

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

IVANEIDE DE OLIVEIRA NASCIMENTO

**ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E SELEÇÃO DE *Bacillus* spp PARA O
BIOCONTROLE DE FITOPATÓGENOS DO ARROZ.**

São Luís

2009

IVANEIDE DE OLIVEIRA NASCIMENTO

**ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E SELEÇÃO DE *Bacillus* spp PARA O
BIOCONTROLE DE FITOPATÓGENOS DO ARROZ.**

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^a. Dra. Antonia Alice Costa Rodrigues

São Luís

2009

Nascimento, Ivaneide de Oliveira

Isolamento, identificação e seleção de *Bacillus* spp. para o biocontrole de fitopatógenos do arroz / Ivaneide de Oliveira Nascimento. – São Luis, 2009.

109f.: il.

Dissertação (Mestrado) – Curso de Agroecologia, Universidade Estadual do Maranhão, 2009.

IVANEIDE DE OLIVEIRA NASCIMENTO

**ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E SELEÇÃO DE *Bacillus* spp PARA O
BIOCONTROLE DE FITOPATÓGENOS DO ARROZ.**

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.

Aprovada em 01 de abril de 2009

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Antonia Alice Costa Rodrigues (orientadora)

Doutora em Fitopatologia

Universidade Estadual do Maranhão

Prof. Gilson Soares da Silva (1^a examinador)

Doutor em Fitopatologia

Universidade Estadual do Maranhão

Prof^a. Adenilde Ribeiro Nascimento (2^a examinador)

Doutora em Microbiologia

Universidade Federal do Maranhão

A Deus, pelo imenso amor e proteção em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais, Ana e Genésio, especialmente a minha mãe, pela perseverança na luta.

Aos meus sogros, Juscelina e João, pelo apoio constante.

Ao meu esposo, Gilvan, pela força e por suportar a minha ausência.

Aos meus filhos, Ivanovick, Mahendra e Mohara, fonte inesgotável de inspiração e coragem para ir mais longe.

Aos meus amigos (as), por acreditarem, apoiarem e me incentivarem nesta nova etapa.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me dar força para perseverar e lutar todos os dias.

A Universidade Estadual do Maranhão, por meio da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Agroecologia, pela oportunidade e espaço concedido para a realização deste curso.

A minha Orientadora Professora Antonia Alice Costa Rodrigues, pela grande amizade, irmandade, apoio e disponibilidade na orientação, auxílio às técnicas e discussões fundamentais para a conclusão desta Dissertação.

A todos os professores do Curso de Mestrado, especialmente aos Professores Altamiro S. L. Ferraz Júnior, pelo incentivo para o meu ingresso no curso, Emanuel Gomes de Moura, Moisés R. Martins, pelo apoio durante o curso e Gilson Soares da Silva pela troca de idéias.

Aos pesquisadores da EMBRAPA arroz e feijão, Anne Sitarama Prabhu e Marta Cristina Corsi de Filippi, pela disponibilidade e estágio que me propiciaram mais conhecimentos e fundamentos para desenvolvimento da pesquisa.

Aos professores do departamento de Fitotecnia e Fitossanidade, especialmente José Ribamar Gusmão Araújo, Rosangela Malheiros, Ana Maria Araújo, Raimunda Nonata Lemos, Ester Azevedo e todos com os quais tive a oportunidade de conviver, mesmo que por pouco tempo.

Aos amigos Professores do Centro de Estudos Superiores de Imperatriz, especialmente Antonio Expedito F. Barroso, Vera Lúcia N. Dias, Elizabeth Fernandes, Joaquim Paulo Júnior, Denise Lima, Jorge Diniz, Ronaldo Farias, Gilvan de Sousa Nascimento pelo carinho, incentivo e o crédito dispensado a mim em mais esta conquista.

Aos amigos de turma pelas trocas de conhecimentos, experiências e afetividade.

A todos os funcionários, especialmente Marinilde, Floriza, Neto, Renato, Renê pela disponibilidade em ajudar-me sempre que solicitados.

Aos estagiários do Laboratório de Fitopatologia, em especial Aricleia, Leilson, Diogo, Adriana, Neto, Mônica, Nathalia e Leonardo, pela colaboração e companheirismo nos trabalhos.

A Flávia Arruda, companheira de projeto, pelas trocas de informações e boa convivência.

A Michela Costa, pela ajuda na instalação e coleta dos experimentos, que foi de grande valia.

Ao Químico João pela disponibilidade ao auxiliar o uso de equipamentos e trocas de idéias no Laboratório de Solos.

A Grande Amiga Iracy de Sousa Santos pelo apoio constante e fundamental na conquista de mais esse degrau em minha vida.

Ao agrônomo Reginaldo de Arari e todos os agricultores, pela garra no trabalho e disposição em nos auxiliar nas visitas de campo.

A Professora Adenilde Nascimento e André Martins da Universidade Federal do Maranhão, pela disposição e mais que isso, interesse na realização da identificação dos isolados de *Bacillus* spp.

A minha família pela paciência e manifestação de carinho e ajuda constante.

A todos que de forma direta ou indireta contribuíram para que eu pudesse chegar ao fim desta obra.

Aos professores de banca, pela disponibilidade, compreensão, análise e contribuições para o aperfeiçoamento e melhoria deste trabalho.

À todos meu muito obrigada.

*Todo mundo ama um dia, todo mundo
chora.*

*Um dia a gente chega, o outro vai
embora.*

*Cada um de nós constrói a sua
história e cada ser em si, carrega o dom
de ser capaz e ser feliz.*

*Hoje me sinto mais forte, mais feliz,
quem sabe, eu só levo a certeza de que
muito pouco eu sei.*

Almir Sater e Renato Teixeira

SUMÁRIO

	LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	x
	LISTA DE TABELAS.....	xi
	RESUMO	xii
	ABSTRACT	xiv
1	INTRODUÇÃO GERAL	16
1.1	Origem, importância econômica e social da cultura do arroz.....	18
1.2	Principais doenças do arroz.....	21
1.2.1	Brusone – <i>Pyricularia grisea</i> (Cooke) Saccardo.....	22
1.2.2	Mancha dos grãos (<i>Phoma</i> sp., <i>Dreschlera oryzae</i> , <i>Curvularia lunata</i> , <i>Alternaria</i> sp. , <i>Nigrospora oryzae</i> e <i>Fusarium</i> sp.).....	24
1.2.3	Mancha Parda – <i>Helminthosporium oryzae</i> Breda de Haan.....	26
1.2.4	Mal do colo- <i>Fusarium oxysporum</i>	28
1.2.5	Queima das bainhas – <i>Rhizoctonia solani</i> Kuhn.....	29
1.3	Manejo Biológico de doenças do arroz.....	31
1.4	Uso de <i>Bacillus</i> na agricultura.....	33
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36
	CAPÍTULO I – SELEÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DE <i>Bacillus</i> spp. NO CONTROLE DE <i>Pyricularia grisea</i>.....	45
	RESUMO.....	47
	ABSTRACT.....	48
	INTRODUÇÃO	49
	MATERIAL E MÉTODOS.....	50
	Isolamento de antagonistas do filoplano de plantas de arroz.	50
	Identificação de isolados de <i>Bacillus</i> spp.....	51
	Avaliação do antagonismo de <i>Bacillus</i> spp. a <i>Pyricularia grisea</i>	53
	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
	Resultados.....	55
	Discussão.....	56
	REFÊRENCIAS BIBLIÓGRAFICAS.....	60
	CAPÍTULO II – MICROBIOLIZAÇÃO DE SEMENTES DE ARROZ	

COM <i>Bacillus</i> spp NA REDUÇÃO DE PATÓGENOS.....	69
RESUMO.....	71
ABSTRACT.....	72
INTRODUÇÃO.....	73
MATERIAL E MÉTODO.....	74
Localização do experimento.....	74
Sanidade de sementes.....	75
Microbiolização de sementes de arroz variedade Bonança com <i>Bacillus</i> spp. para instalação de experimento <i>in vitro</i>	76
Microbiolização de sementes de arroz variedade Bonança com <i>Bacillus</i> spp. para instalação de experimento em casa de vegetação	76
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	77
Germinação e sanidade das sementes de arroz variedade Bonança.....	77
Avaliação da incidência e controle de fitopatógenos em sementes de arroz, pela microbiolização com <i>Bacillus</i> spp. em teste <i>in vitro</i>	79
Avaliação da incidência e controle de fitopatógenos em plantas de arroz, pela microbiolização com <i>Bacillus</i> spp.....	80
CONCLUSÕES	83
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84
CONCLUSÕES GERAIS.....	96
ANEXOS.....	98

LISTAS DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.1. Percentagem de cada espécie de <i>Bacillus</i> spp., obtidos a partir de amostras de folhas sadias de arroz, coletadas em municípios maranhenses. São Luís - MA, 2008.....	65
Figura 1.2. Comparação <i>in vitro</i> entre quatro métodos quanto ao antagonismo <i>Bacillus</i> spp. x <i>Pyricularia grisea</i> . Laboratório de Fitopatologia . São Luís - MA, 2008.....	67
Figura 2.1. Percentagem de germinação de sementes de arroz Bonança e incidência de patógenos nas sementes infestadas naturalmente e sem tratamento. São Luís - MA, 2008.....	88
Figura 2.2. Avaliação da incidência de patógenos em sementes e plantas de arroz variedade Bonança. São Luís - MA, 2008.....	89
Figura 2.3. Fungos detectados em sementes e plantas de arroz variedade Bonança. Laboratório de Fitopatologia – UEMA, São Luís - MA, 2008.....	90
Quadro 1.1. Resultados dos testes bioquímicos utilizados na identificação de <i>Bacillus</i> . São Luís - MA, 2008.....	63
Quadro 1.2. Identificação e origem e dos isolados de <i>Bacillus</i> obtidos a partir de amostras de folhas sadias de arroz, coletadas em municípios maranhenses. São Luís, 2008.....	64

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1.1 – Avaliação comparativa dos métodos de seleção <i>in vitro</i> por pareamento, para teste antagônico de <i>Bacillus pumilis</i> e <i>Pyricularia grisea</i> . São Luís - MA, 2008.....	66
Tabela 1.2 – Avaliação da inibição do crescimento micelial de <i>Pyricularia grisea</i> por <i>Bacillus</i> spp. São Luís - MA, 2008.....	68
Tabela 2.1 – Incidência de patógenos em sementes de arroz microbiolizadas com <i>Bacillus</i> spp., sete dias após a semeadura. São Luís – MA, 2008.....	91
Tabela 2.2 – Percentagem de controle de patógenos em sementes de arroz Bonança microbiolizadas com <i>Bacillus</i> spp., sete dias após a semeadura. São Luís - MA, 2008.....	92
Tabela 2.3 – Incidência de patógenos em plantas de arroz variedade Bonança, aos sete dias após a semeadura, a partir de sementes microbiolizadas com <i>Bacillus</i> spp. São Luís – Ma, 2008.....	93
Tabela 2.4 – Incidência de patógenos em plantas de arroz variedade Bonança, aos quatorze dias após a semeadura, a partir de sementes microbiolizadas com <i>Bacillus</i> spp. São Luís – MA, 2008.....	94
Tabela 2.5 – Percentagem de controle de patógenos em plantas de arroz variedade Bonança aos sete e 14 dias após a semeadura, a partir de sementes microbiolizadas com <i>Bacillus</i> spp. São Luís - MA, 2008.....	95

