do manuscrito a ser publicado e estar disposto a assumir publicamente responsabilidade por sua contribuição no trabalho. O primeiro autor, assim como o autor para correspondência, devem assumir responsabilidade pública para o trabalho na íntegra.

**Essas instruções podem ser consultadas também na página da revista <http://www.sbfito.com.br/tpp> ou do SciELO [www.scielo.org](http://www.scielo.org)**



- [HOME](#)
- [ABOUT](#)
- [USER HOME](#)
- [LINK TO TUTORIAL](#)
- [INSTRUCTIONS TO AUTHORS](#)

Home > [User](#) > [Author](#) > [Active Submissions](#)

## Active Submissions

ACTIVE		ARCHIVE			
ID	MM-DD SUBMIT	SEC	AUTHORS	TITLE	STATUS
TPP-425	10-05	ART	Sousa	ANTAGONISM OF BACILLUS ISOLATES AGAINST PRICULARIA GRISEA	Awaiting assignment

1 - 1 of 1 Items

**Start a New Submission**  
[CLICK HERE](#) to go to step one of the five-step submission process.

Tropical Plant Pathology Editorial Board Universidade Federal de Lavras POB 3065 37200-000 Lavras MG Brazil Tel.: +55 35 38291479 www.sbfpo.com.br/tpp

**USER**  
 You are logged in as  
**Flavia Arruda**  
[My Journal](#)  
[My Profile](#)  
[Log Out](#)

**AUTHOR**  
 Submissions  
[Active \(1\)](#)  
[Archive](#)  
[New Submission](#)

**NOTIFICATION**  
[View](#)  
[Manage](#)