RESUMO

As doenças fúngicas, são um dos principais fatores que afetam a produtividade e rendimento na cultura do arroz, tanto no sistema irrigado quanto no de terras altas e várzeas. A utilização de espécies de *Bacillus* spp. como agentes de controle biológico, dentro de um manejo integrado, apresenta eficiência, além de segurança aos agricultores e ao meio ambiente. Portanto, objetivou-se com este trabalho obter e identificar espécies de *Bacillus* spp., oriundos de municípios maranhenses, avaliar o antagonismo *in vitro*, quanto ao crescimento micelial de *Pyricularia grisea*, e o efeito da microbiolização de sementes de arroz, variedade Bonança, na incidência e redução de fitopatógenos em sementes e plantas. Inicialmente, foram realizadas coletas de folhas sadias de arroz em plantios de dez municípios, possibilitando o isolamento de *Bacillus* spp. e a identificação através de testes bioquímicos. Foram realizados ensaios para seleção de um isolado padrão, para avaliar os métodos do Ponto, de Uma Risca Central, de Três Risca e do Círculo, sendo um escolhido para testar dezoito isolados quanto a inibição do crescimento micelial do patógeno. Nestes ensaios adotaram-se o delineamento experimental inteiramente casualizado. Posteriormente, avaliou-se a sanidade de semente de arroz variedade Bonança, em *Blotter Test* e o efeito da microbiolização com *Bacillus* spp., em solução salina com concentração ajustada em $OD_{540} = 0,5$, na incidência e redução de patógenos em sementes e plantas. A incidência e controle de patógenos nas sementes foi avaliada aos sete dias e em casa de vegetação aos sete e quatorze dias, utilizando 100 plantas/época. De acordo com os resultados foram obtidos vinte e um isolados distribuídos entre as espécies *B. licheniformes* (10 %), *B. polymyxa* (25 %), *B. macerans* (5 %), *B. lentus* (15 %), *B. pentotheticus* (15 %), *B. pumilus* (10 %), *B. cereus* (25 %) e *B. stearothermophilus* (5 %).

Os métodos de controle de crescimento micelial que apresentaram maior percentagem de inibição foram os métodos do Círculo e o de Uma Risca Central. O método do Círculo possibilitou a seleção de quinze antagonistas que promoveram maior inibição do crescimento micelial aos quatorze dias após o tratamento, variando de 53,54 % a 90,41 % de inibição. No teste de sanidade de semente de arroz variedade Bonança, observou-se maior incidência de *Curvularia oryzae* (70 %) e menor incidência de *Fusarium* sp. (1,6 %). A microbiolização das sementes com *Bacillus* spp. em *in vitro* proporcionou redução na incidência de *Curvularia oryzae* e *Aspergillus niger*. Em *in vivo* o controle de *Curvularia oryzae*, *Penicilium* sp. e *Scopulariopsis* sp. foi maior aos sete dias e para os fungos *Aspergillus niger* e *A. flavus* a redução foi maior aos quatorze dias após o tratamento das sementes.

Palavras-chave: arroz, patógenos, controle biológico, *Bacillus* spp..

ABSTRACT

Fungal diseases are one of the main factors that affect the productivity and performance in rice crops, not only in the irrigated rice system but also in the high lands and lowlands ones. The utilization of *Bacillus* spp. as biological control agents, inside an integrated management, presents efficiency, besides security to the farmers and the environment. Therefore, this research aimed obtains and identify *Bacillus* spp. from municipalities of Maranhão, evaluating the *in vitro* antagonism related to the mycelial growth of *Pyricularia grisea*, and the effect of seed microbiolization in rice seeds, Bonança variety, in the incidence and reduction of plant pathogens in seeds and plants. Firstly, it was collected healthy rice leaves in crops from ten municipalities, allowing the *Bacillus* spp. isolation and the identification through biochemical tests. Tests were made to select a standard isolate to evaluate the Point, One Central Streak and Circle methods, to choose one to test eighteen isolates as for inhibition of the pathogen mycelial growth. In those tests it was adopted the completely randomized experimental design. Subsequently, seed rice health, Bonança variety, was evaluated in Blotter Test and the effect of microbiolization with *Bacillus* spp., in saline solution with concentration adjusted in $OD_{540} = 0,5$, in the incidence and reduction of pathogens in seeds and plants. The incidence and control of pathogens in seeds were evaluated at seven days and in greenhouse at seven and fourteen days, using 100 plants/time. According to the results twenty-one isolates were obtained, distributed among the species *B. licheniformes* (10 %), *B. polymyxa* (25 %), *B. macerans* (5 %), *B. lentus* (15 %), *B. pentothenicus* (15 %), *B. pumilus* (10 %), *B. cereus* (25 %) e *B. stearothermophilus* (5 %). The mycelial growth control methods that presented greater percentage of inhibition were Circle and One Central Streak methods. The Circle method enabled the selection of fifteen antagonists which promoted greater inhibition of mycelial growth at fourteen days after the treatment, varying from 53,54% to 90,41% of inhibition. In the seed rice health test, Bonança

variety, a greater incidence of *Curvularia oryzae* (70 %) and a lower incidence of *Fusarium* sp. (1,6 %) were observed. The seed microbiolization *in vitro* with *Bacillus* spp. enabled reduction in the incidence of *Curvularia oryzae* and *Aspergillus niger*. *Curvularia oryzae*, *Penicilium* sp. and *Scopulariopsis* sp. control *in vivo* was greater at seven days after the seed treatment. To the fungi *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus* the reduction was greater at fourteen days after the seed treatment.

Key words: rice, pathogens, biological control, *Bacillus* spp.

1 INTRODUÇÃO GERAL

O arroz (*Oryza sativa* L.) é um dos cereais de maior consumo em todo mundo, possui características que lhe proporcionam ser um dos alimentos com melhor balanceamento nutricional, fornecendo 20 % da energia e 15 % da proteína per capita necessária ao homem. Sendo uma cultura extremamente versátil, que se adapta a diferentes condições de solo e clima, é considerada a espécie que apresenta maior potencial para o combate a fome no mundo, desempenha papel estratégico tanto no aspecto econômico quanto social (ALONÇO et al., 2005).

Esse cereal é cultivado em todos os estados brasileiro. Em 2002, foi cultivado em 70 % dos 5543 municípios do País (FERREIRA et al., 2002). Com duas regiões especializadas, uma no Rio Grande do Sul (Arroz irrigado) e outra ao longo de um arco que vai de Mato Grosso ao Maranhão (THÉRY & MELLO, 2005). Estima-se que 90 % do arroz produzido no Maranhão são oriundos do sistema de terras altas (FERRAZ JÚNIOR, 1993), cuja produção representou 43 % do total do arroz produzido no Brasil, em 1995 (FAGERIA et al, 1995).

Diversos fatores podem reduzir significativamente o rendimento da cultura, destacando-se as doenças cujos trabalhos experimentais têm mostrado redução no rendimento na faixa de 20 a 50 % (BALARDIN & BORIN, 2001). As de maior ocorrência são a brusone (*Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc), mancha parda (*Dreschlera oryzae* (Breda de Hann) Subr. & Jain (sin. *Bipolaris oryzae*), mancha estreita (*Cercospora janseana* Miyek), escaldadura (*Microdochium oryzae*), queima das bainhas (*Rhizoctonia oryzae* Riker & Gooch) e manchas dos grãos (*Phoma* sp., *Dreschlera oryzae* (Breda de Hann) Subr. & Jain, *Curvularia lunata* (Wakker) Boedijn, *Nigrospora oryzae* (Berk & Broome), *Alternaria* sp., *Fusarium* sp.) (AMARAL et al., 1985). Outros fungos como *Fusarium oxysporum* E.F. Sm. & Swingle, que causa mal do colo, e *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., que ocorre em sementes (MENDES et al., 1998) também pode ocasionar grandes perdas na cultura do arroz.

A brusone é considerada como a doença principal do arroz devido a sua ampla distribuição e poder destrutivo sob condições favoráveis. Ocorre em todas as regiões do território brasileiro, sendo os prejuízos maiores em arroz de terras altas cultivado no Centro-Oeste, podendo chegar a 100 % de perda (FILIPPI & PRABHU, 1998), provoca manchas nas folhas, colmo, panículas e grãos (BALARDIN, 2003). 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. Em estudos realizados por Malavolta et al. (2002) a infecção da semente por *B. oryzae* (*D. oryzae*) reduziu sua qualidade fisiológica e causou tombamento pós-emergência de plântulas de arroz.

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 microrganismos, como vírus, bactérias e outros (ALVES, 1998), além disso o controle químico é de difícil execução e alto custo, podendo resultar em contaminações do solo, bem como no surgimento de populações resistentes do patógeno (NAGARAJKUMAR et al, 2004).

As bactérias do gênero *Bacillus* apresentam grande potencial de uso no controle biológico, pois possuem características que propiciam o seu uso na indústria, tais como produção de enzimas amilolíticas, enzimas proteolíticas, antibióticos, muitos destes com atividades antifúngicas; termoestabilidade dos metabólitos e capacidade de manterem sua viabilidade quando estocados por longos períodos, assim como a possibilidade de serem utilizadas em conjunto com outras estratégias que viabilizem a ação dessas bactérias, como o encapsulamento por células mortas (MELO, 1998; BETTIOL, 1997; TAMEZ-GUERRA et al, 2000).

Neste contexto a identificação e seleção de bactérias do filoplano com potencial para o controle de fitopatógenos representam estratégia importante para o controle biológico. Com este trabalho objetivou-se: Coletar em áreas de cultivo de arroz nos municípios de São Luís, Arari, Vitória do Mearim, Miranda, Pindaré, Palmerândia, São Bento, Cidelândia, Davinópolis e Grajaú, folhas de arroz sem incidência de doença; obter isolados de *Bacillus* spp. do filoplano de arroz sadio; identificar as espécies de *Bacillus* spp.; avaliar o antagonismo *in vitro* dos isolados bacterianos em relação à *Pyricularia grisea* quanto à inibição do crescimento micelial; avaliar a qualidade sanitária das sementes de arroz variedade Bonança, a incidência e redução de fitopatógenos em sementes e plantas a partir da microbiolização das sementes de arroz com *Bacillus* spp.

1.1 Origem, importância econômica e social da cultura do arroz

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

Com o processo evolutivo e de domesticação a que se submeteu a espécie *O. sativa*, ao longo do tempo foram surgindo inúmeros tipos geneticamente divergentes os quais foram se adaptando as mais variadas condições agroecológicas. 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 indicados para o cultivo em terras altas. Sendo todas elas suscetíveis, moderadamente suscetível ou moderadamente resistentes a brusone, principal doença do arroz.

Botanicamente a espécie *O. sativa* pertence à família Poaceae (Gramineae), 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 à altura de 103,3 cm, ciclo cultural de 110 dias, com comprimento de colmo de 4,35 mm e comprimento da panícula de 25,7 cm, os grãos pesam em média 23,90 g e comprimento de 8,07 mm sem casca, apresentam forma muito alongada e cor branca. A cultivar Bonança apresenta folhas verdes, com pubescência escassa, aurícula verde-claro e lígula de incolor a verde. A planta tem 98,1 cm de altura, porte ereto, ciclo cultural de 115 dias, comprimento de colmo de 75,7 cm e comprimento de panícula de 22,4 cm, os grãos pesam em média 25,9 g e comprimento sem casca de 7,07 mm, sua forma é alongada e de cor branca (FONSECA et al., 2001).

O arroz é um dos alimentos com melhor balanceamento nutricional, fornecendo 20 % da energia e 15 % da proteína per capita necessária ao homem, e sendo uma cultura extremamente versátil, que se adapta a diferentes condições de solo e clima, é considerado a espécie que apresenta maior potencial para o combate a fome no mundo. Porém a produção

mundial de arroz não vem acompanhando o crescimento do consumo. Nos últimos seis anos, a produção mundial aumentou cerca de 1,09 % ao ano, enquanto a população cresceu 1,32 % e o consumo 1,27 %, havendo grande preocupação em relação à estabilização da produção mundial (ALONÇO et al., 2005).

Cerca de 150 milhões de hectares de arroz são cultivados anualmente no mundo, produzindo 590 milhões de toneladas, sendo que mais de 75 % desta produção é oriunda do sistema de cultivo irrigado. O arroz é um dos mais importantes grãos em termos de valor econômico. É considerado o cultivo alimentar de maior importância em muitos países em desenvolvimento, principalmente na Ásia e Oceania, onde vivem 70 % da população total dos países em desenvolvimento e cerca de dois terços da população subnutrida mundial. É alimento básico para cerca de 2,4 bilhões de pessoas e, segundo estimativas, até 2050, haverá uma demanda para atender ao dobro desta população (ALONÇO et al., 2005).

A FAO estima para a América do Sul um aumento de 7,7% na produção, totalizando 23,6 milhões de toneladas de arroz em casca na safra colhida em 2008. Em 2007, a produção diminuiu em relação ao ano anterior, principalmente devido às adversidades climáticas na Argentina, Bolívia, Brasil, Colômbia, Uruguai e Venezuela. A produção mundial de arroz atingirá novo recorde em 2008, totalizando 666,3 milhões de toneladas, aumento de 2,3% em relação ao ano anterior (FAO, 2008).

No Brasil o cultivo de arroz ocorreu mesmo antes do seu descobrimento por portugueses e atualmente é cultivado em todos os estados brasileiros. Segundo Ferreira et al. (2005) em 2002, o arroz foi cultivado em 70 % dos 5.543 municípios do país, sendo que a renda e a importância econômica e social diferem de acordo com as condições agro-climáticas e a tradição da cultura na região.

No período de 1940 a 1970 a produtividade média de arroz no Brasil se manteve praticamente constante, iniciando uma tendência de aumento a partir do início da década de 80. De 1990 a 2003, a produção de arroz teve um crescimento médio anual de 1,67 %. Parte desse resultado foi devido ao aumento dos rendimentos de 4,1 % ao ano. A média da produção nacional passou de 2,08 t/ha no triênio 1989 a 1991 para 3,241 t/ha nos anos 2000 a 2002. Por outro lado, as áreas cresceram, em média 1,94 % ao ano. A renda total agrícola do arroz no Brasil, no período de 1990 a 2002, representou em média, 7 % da renda obtida pelos principais produtos agrícolas (FERREIRA et al., 2005).

A produção média do país cresceu apenas 138.506 toneladas do período 1998 a 2001, para o período 2001 a 2003. De 2001 a 2003 para 2004 a 2006, entretanto, o acréscimo na produção foi significativo: 2.340.225 toneladas. Sendo o Rio Grande do Sul o maior produtor nacional e sua participação na produção nacional vem aumentando passando de 46,5 % para 49,8 % e de 49,8 % para 50,6 % do total produzido nos períodos, chegando a 6.408.555 toneladas (ATLAS SOCIO ECONÔMICO RIO GRANDE DO SUL, 2008).

O Brasil terá uma produção de 12 milhões de toneladas de arroz em 2008, crescimento de 8,5 % em relação à safra de 2007 que registrou produção de 11 milhões de toneladas de arroz, a previsão de rendimento médio por hectare do arroz (em casca) registrado na safra de 2007, foi de 3,8 mil toneladas. Para 2008, a estimativa de rendimento é de 4 mil toneladas, aumento de 5,8 % (IBGE, 2008). Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (Conab), a área cultivada com arroz está estimada em 2,96 milhões de hectares, 0,2 % (4,6 mil hectares) superior à da safra anterior. De acordo com a pesquisa, o crescimento foi impulsionado pela retomada das áreas que deixaram de ser cultivadas na safra anterior no Rio Grande do Sul, o que compensou a redução de área do arroz de sequeiro. Nas regiões Centro-Oeste e Sudeste, onde predominam os plantios de sequeiro, a área plantada caiu 17,6 % e 9,9 %, respectivamente (AGÊNCIA BRASIL, 2008).

Atualmente, o Brasil, está entre os dez principais produtores mundiais de arroz, com cerca de 11 milhões de toneladas para um consumo de 11,7 milhões de toneladas base casca. Essa produção é oriunda de dois sistemas de cultivo: irrigado e de sequeiro. O consumo médio de arroz no Brasil varia de 74 a 76 kg/habitante/ano, tomando-se por base o grão em casca. O brasileiro destina cerca de 22 % do seu orçamento em alimentação, sendo o arroz ainda o principal produto da cesta básica (ALONSO et al., 2005).

A região Nordeste, representada basicamente pelo Estado do Maranhão é o terceiro pólo de produção de arroz no Brasil, sendo o primeiro a região Sul e o segundo as regiões Sudeste e Centro-Oeste. O Maranhão possui importância histórica na produção, na década de 90 foi o terceiro produtor deste cereal. A rizicultura neste estado tem características singulares, como a forte porcentagem da produção destinada ao auto-abastecimento dos produtores, estimada em 30 % (FERREIRA et al., 2005).

De acordo com Teixeira et al. (1991), o Maranhão se notabiliza pelo volume e área expressivos e, sobretudo pelo número de famílias envolvidas na produção de arroz. Vários fatores

contribuem para o cultivo em sistemas diferentes, segundo Ferraz Júnior (2000), a diversidade de solos, clima e vegetação do Estado permitem que o arroz seja cultivado sob três sistemas, predominando a produção em sequeiro (no sistema de corte e queima) e em menor escala o cultivo de várzeas úmidas não-sistematizadas e culturas irrigadas. O cultivo do arroz irrigado ocorre em poucas localidades, com presença marcante nos municípios de Arari e Vitória do Mearim, a realidade da maioria dos produtores do estado do Maranhão, é caracterizada pelo uso de variedades rústicas e ausência de tecnologia (específica para as condições edafoclimáticas em cada região de cultivo) no sistema de produção (ARAÚJO, 2006). Segundo Del Villar et al. (2001), aproximadamente 52 % da produção do arroz no Maranhão é oriunda de lavouras com utilização de baixa tecnologia, salvo algumas regiões, como a de Balsas, que utilizam tecnologias mais avançadas. Essas condições de cultivo do arroz no Maranhão, torna a cultura de alto risco, principalmente em relação à incidência de doenças.

1.2 Principais doenças do arroz

Diversos fatores afetam a produtividade do arroz, entre estes se destacam as doenças fúngicas, ocasionando perdas consideráveis. As de maior ocorrência são a brusone (*Pyricularia grisea*), mancha parda (*Dreschlera oryzae*) (sin. *Bipolaris oryzae*), mancha estreita (*Cercospora janseana*), escaldadura (*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).

1.2.1 Brusone

Epidemiologia e sintomatologia

Os primeiros registros sobre a ocorrência da brusone datam de 1600 e foram feitos na China. 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). No Brasil a epidemia da brusone foi registrada pela primeira vez na região Centro Sul do estado do Paraná, em 1995, nos campos comerciais de triticales. Os isolados de triticales apresentaram reações compatíveis para triticales, aveia, cevada e trigo e incompatíveis para arroz (MEHTA & BAIER, 1998). 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 são maiores em arroz de terras altas cultivado no Centro-Oeste brasileiro, podendo chegar, em determinadas situações, a 100 % de perda (FILIPPI & PRABHU, 1998).

Essa doença 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., 2008). A brusone afeta também todas as ramificações dos cachos, provocando a formação de grãos chochos nas partes atacadas (PRABHU & BEDENDO, 1995).

Etiologia

Pyricularia grisea é um fungo pertencente à Divisão Amastigomycota, Classe Deuteromicetos, Subclasse Hyphomycetidae, Ordem Moniliales, Família Moniliacea (MENEZES & OLIVEIRA, 1993). É a forma anamorfa do ascomiceto *Magnaporthe grisea* (ROSSMAN et al. 1990). O teleomorfo *Magnaporthe grisea* pertence à classe Ascomycetos, Ordem Diaporthales e família Physoporellaceas (PRABHU & FILIPPI, 2006).

As espécies do gênero *Pyricularia* parasitam principalmente gramíneas e o patógeno pode sobreviver, na forma de micélio ou conídio, em restos de cultura, sementes, hospedeiros alternativos e plantas de arroz que permanecem no campo.

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).

Os fatores ambientais podem influenciar o desenvolvimento do fungo. A temperatura ideal para a esporulação é 28 °C, embora os conídios possam formar-se e liberar-se dos conidióforos entre temperaturas de 10 – 15 °C a 35 °C. Quanto à umidade, a produção de conídios sobre as lesões tem início quando a umidade relativa atinge 93 %. 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). Um alto índice de produção de esporos ocorre de três a oito dias após o aparecimento da lesão, e a esporulação em uma lesão pode continuar por mais de 20 dias. As chuvas levam os esporos das plantas, reduzindo assim a quantidade e a disseminação de esporos. 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).

A penetração do esporo é realizada diretamente através da cutícula, dificilmente pelos estômatos, sendo a colonização dos tecidos facilitada por toxinas, que levam a morte de células, e por hifas, que se desenvolvem no tecido morto do hospedeiro.

1.2.2 Manchas dos grãos

Epidemiologia e sintomatologia

A mancha de grãos é a segunda doença principal da cultura de arroz, tornando-se problema sério no final do ciclo da cultura. Pode 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).

Os sintomas são muito variáveis, dependendo do patógeno predominante, do estágio de infecção e das condições climáticas (UTUMI & LOBO, 2008). No nível de campo é difícil identificar o patógeno causador da mancha, observando apenas o sintoma.

As manchas aparecem desde o início da emissão das panículas até o amadurecimento, a queima das glumelas manifesta-se durante a emissão das panículas, com manchas nas espiguetas de coloração marrom-avermelhada. As manchas em forma de lente, com centro esbranquiçado e borda marrom, aparecem quando a infecção ocorre nas fases leitosa e pastosa, após a emissão das panículas (FILIPPI & PRABHU, 1998). Danos causados por insetos no campo, principalmente o percevejo, predispõem os grãos à infecção por microorganismos (FILIPPI et al., 2004).

Plantas com esse tipo de infecção podem apresentar má granação e grãos de baixa densidade ou gessados, que resultam em perdas na colheita ou no beneficiamento. Mesmo quando as manchas são superficiais, restritas às glumas, são altamente prejudiciais por afetarem a qualidade do produto, reduzindo seu preço (SOAVE et al., 1984). A avaliação de qualidade fitossanitária de sementes mostrou que 100 % dos cultivares apresentaram contaminações com fungos causadores de mancha nos grãos (FARIAS et al., 2004). Essa doença afeta a qualidade fisiológica e a qualidade industrial do arroz, o que foi observado pelo aumento no rendimento do engenho (grão inteiro) quando realizada aplicação de fungicida visando o controle das doenças foliares do arroz (DALLAGNOL et al., 2005; MIURA et al., 2005).

Etiologia

A mancha dos grãos é causada por vários fungos, dentre eles *Phoma* sp., *Dreschlera oryzae*, *Curvularia lunata*, *Alternaria* sp., *Nigrospora oryzae* e *Fusarium* sp. Os Gêneros *Dreschlera*, *Curvularia*, *Phoma* e *Alternaria* pertencem à classe Loculoascomycetes, Ordem Pleosporales e Família Pleosporaceae (CARVALHO & DIANESE, 2006). O gênero *Fusarium* pertence à Classe Hifomiceta, Subdivisão Deuteromicotina (VENTURA, 2000), Ordem Moniliales e Família Tuberculariaceae (HAWKSWORTH et al., 1995; LIDDEL, 1991).

O Gênero *Phoma* possui conidiosporos ovais ou elípticos, alcançam de 14 a 30 µm. Picnídios submersos no substrato e de paredes espessas. Gênero *Alternaria* apresenta os conidiosporos muriformes ou dictiosporos, escuros, septados, simples ou ramificados, produzindo os poros no ápice, isolados ou em cadeias. No Gênero *Curvularia* os conidióforos são escuros, a maioria simples, produzindo os conidiosporos simpodialmente, escuros, curvos ou retos, apresentando até cinco células, comumente quatro, sendo as células centrais mais escuras e as das extremidades mais claras. No gênero *Nigrospora* os conidióforos são curtos, a maioria simples; conidiosporos escuros, unicelulares, esféricos, situados sobre uma vesícula hialina produzida na extremidade do conidióforo (MENEZES & OLIVEIRA, 1993). As espécies de *Dreschlera* formam conídios multicelulares cilíndricos a partir de conidióforos geniculados. Os conídios apresentam contorno arredondado, sem protuberância na base (ELMER et al., 2001).

O aparecimento desses patógenos é favorecido por temperaturas baixas (15 °C a 17 °C), chuvas e alta umidade relativa durante a formação dos grãos.

1.2.3 Mancha parda

Epidemiologia e sintomatologia

A mancha parda está mundialmente distribuída nas regiões orizícolas, é importante nas regiões tropicais e tem sido subestimada por ser frequentemente confundida com a brusone. Causou a “fome de Bengala” em 1942, por ter expressado na ocasião seu potencial de destruição. É uma doença de importância secundária no Brasil (PEREIRA, 2002), e nos países produtores deste cereal, é superada apenas pela brusone (OU, 1995).

Esta doença ocorre com muita frequência, porém muitas vezes passa despercebida, devido à incidência de brusone (MACHADO et al., 2000).

A infecção da semente por *B. oryzae* (*D. oryzae*) reduz sua qualidade fisiológica e causa tombamento pós-emergência de plântulas de arroz (MALAVOLTA et al., 2002). As perdas de produção em termos mundiais são muito variáveis. Redução na ordem de 30 % já foi relatada para ensaios conduzidos com seis variedades na região norte do Brasil. Essa doença ocorre tanto em culturas instaladas sob condições de irrigação como de sequeiro (BEDENDO, 1997).

A doença afeta o coleótilo, folhas, bainhas, ramificações das panículas, glumelas e grãos (LOBO et al., 2006). Os sintomas normalmente manifestam-se nas folhas logo após a floração e, mais tarde, nas glumelas e grãos (FILIPPI & PRABHU, 1998). Nas folhas, as manchas são tipicamente ovais, em geral de coloração marrom, com centro acinzentado ou esbranquiçado, dependendo da idade da mancha. Nos grãos, as manchas têm coloração marrom-escuro e muitas vezes coalescem, cobrindo o grão inteiro. Em caso de ataque severo, todos os grãos das panículas são manchados, resultando na formação de grãos chochos ou na redução do peso dos mesmos (PRABHU & BEBENDO, 1995). A mancha nos grãos pode ocasionar perdas de 12 % a 30 % no peso e de 18 % a 22 % no número de grãos, porém a quantificação das perdas, quando a infecção

ocorre nos grãos, é difícil, uma vez que um complexo de fungos pode estar associado à manchados-grãos (MEW & GONZÁLES, 2002). No beneficiamento, os grãos totalmente manchados apresentam gessamento e coloração escura, o que afeta a sua qualidade (PRABHU & FILIPPI, 1997).

Etiologia

Helminthosporium oryzae, possui outras sinonímias aceitáveis: *Dreschelera oryzae* e *Bipolaris oryzae*. Pertence à Classe Loculoascomycetes, Ordem Pleosporales e Família Pleosporaceae (CARVALHO & DIANESE, 2006). Suas hifas são de coloração escura, normalmente marrom e de duas ramificações laterais originam-se os conidióforos, seus conídios são levemente curvos, mais largos no centro e gradativamente mais finos em direção às extremidades, onde a largura corresponde a aproximadamente metade da região central. Quando maduros, possuem coloração marrom e frequentemente germinam através das células apical e basal (BEDENDO, 1997).

Esse fungo localiza-se no interior da semente, causando descoloração e enrugamento da mesma. Fatores ambientais e condições do solo contribuem para o desenvolvimento desse patógeno, em condições favoráveis à doença tem grande potencial de perdas.

Dentre os fatores ambientais que influenciam o desenvolvimento desse fungo, a temperatura ideal varia de 20 °C a 30 °C, a umidade relativa deve ser superior a 89 %. Solos pobres em potássio e nitrogênio são associados a essa doença (PRABHU & BEDENDO, 1995).

1.2.4 Mal do colo

Epidemiologia e sintomatologia

A doença mal do colo foi relatada pela primeira vez no Brasil em 1980, foi inicialmente observada em culturas de sequeiro instaladas em solos de cerrado, na região centro-oeste (BEDENDO, 1997). É considerada uma doença nova da cultura do arroz.

Os sintomas característicos evidenciam-se na parte aérea por um crescimento retardado, redução no perfilhamento e um leve amarelecimento das folhas. Estes sintomas são evidentes aproximadamente aos 25 dias após o plantio. A doença causa desuniformidade entre as plantas e pode ser confundida com sintomas de deficiência mineral, normalmente de nitrogênio. Nas plantas arrancadas pode ser notada uma descoloração escura no nó basal do colmo, local de origem das raízes adventícias ou secundárias, suas raízes são pouco desenvolvidas e a doença raramente provoca morte das plantas (PRABHU & BEDENDO, 1995).

Etiologia

O *Fusarium oxysporum* foi identificado com base na presença de microconídios, macroconídios e clamidósporos. Nos testes de patogenicidade, sintomas idênticos aos observados no campo foram obtidos somente para alguns isolados, sugerindo a ocorrência conjunta de isolados patogênicos e saprofitos, podendo estar associado a nematóides formadores de galhas nas raízes (BEDENDO, 1997). Ele sobrevive no solo, provavelmente é transmitido pelas sementes e há maior incidência em plantios realizados em áreas de capoeiras e campos sujos, anteriormente cultivados com arroz seguido por pasto.

Os microconídios são abundantes, geralmente unicelulares, oval a riniforme. Macroconídios abundantes, com paredes finas e delicadas, com uma célula apical atenuada e célula basal em forma de pé. As monofalides que produzem microconídios são curtos quando comparados com aquelas produzidas por *Fusarium moniliforme* Sheldon e *Fusarium solani*

(Mart) Sacc. Os clamidósporos presentes são formados únicos ou em pares, na maioria dos isolados eles se formam prontamente e profusamente em cultura (NELSON et al., 1983).

1.2.5 Queima das bainhas

Epidemiologia e sintomatologia

A doença ocorre em áreas de produção localizadas em regiões tropicais e subtropicais onde o arroz que é cultivado em sistemas intensivos de produção apresenta maiores danos. No sul dos E.U.A, na Índia e China, os prejuízos causados pela doença têm sido considerados importantes e levado inúmeros pesquisadores a buscar fontes de resistência à queima das bainhas (LEE & RUSH, 1983; SHA & ZHU, 1990, MANIAN & MANIBHUSHARAO, 1982; MARCHETTI, 1983; GROTH & NOVICK, 1992). No Brasil, a ocorrência da queima-da-bainha foi identificada pela primeira vez em lavouras de arroz de alguns municípios do Estado de São Paulo, em 1967 (AMARAL et al., 1979). Após a introdução de cultivares norte-americanas, a mancha-da-bainha tem ocorrido com grande frequência no Rio Grande do Sul (RIBEIRO, 1984). Também foi registrada a ocorrência no Estado do Amazonas (SANTOS & GALVÃO, 1989). Atualmente, a queima-da-bainha ocorre, em maior ou menor grau de severidade em todas as lavouras, de arroz irrigado no Estado do Tocantins, onde, aproximadamente, 70.000 ha são plantados em rotação com soja (PRABHU et al., 2002). Em Formoso do Araguaia - TO, essa doença foi constatada em lavouras de arroz desde a implantação dos projetos cooperativos, e até a presente data é verificada, ainda que com baixa incidência (PRABHU & BEDENDO, 1995). De acordo com Groth et al. (1992), *R. oryzae* é transmitida pelas sementes e comumente causa a morte das plântulas.

Os sintomas se iniciam por lesões na bainha, na altura da lâmina de água, mas em condições favoráveis à evolução da doença, podem ser observados nas bainhas e folhas superiores (OU, 1985). Ocorre geralmente nas bainhas e colmos, caracterizando-se por manchas ovaladas, elípticas ou arredondadas, de coloração branco-acinzentado e bordos bem definidos,

de cor marrom. Em ataques severos observam-se manchas semelhantes nas folhas, porém, com aspecto irregular. A incidência da doença resulta em seca parcial ou total das folhas e provoca acamamento da planta (PRABHU & BEBENDO, 1995).

Apesar da relação entre a expressão dos sintomas e os prejuízos na produção ainda não ser bem conhecida, a redução na produção ou na qualidade do produto está provavelmente, relacionada com a diminuição de nutrientes pela redução da área foliar ou por deficiência de translocação, pela destruição de tecidos de condução ou armazenamento (MARCHETTI, 1991; AVILA et al., 1994).

Etiologia

Rhizoctonia solani, na fase perfeita corresponde a *Thanatephorus cucumeris*, pertence à Classe Deuteromycetes, Ordem Agonomycetales, Família Agonomycetaceae (MENEZES & OLIVEIRA, 1993).

O micélio jovem é claro e torna-se gradativamente marrom, apresentando septação e ramificações típicas deste fungo. Os escleródios são globosos, brancos e tomam a coloração marrom-escura quando mais velhos, podendo alcançar até 5 mm de diâmetro. Na fase perfeita, o patógeno produz basídios sobre os quais se desenvolvem os basidiósporos em número de 2-4 (BEDENDO, 1997).

Rhizoctonia solani é um fungo habitante de solo de grande interesse ecológico, por ser colonizador pioneiro da matéria orgânica. É também economicamente importante, podendo causar perdas consideráveis em várias culturas de interesse econômico (CERESINI & SOUSA, 1997). Esse patógeno infecta muitas outras gramíneas e leguminosas, como feijão e soja quando utilizadas em rotação com arroz, dissemina-se rapidamente com a água de irrigação e com o movimento da terra durante o preparo do solo para plantio (PRABHU & BEDENDO, 1995).

A densidade de inóculo no solo aumenta ao longo dos anos com a rotação de arroz-soja, pois a maioria das cultivares de arroz e de soja são suscetíveis a *R. solani* (GROTH et al., 1992).

Condições de luminosidade baixa, umidade alta e temperaturas médias, em torno de 28 – 32 °C, são favoráveis à ocorrência da doença (LEE & RUSH, 1983).

1.3 Manejo Biológico de doenças do arroz

Os problemas ambientais têm comprometido a produção alimentar. Esta por sua vez tem sido apontada como um dos responsáveis por danos ao ambiente e à saúde humana em decorrência do uso indiscriminado de agroquímicos, que também possibilita aos patógenos, adquirirem resistência a determinado produto. Os consumidores por sua vez fazem restrições aos alimentos produzidos com base nos agroquímicos. O que tem levado inúmeros pesquisadores a buscar alternativas sustentáveis, como o controle biológico, tendo como base o uso de microrganismos, extratos vegetais e resíduos orgânicos, dentre outros.

Contudo, no controle biológico, há também que se considerar aspectos importantes relacionados aos microrganismos, como o potencial de riscos que eles podem apresentar, pois mesmo sendo de origem biológica podem ser patogênicos aos organismos não visados e causar impacto ambiental indesejável. Contudo as vantagens e o potencial de uso desses microrganismos são inúmeros, tais como especificidade de ação, muitas vezes uma única aplicação é suficiente para o controle (ALVES, 1998).

Para Bettiol (1997), o uso generalizado do controle biológico de doenças na fitosfera, assim como da rizosfera, da espermosfera e de pós-colheita, considerando, de modo geral, a aprovação da sociedade, deste tipo de controle, é dependente, exclusivamente da disponibilidade e da efetividade dos agentes de controle, bem como dos produtos comerciais contendo esses microrganismos. Segundo o autor, no isolamento, na seleção e no desenvolvimento dos agentes de biocontrole, deve-se escolher qual estratégia será usada no controle, dependendo da sensibilidade do patógeno aos diferentes mecanismos de antagonismo e da ação do agente durante o ciclo de desenvolvimento da doença.

No controle biológico o antagonista interage com o patógeno, provocando a redução do inóculo ou dos seus efeitos sobre a planta hospedeira. E o seu sucesso depende das propriedades antagonísticas e dos mecanismos de ação do hiperparasita (BETTIOL, 1991). Os mecanismos das interações antagonistas entre microrganismos patogênicos e antagonistas com a planta, podem ser divididos: em antibiose, competição, parasitismo, predação e indução de defesa do hospedeiro (MELO, 1998). Porém alguns antagonistas possuem mais de um mecanismo, aumentando assim as suas chances de sucesso.

Os microrganismos que têm sido apontados como potenciais agentes de biocontrole, são os fungos *Trichoderma sp.*, *Gliocladium roseum*, *Gliocladium virens*, *Coniothyrium minitans*, *Talaromyces flavus*, *Pythium oligandrum*, *Sporidesmium sclerotivorum*, *Peniophora gigantea*, *Ampelomyces quisqualis*, *Penicillium spp.* e as bactérias *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas putida*, *P. fluorescens*, *Agrobacterium radiobacter* e *Streptomyces spp.* (MELO, 1998). Esses microrganismos 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 classificados como microrganismos endofíticos (THONSOM, 1988). As chances de obtenção de microrganismos com potencial antagônico são aumentadas fazendo-se isolamentos do ambiente onde serão usados, tornando-os adaptados a sobreviver e crescer nesse local (BETTIOL, 1997; BLAKEMAN & FOKKEMA, 1982), no entanto, Yuen et al (2001) selecionaram um isolado bacteriano de uma gramínea (*Poa pratensis* L.) como promissor para o biocontrole da ferrugem do feijoeiro.

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 e, espécies do gênero *Trichoderma*, até mesmo no que se refere à fitopatógenos de parte aérea, quando aplicado em pulverizações.

Bettiol & Kimatti (1989) em trabalho de seleção de microrganismo antagônico a *P. oryzae* verificou que *B. subtilis* foi o mais eficiente em inibir o crescimento micelial do patógeno, constatando também que o antagonista apresenta boas características para uso como agente de controle biológico, pois, além de rápido desenvolvimento produzem endósporo e antibióticos, crescem em larga faixa de temperatura e adaptam-se a várias condições ambientais. O mesmo autor verificou a termoestabilidade dos metabólitos produzidos por *B. subtilis*, os quais controlam *P. oryzae*. Outra característica que aponta o gênero *Bacillus* com um grande potencial para ser usado como agente de controle biológico, é a capacidade de manter sua viabilidade quando estocado por longos períodos (ALVES, 1998). Além disso, diversas espécies de *Bacillus* são citadas como produtoras de antibiótico podendo secretar metabólitos comercialmente importantes como enzimas aminolíticas e enzimas proteolíticas (BETTIOL & GHINI, 1995).

Na cultura do arroz várias espécies de *Bacillus* têm sido testados no controle dos patógenos *P. grisea*, *R. solani*, *B. oryzae*, *Curvularia sp.*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* e *Gerlachia oryzae*, em solução ou em sementes microbiolizadas com *Bacillus*. Foi observado

por Bettioli & Kimati (1989, 1990) o potencial inibitório de *B. subtilis* sobre diversos fitopatógenos, entre eles *R. solani* e *Fusarium moniliforme*. Em experimento realizado por Remuska & Pria (2007), a bactéria *B. thuringiensis* mostrou-se muito eficaz como antagonista para *Sclerotium rolfsii*, *Monilinia fruticola*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium solani*. A microbiolização de sementes de arroz com *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus* sp. e *Stenotrophomonas maltophilia* é considerada um tratamento eficiente no controle da queima-das-bainhas (*Rhizoctonia solani*) tanto pela capacidade destes em reduzir a doença, quanto pela possibilidade da eficiência, utilizando-os associados a compostos que estimulem sua atividade (LUDWIG & MOURA, 2007). Lazzaletti & Bettioli (1997) observaram redução significativa nas populações de *D. oryzae*, *P. oryzae* e *Rhizosporium sativum* das sementes de arroz tratadas com um produto de pó-molhável formulado à base de células e de metabólitos de *Bacillus subtilis*, argila, espalhante e água, moído e seco.

Ao verificar a inibição do crescimento micelial de *P. grisea* por *B. subtilis*, Bettioli & Kimati (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.

1.4 Uso de *Bacillus* na agricultura

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

O gênero *Bacillus* pertence ao Domínio Bactérias, Classe Bacilli, Família Bacillaceae, gram positiva (MADIGAN et al., 2004).

As bactérias do gênero *Bacillus* apresentam grande potencial de uso no controle biológico, pois possuem características que propiciam o seu uso na indústria, tais como: produção de enzimas amilolíticas, enzimas proteolíticas, antibióticos, muitos destes com atividades antifúngicas; termoestabilidade dos metabólitos e capacidade de manterem sua viabilidade quando estocados por longos períodos, assim como a possibilidade de serem utilizadas em conjunto com outras estratégias que viabilizem a ação dessas bactérias, como o encapsulamento por células mortas. De acordo com Schnepf et al. (1998) este tipo de formulação aumenta a persistência em campo de biopesticidas. A eficácia das formulações encapsuladas e microencapsuladas, foram mostradas por Tamez-Guerra et al. (2000), quando verificaram um aumento da persistência do *B. thuringiensis* e o conseqüente incremento na mortalidade dos insetos - alvos.

As espécies de importância industrial desse gênero são *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. sphaericus*, *B. megaterium*, *B. pumilis*, *B. brevis* e *Bacillus* spp. (MELO, 1998). Vários estudos vêm sendo feitos sobre a seleção e o uso de antagonistas para o controle de doenças em culturas agrícolas (BETTIOL & KIMATI, 1989).

A espécie *B. subtilis* tem sido testada em uma série de culturas agrícolas para controlar fitopatógenos (MELO, 1998), é uma bactéria com grande potencial de uso como inoculante; De acordo com Melo et al. (1995), uma linhagem de *B. subtilis* (OG), isolada do rizoplano de plantas saudáveis de feijoeiro, tem reduzido a podridão radicular do feijoeiro causada por *Fusarium solani* f.sp. *phaseoli* e promovido o crescimento de plantas e a produção de grãos.

Os isolados de *B. thuringiensis* apresentam eficácia e especificidade no controle de insetos - praga, favorecendo a formulação de biopesticidas, mais de 100 formulações já foram colocados no mercado mundial, sendo atualmente responsáveis por mais de 90 % do faturamento com bioinseticidas (POLANCZYK & ALVES, 2003). O continente americano é responsável por 50 % deste mercado, principalmente os Estados Unidos e Canadá, e a América Latina representa apenas 8 a 10 % do total (TAMEZ-GUERRA et al., 2001). O produto com maior alcance no mercado mundial é o Dipel (*Bt kurstaki* HD- 1) (POLANCZYK & ALVES, 2003), é pouco tóxico para ácaros, coleópteros, dípteros e hemípteros e altamente eficiente para 170 lepidópteros-praga (BEEGLE & YAMAMOTO, 1992; GLARE & O'CALLAGHAM, 2000).

Existem aproximadamente 80 produtos para o biocontrole dos patógenos no mundo (WHIPPS & DAVIES, 2001), formulados à base dos fungos *Gliocladium*, *Trichoderma* e das

bactérias *Bacillus* e *Pseudomonas*, grande parte desses produtos são introduzidos no mercado como promotores de crescimento de planta, indutores de resistência da planta ou condicionadores do solo (TIMOTHY & RICHARD, 2001).

No Brasil utilizam-se produtos à base de *B. thuringiensis* para o controle de cerca de 30 pragas de importância agrícola, porém a área total em que esses produtos são aplicados corresponde a 150.000 hectares. As principais limitações são o elevado custo, a concorrência com produtos químicos e a falta de investimento dos setores público e privado, no desenvolvimento e formulações destes produtos (POLANCZYK & ALVES, 2003). Neste aspecto Gelernter & Schwab (1993) e Navon (2000) afirmam que diversos fatores limitam a utilização dos biopesticidas: o seu custo, que na maioria das vezes é superior aos dos inseticidas químicos; a baixa persistência em campo da maioria das formulações; o baixo espectro de ação, a ineficácia contra pragas de solo e endofíticas.

Portanto é evidente a necessidade de se intensificar a investigação de microrganismo com potencial de uso no biocontrole de doenças, bem como em formulações e uso dos mesmos nos diversos fitopatógenos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA BRASIL (2008). Disponível em: <<http://www.agenciabrasil.gov.br>>. acesso em: 25 nov. 2008.

ALONÇO, A. S.; SANTOS, A. B.; GOMES, A. S.; GRUTZMACHER, A. S et al. **Cultivo do arroz irrigado no Brasil**. EMBRAPA clima temperado. Nov 2005, ISSN 1808-9207 (Versão eletrônica). / Sistemas de produção.captia.embrapa.br/Fontes HTML/Arroz/Arroz Irrigado Brasil/ Cap. 18.htm- 24 k. Acesso em: 25 nov. 2008.

ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. 1163 p.

AMARAL, R. E. M.; ISSA, E.; SOUZA, D. M.; MALAVOLTA, V. M. A.; LEITE, L. C.; JESUS, L. M. Estudos sobre a queima das bainhas do arroz *Oryza sativa* L. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.46, p.55-62, 1979.

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.

ARAÚJO, E. S. **Caracterização molecular através da RAPD e análise das proteínas de reserva em grãos de variedades locais de arroz do Maranhão**. 2006. Tese (doutorado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

ATLAS SOCIO ECONÔMICO RIO GRANDE DO SUL. ARROZ. (2008) <<http://www.seplag.rs.gov.br/atlas.asp?menu>>. Acesso em: 25 de nov. 2008.

AVILA, S.; BLANCO, P.; CASALES, L. Evolucion y prediccion de severidade de dño por *Sclerotium oryzae* e *Rhizoctonia oryzae sativae* baseada en la deteccion temprana de sintomas en las variedades Tacuari y Bluebelle. In: Resultados Experimentales 1993/93, II, 1994. **INIA...** Treinta y res., agosto de 1994.

BALARDIN, R. S.; BORIN, R. C. **Doenças na cultura do arroz irrigado**. Santa Maria: Ed. do Autor, 2001. 48p. II.

BALARDIN, R. S. **Doenças do arroz**. Santa Maria: Ed. do Autor, 2003. 59p.

BLAKEMAN, J. P.; FOKKEMA, N. J. Potential for biological control of plant diseases on the phylloplane. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.20, p.167-192, 1982.

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.

BEEGLE, C. B.; YAMAMOTO, T. Invitation paper (C.P. Alexander Fund): History of *Bacillus thuringiensis* Berliner research and development. **The Canadian Entomologist**, Ottawa, v.124, n.3, p.587-616, 1992.

BETTIOL, W.; KIMATTI, H. Seleção de microrganismos 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.; 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. **Controle Biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna : EMBRAPA-CNPDA, 1991. 226p.

BETTIOL, W.; GHINI, R. **Controle Biológico**. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de Fitopatologia**: Princípios e Conceitos. São Paulo: Ceres, 1995. p.717-728.

BETTIOL, W. **Biocontrole na Filosfera**: problemas e perspectivas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.5, p.59-97, 1997.

CARVALHO, R. C. P.; DIANESE, J. C. Ascomicetos Pleosporales: uma visão atual. **Revisão anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.14, p.219-250, 2006.

CERESINI, P.C.; SOUZA, N.L. Associação de *Rhizoctonia* spp. binucleadas e de *R. solani* Kuhn GA4 HGI e GA 2-2 IIIB ao feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) no Estado de São Paulo. **Summa Phytopathol.**, Jaboticabal, v.23, n.1, p.14-24, 1997.

DALLAGNOL, L. J.; BALARDINI, R. S.; MADALOSSO, M. et al. Efeito do controle químico das doenças foliares sobre a produção e qualidade de arroz. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO, 4, 2005, Santa Maria. **Anais...** Santa Maria: UFSM, 2005. p.511-513.

DEL VILLAR, P. M.; DUCOS, A.; FERREIRA, N. L. S. et al. **Cadeia produtiva do arroz no Estado do Maranhão**. Teresina: EMBRAPA Meio-Norte, 2001. 136p.

ELMER, W. KONEMAN.; STEPHEN, D.A.; WILLIAM, M. J.; PAUL, C. S.; WASHINGTON, C. W. **Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas Colorido**. 5ed. Lippincouttg : Copyright, 2001.

FAGERIA, N. K.; SANTANA, E. P.; MORAES, O. P. Resposta de genótipos de arroz de sequeiro favorecido à fertilidade do solo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.30, n.9, p.1155-1161, 1995.

FAO. Relatório de abril/2008. <http://www.fao.org.br/faq_alimentos.asp - 21 K >. Acesso em: 25 de mar. 2009.

FARIAS, S. R. J...; REY, M. S.; CORRÊA, C. L. et al. Qualidade sanitária de sementes de diferentes cultivares de arroz (*Oryza sativa*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 37, 2004, Gramado . **Suplemento...** Brasília: SBF, 2004, p.147-147.

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.

FERRAZ JÚNIOR, A. S. S. de L. **Arroz de sequeiro em aléias de leguminosas em solos de baixa fertilidade natural**. 2000. Tese (doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2000.

FERREIRA, C. M.; DEL VILLAR, P. M.; ALMEIDA, P. N. A.; GAMEIRO, A. H. Importância Econômica e Social do arroz no Brasil. In: FERREIRA, C. M., SOUSA, I. S. F., DEL VILLAR, P. M.(Ed.). **Desenvolvimento tecnológico e dinâmica da produção do arroz de terras altas no Brasil**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2005. p.9- 26.

FILIPPI, M.C.; PRABHU, A.S. Doenças do arroz e seu controle. In: BRESEGHELLO, F.; STONE, L. F. (Ed.). **Tecnologia para o arroz de terras altas**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa arroz e feijão, 1998. p.139- 156.

FILIPPI, M.C.; PRABHU, A.S.; SILVA, G.B. **Cultivo do arroz irrigado no estado de Tocantins**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa arroz e feijão, 2004. (Versão eletrônica). Disponível em: <[http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Arroz/](http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Arroz/ArrozIrrigadoTocantins/doencas_metodo_controle.htm)> ArrozIrrigadoTocantins/doencas_metodo_controle.htm. Acesso em: 04 mar. 2008.

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://www.ufrgs.br/agronomia/fitossan/herbario_virtual/ficha.php?id=101>. Acesso em: 20 nov. 2008.

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

GELERNTER, W.; SCHWAB, G. E. 1993. Transgenic bacteria, viruses, algae and other microorganisms as *Bacillus thuringiensis* toxin delivery systems. In: ENTWISTLE, P. F.; CORY, J. S.; BAILEY, M. J.; HIGGS, S. (Ed.). ***Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide: theory and practice**. Chichester: John Wiley, cap. 4, p. 89-104.

GLARE, T. R.; O'CALLAHAN, M. ***Bacillus thuringiensis*: biology, ecology and safety**. Chichester: John Wiley, 2000. 350 p.

GROTH, D. E.; NOVICK, E. M. Selection for resistance to rice sheath blight through number of infection cushions and lesion type. **Plant disease**, St. Paul, v.76, p.721-723, 1992.

GROTH, D. E.; RUSH, M. C.; HOLLIER, C. A. Prediction of rice sheath blight severity and yield loss based on early season infection. **Louisiana Agriculture**, Baton Rouge, v.35, p.20-23, 1992.

HAWKSWORTH, D. L.; KIRK, P. M.; SUTTON, B. C.; PEGLER, D. N. **Ainsworth & Bisby's Dictionary of the fungi**. 8 ed. CAB International: Oxon, VK, 1995.

IBGE. 2008. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_impressao.php?id_noticia=1123-1K->. Acesso em: 30 nov. 2008.

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.; BETTIOL, W. Tratamento de sementes de arroz, trigo, feijão e soja com um produto formulado à base de células e de metabólitos de *Bacillus subtilis*. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.54, n.1-2, 1997.

LEE, F. N.; RUSH, M. C. Rice ShB. A Major Rice disease. **Plant Disease**, St. Paul, v.67, n.7, p.829-832, 1983.

LIDDEL, C. M. Introduction: recent advances in Fusarium systematics. Annual **Meeting of the American Phytopathological Society**. St Paul, 1991.

LOBO, V. L. da S.; FILIPPI, M. C. de; UTUME, M. M.; MORAES, O. P. de; ASTRO, E. da M. de. **Perfil sanitário e fisiológico de sementes de arroz provenientes de ensaios de valor de cultivo e uso em três locais**. Santo Antonio de Goiás: EMBRAPA Arroz e Feijão, dez de 2006. 4p. (Comunicado técnico – 129, 1ª ed.).

LUDWIG, J.; MOURA, A. B. Controle biológico da queima-das-bainhas em arroz pela microbiolização de sementes com bactérias antagonistas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.32, n.5, p. 381–386, 2007.

MACHADO, J. C.; COUTINHO, W. M.; PEREIRA, L. A.A.; MAGALHÃES, F.H.L.; PENA, R. da C. M.; VIEIRA, M. das G.G.C. Qualidade fisiológica de sementes de arroz em função da ocorrência diferenciada de *Drechslera oryzae*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 24, n.1, jan/mar 2000. Disponível em: <http://www.editora.ufla.br/revista/24_1/art16.pdf>Acesso em: 3 maio 2008.

MADIGAN, M. T.; MARTINHO, J. M.; PARKER, J. M. **Microbiologia de Brock**. 10ª Ed. São Paulo: Prentice Hall, 2004.

MALAVOLTA, V. M. A.; PARISI, J. J. D. ; TAKADA, H. M. et al. Efeito de diferentes níveis de incidência de *Bipolaris oryzae* em sementes de arroz sobre aspectos fisiológicos da semente, transmissão do patógeno as plântulas e produção. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.28, n.4, p.336 - 340, 2002.

MANIAN, S.; MANIBHUSHANRAO, K. Screening rice germplasm for tolerance to sheath blight incited by *Rhizoctonia solani* Kuhn. **Phytopathologia mediterranea**, Roma, n.21, p.37-38, 1982.

MARCHETTI, M. A. Potential impact of sheath blight on yield and milling quality os short-statured rice lines in the Southern united States. **Plant Disease**, St. Paul, v.76, n.2, p.162-165, 1983.

MARCHETTI, M. A.; BOLLICH, C. N. Quantification of the relationship between sheath blight severity and yield loss in rice. **Plant Disease**, St. Paul, v.75, n.8, p.773-775, 1991.

MEHTA, Y. R.; BAIER, A. Variação patogênica entre isolados de *Magnaporthe grisea* atacando triticale e trigo no Estado do Paraná. **Summa Phytopatologica**, Jaboticabal, v.24, n.2, p.119-125, jun. 1998.

MELO, I. S.; VALARINI, P. J.; FAUL, J. L. Controle biológico de *Fusarium solani* f. sp. *Phaseoli* por *Bacillus subtilis* isolado da rizosfera do feijoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.20 (suplemento), p.342, 1995.

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

MENDES, M. A. S.; URBEN, A. F.; CASTRO, C. **Fungos em plantas no Brasil**. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1998. 569p.

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

MEW, T.W.; GONZALES, P.A. **Handbook of rice seed borne fungi**. International Rice Research Institute: Science Publishers, Inc. 2002, 83p.

MIURA, L.; PRUCH, L. A. M.; SILVA, C. M. et al. Épocas de aplicação e rendimento de grãos inteiros determinam a eficiência de fungicidas no controle da brusone. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO, 4, 2005, Santa Maria. **Anais...** Santa Maria: UFSM, 2005. p.517-519.

NAGARAJKUMAR, M.; BHASKARAN, R.; VELAZHAHAN, R. Involvement of secondary metabolites and extracellular lytic enzymes produced by *Pseudomonas fluorescens* in inhibition

of *Rhizoctonia solani*, the rice sheath blight pathogen. **Microbiological Research**, Heideberg, v. 159, p.73-81, 2004.

NAVON, A. *Bacillus thuringiensis* application in agriculture. In: CHARLES, J. F.; DELECLUSE, A.; NIELSEN-LE ROUX, C. (Ed.). **Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2000. p.355-367.

NELSON, P.E.; TOUSSON, T.A., and MARASAS, W. F. O. **Fusarium Species: An Illustrated Manual for Identification**. The Pennsylvania State University Press. University Park, Pennsylvania : USA. 1983. 203 p.

OU, S. H. **Rice Disease**. 2.ed. KEW: CMI, 1985, 380 p.

OU, S. H. Fungus diseases: Foliage diseases. In: OU, S.H. **Rice diseases**. 2ed. Kew: Surry England. Commonwealth Mycological Intitut, 1995. 109-246p.

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

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.

POLANCZYK, R.; ALVES, S. *Bacillus thuringiensis*: uma breve revisão. **Agrociencia**, Montividéu, v.VII, p. 1 – 10, 2003.

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

PRABHU, A. S.; FILIPPI, M. C. Arroz (*Oryza sativa* L.): controle de doenças. In: VALE, F.X. R. do; ZAMBOLIN, L. **Controle de doenças de plantas: grandes culturas**. 1ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1997. p.51-75.

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).

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

REMUSKA, A. C.; PRIA, M. D. Efeito de *Bacillus thuringiensis* no crescimento de fungos fitopatogênico . **Ciências Exatas Terra, Ciências Agrárias**. Ponta Grossa, v.13, n.3, p.31-36, dez. 2007.

RIBEIRO, A.S.: NUNES, C.D.M. Etiologia das manchas de glumas do arroz irrigado no Rio Grande do Sul. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE FITOPATOLOGIA, 17, 1984. São Paulo. **Resumos...** São Paulo: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 1984. p.315.

ROSSMAN, A. Y.; HOWARD R. J.; VALENT, B. *Pyricularia grisea*, the correct name for de rice blast disease fungus. **Mycologia**, Lawrence, v.82, p.509-52, 1990.

SANTOS, J. R. M.; GALVÃO, E. U. P. Avaliação de doenças em germoplasma de arroz em várzea e terra firme no Amazonas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.24, n.12, p. 1483- 1488, dez. 1989.

SCHNEPF, E.; CRIKMORE, N.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D. R.; DEAN, D. H. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v.62, n.3, p.775-806, 1998.

SHA, X.; ZHU, L. Resistance of some varieties to sheath blight. **IRRN**, Philippines, v.15, n.6, p.7-8, 1990.

SOAVE, J.; PIZZINATO, M. A.; USBERTI JUNIOR, J. A.; CAMARGO, O. B. A.; VILLELA, O. V. Selection of rice cultivars resitant to some pathogens using seed heath testing. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.19, n.4, p.449-453, 1984.

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

TAMEZ-GUERRA, P.; MCGUIRE, M. R.; BEHLE, R. W.; SHASHA, B. S.; WONG, L. J. G. Assessment of microencapsulated formulations for improved residual activy of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.93, n.2, p.219-225, 2000.

TAMEZ-GUERRA, P.; GALAN-WONG, L. J.; MEDRANO,-ROLDAN, H.; GARCIA – GUTIÉRREZ, C.; RODRIGUEZ-PADILLA, C.; GOMES-FLORES, R. A.; TAMEZ-GUERRA, R. S. Bioinseticidas: su empleo, production y comercialización en México. **Ciencia VANI, Madrid**, v.4, n.2, p.143-152, 2001.

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

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.

THÉRY, H.; MELLO, N. A. Diversidade e mobilidades da agricultura brasileira. **Cadernos de Ciência & Tecnologia, Brasília**, v. 22, n.1, p.21-36, 2005.

THOMSON, J. A. Biological Control f Soilborne Plant Pathogens in the Rhizosphere with Bacteria. **Annual Review of Phytopathology**. Palo Alto, v.26, p.379-407, 1988.

TIMOTHY C.; P.; RICHARD R. B. Controle Biológico em sistemas da estufa. **Revisão anual de Phytopathology**, v.39, p.103-33, 2001.

UTUMI, M. M.; LOBO, V. L. da S. **Manchas de grãos no arroz em Goiás, Mato Grosso e Rondônia**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa arroz e feijão. 2008. Disponível em: <<http://www.agrosoft.org.br/?q=node/100194>>. Acesso em: 02 maio 2008.

VENTURA, J. A. Taxonomia de *Fusarium* e seus segregados. Parte II – Chaves para identificação. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. Passo Fundo, v.8, p.303-338, 2000.

WHIPPS, J. M.; DAVIES, K. G. **Success in biological control of plant pathogens and nematodes by microorganisms**. Wallingford: CAB Int. In press, 2001.

YUEN, G. Y.; STEADMAN, J. R.; LINDGREN, D. T.; SCHAFF, D.; JOCHUM, C. Bean rust biological control using bacterial agents. **Crop Protection**, New York, v.20, p.395-402, 2001.

**ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO *in vitro* DE *Bacillus* spp NO
CONTROLE DE *Pyricularia grisea* .**

**ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO *in vitro* DE *Bacillus* spp NO
CONTROLE DE *Pyricularia grisea* .**

Ivaneide de Oliveira Nascimento^{1,2}; Antônia Alice Costa Rodrigues^{1,2}

¹Mestrado em Agroecologia - UEMA; ²Laboratório de Fitopatologia - UEMA; Universidade Estadual do Maranhão, Cx. Postal 09, CEP:65054-970, São Luís, MA, e-mail: aacrodrigues@bol.com.br; alicecosta@cca.uema.br; ivaneide_agro@yahoo.com.br

(Aceito para publicação em / /)

Autora para correspondência: Antonia Alice Costa Rodrigues

NASCIMENTO, I de O.; RODRIGUES, A.A.C. **Isolamento, Identificação e Avaliação de *Bacillus* spp no controle de *Pyricularia grisea*. Fitopatologia Brasileira. 2008**

RESUMO

Com o presente trabalho objetivou-se selecionar, identificar e avaliar *in vitro* espécies de *Bacillus* spp. do filoplano de arroz, com potencial para o controle de *Pyricularia grisea*. Foram realizadas visitas nos campos de produção de arroz em dez municípios maranhenses, para coletar folhas de plantas saudáveis, e posterior isolamento e identificação de *Bacillus* spp., através de testes bioquímicos. Realizou-se um teste para a seleção de um isolado mais virulento, a ser usado na avaliação de métodos de seleção *in vitro*. A partir da utilização do *Bacillus* selecionado, foram avaliados os métodos de pareamento de uma risca central, de três riscas, do círculo e do ponto na inibição do crescimento micelial de *Pyricularia grisea*. Com o método que proporcionou melhor inibição do patógeno, foram avaliadas dezoito espécies de *Bacillus* no antagonismo *Bacillus* x *P. grisea*. O delineamento adotado foi inteiramente casualizado e os dados submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste Tukey. De acordo com os resultados, foram obtidos 20 isolados e os métodos de uma risca central e o do círculo proporcionaram maior inibição do crescimento micelial do patógeno. As espécies mais promissoras para o biocontrole foram *B.cereus* (isolado B41), *B. polymyxa* (B33) e *B. lentus* (BSB1), com 90,41 %, 76,69 % e 75,96 % de inibição, respectivamente.

Palavras-Chave: Controle Biológico, patógeno, arroz.

ABSTRACT

The aim of this paper was select, identify and evaluate *in vitro* species of *Bacillus* spp from the rice phylloplane with potential to control *Pyricularia grisea*. Rice crop fields were visited in ten municipalities of Maranhão, to collect leaves from healthy plants, and later isolation and identification of *Bacillus* spp., through biochemical tests. A test to select a specie more virulent, which was used in the evaluation of *in vitro* selection method, was made. From the use of the selected *Bacillus*, the pairing of one central streak, three streaks, circle and point methods were evaluated in the inhibition of *Pyricularia grisea* mycelial growth. The method with better pathogen inhibition was used to evaluate eighteen *Bacillus* species in the antagonism *Bacillus* x *Pyricularia grisea*. The design adopted was completely randomized and data were submitted to variance analysis and the means were compared by Tukey test. According to the results, 20 species were obtained and the one central streak and circle methods enabled greater inhibition of pathogen mycelial growth. The most promising species to biocontrol were *B.cereus* (isolate B41), *B. polymyxa* (B33) and *B. lentus* (BSB1), with 90,41 %, 76,69 % and 75,96 % of inhibition, respectively.

Key words: Biological control, pathogen, rice.

INTRODUÇÃO

A espécie *Oryza sativa* L., cultivada em todo o mundo, está sujeita ao ataque de várias doenças fúngicas, as quais afetam a produtividade da cultura e qualidade das sementes. Dentre estas se destaca a brusone [*Pyricularia grisea* (Cooke)] Sacc., que possui ampla distribuição e poder destrutivo sob condições favoráveis. No Brasil, tanto a brusone nas panículas quanto nas folhas apresenta-se como um dos principais fatores que afetam a produtividade, tanto no sistema de cultivo de terras altas quanto no irrigado, impedindo que as cultivares expressem seu potencial produtivo (LOBO, 2008).

O controle mais utilizado para as doenças é, sem dúvida, o químico. No entanto, o uso de pesticidas na agricultura tem, reconhecidamente, promovido diversos problemas de ordem ambiental, como a contaminação dos alimentos, do solo, da água e dos animais; intoxicação de agricultores e desequilíbrio biológico, alterando a ciclagem de nutrientes e da matéria orgânica (BETTIOL & GUINI, 2001). Portanto a busca de novas alternativas no controle das doenças se faz necessária para a sustentabilidade dos agroecossistemas. Nesse sentido uma agricultura sustentável requer a utilização de estratégias que permitam o aumento na produção de alimentos sem prejuízo ao meio ambiente e saúde, dentro do contexto econômico, social e político de cada região. Uma das alternativas potenciais para atingir este objetivo é o uso das bactérias promotoras de crescimento das plantas, considerando sua fácil aplicação em tratamento de sementes, raízes e parte aérea (MARIANO et al., 2004).

Os principais gêneros e espécies de bactérias epifíticas envolvidos na promoção de crescimento de plantas ou biocontrole são *Pseudomonas* spp. do grupo fluorescente, *Bacillus* spp. e *Streptomyces* spp. (SILVEIRA, 2001). Dentre os antagonistas mais estudados na atualidade, encontra-se a espécie *Bacillus subtilis* Ehrenberg, a qual tem se destacado no controle de doenças do filoplano e em pós-colheita (KUPPER et al., 2003).

Bettiol & Kimatti (1989) em trabalho de seleção de microrganismo antagonico a *P. oryzae* verificou que *B. subtilis* foi o mais eficiente em inibir o crescimento micelial do patógeno, constatando também que o antagonista apresenta boas características para uso como agente de controle biológico, pois além de rápido desenvolvimento produzem endósporo e antibióticos, crescem em larga faixa de temperatura e adaptam-se a várias condições ambientais.

No Brasil são utilizados produtos à base de *Bacillus thuringiensis* para o controle de cerca de 30 pragas de importância agrícola, numa área de 150.000 hectares. As principais limitações são o elevado custo, a concorrência com produtos químicos e a falta de investimentos dos setores público e privado no desenvolvimento e formulação destes produtos (POLANCZYK & ALVES, 2003).

O sucesso de todo programa de controle biológico está no isolamento e seleção de microrganismos antagonistas, que visam obter isolados com potencial de biocontrole em curto espaço de tempo e com baixo custo (MARIANO et al., 2000). Portanto, na perspectiva de contribuir com medidas alternativas no controle de doenças, este trabalho teve por objetivo isolar, identificar e selecionar espécies de *Bacillus* spp. com potencial de uso no controle biológico de *P. grisea*.

MATERIAL E MÉTODOS

Isolamento de antagonistas do filoplano de plantas de arroz

Foram realizadas visitas em plantios de arroz de São Luís, Arari, Vitória do Mearim, Miranda, Pindaré, Palmeirândia, São Bento, Cidelândia, Davinópolis e Grajaú, para coleta de plantas de arroz sadias, com diferentes estádios fenológicos. As amostras foram acondicionadas em sacos de papel, transportadas ao laboratório de Fitopatologia e armazenadas em freezer.

O isolamento de *Bacillus* foi realizado de acordo com Mariano (2000) e Bettiol (1995), com modificações. Foram retirados discos das folhas saudáveis, em seguida prosseguiu-se a lavagem em água destilada. Após esse procedimento, os discos das folhas foram colocados em tubo de ensaio com 5 ml de água destilada esterilizada (ADE), agitados por 10 minutos e, após a agitação o material foi submetido à Banho Maria a 80 °C por 20 minutos. A partir da suspensão obtida, efetuou-se diluições em série, utilizando-se tubos de ensaio com 4,5 mL de ADE, até a diluição 10^{-2} . Foram plaqueadas em meio de cultura (BDA) 0,1 mL das diluições 10^0 , 10^{-1} e 10^{-2} , com três repetições cada, efetuando o espalhamento com auxílio de alça de Drigalski. Após 48 horas de incubação, em condições de laboratório, foram repicadas as colônias bacterianas, para meio BDA (Batata, Dextrose, Agar), pelo método de estrias, visando à obtenção de colônias isoladas, as quais foram transferidas para tubos de ensaio com meio Ágar Triptona de Soja (TSA), para uso posterior.

Identificação dos isolados de *Bacillus* spp.

A identificação dos *Bacillus* spp. foi realizada com base na metodologia e chave de identificação proposta por Silva et al. (2007); American Public Health Association (2001), no Laboratório de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Maranhão, a partir das cepas de *Bacillus* spp. isoladas de folhas de arroz. Foram realizadas diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-4}) para purificação das mesmas, de cada diluição retirou-se uma alíquota de 0,1 mL e semeou-se em placas contendo ágar seletivo para *Bacillus cereus* Mossel (Ágar MYP). As placas foram invertidas e incubadas a 30 °C por 24 horas. Após a incubação, as colônias típicas de *Bacillus* spp. foram transferidas para o ágar Triptona de Soja (TSA) e incubou-se a 30 °C por 24 horas, para realização dos testes bioquímicos.

Teste de Voges-Proskauer

A partir das culturas em TSA, foram inoculados em tubos de ensaio com Caldo MR-VP e incubadas a 30 °C por 48 horas. Transferiu-se 1 mL do crescimento para um tubo de ensaio, acrescentando-se 0,6 mL de uma solução de α -naftol e 0,2 mL de uma solução de KOH a 40 %. Em seguida agitou-se vigorosamente após a adição de cada reagente, deixando-se em repouso por até 2 horas. O teste foi considerado positivo com o surgimento de uma coloração vermelha ou rósea.

Teste de Citrato

A partir das culturas em TSA, estriou-se a superfície inclinada dos tubos com Ágar Citrato de Simmons e procedeu-se à incubação a 30 °C por 96 horas. O desenvolvimento de uma cor azul indicou a positividade do teste.

Teste de redução de nitrato (caldo nitrato)

Inoculou-se uma alçada com inóculo da cultura nos tubos de caldo nitrato e incubou-se a 30 °C por 24 horas. Após incubação adicionou-se aos tubos de cultura 0,25mL das seguintes soluções: Solução A (solução de ácido sulfanílico) e solução B (solução de α -naftol). Observou-se o desenvolvimento de uma cor avermelhada em no máximo 10 minutos, considerando-se o teste positivo, e a cor do meio ficou inalterada, em caso negativo.

Teste de hidrólise de amido

Transferiu-se uma alçada da cultura para as placas contendo Agar amido, fazendo duas estrias na superfície do meio e incubadas a 30 °C por 24 horas. Após esse período, adicionou-se

gotas de lugol na superfície das estrias. O resultado foi positivo quando apareceram zonas claras ao redor do inoculado não corado pelo iodo e considerado negativo quando houve ausência destas zonas claras.

Teste de utilização anaeróbia da glucose (Teste de Hug. 1% glucose)

Inoculou-se uma alçada da cultura no meio previamente desaerado (em ebulição por 15 minutos em banho maria, e em seguida resfriou-se de imediato em banho de gelo). Cobriu-se a superfície do caldo com óleo mineral ou vaselina líquida estéril e incubou-se a 30 °C por 24 horas. Após o período de incubação, observou-se a ocorrência da viragem ácida do indicador, alterando a cor do meio de verde para amarelo (teste positivo) e a permanência da cor inalterada (teste negativo).

Avaliação do antagonismo de *Bacillus* spp. a *Pyricularia grisea*

Para estudo do efeito do antagonismo *Bacillus* spp. x *P. grisea* foram realizados dois experimentos em laboratório, em todos eles os isolados de *Bacillus* foram cultivados em meio de cultura BDA (Batata-Dextrose-Agar) por 24 - 48 horas e o isolado de *Pyricularia grisea*, proveniente da EMBRAPA arroz e feijão/Goiânia-GO, foi cultivado em meio de cultura BDA por 14 (quatorze) dias. Inicialmente fez-se uma triagem de seis espécies de *Bacillus* spp. com o método de três riscas, para seleção de espécies virulentas utilizando B16 (*B. macerans*), B21 (*B. lentus*), B22' (*B. pentothenicus*); B25= (*B. pumilus*); B45= (*B. cereus*) e B46= (*B. polymyxa*). A avaliação foi realizada aos sete, quatorze e vinte e um dias, através da inibição do crescimento micelial, medindo-se o diâmetro da colônia. O delineamento estatístico adotado foi inteiramente casualizado, com quatro repetições.

Utilizando o *Bacillus pumilus* selecionado no teste anterior, realizou-se a seleção dos métodos de pareamento da Risca Central, do Ponto, do Círculo e o de Três Riscas, para ser utilizado na avaliação de dezoito isolados de *Bacillus* identificados (Figura 1).

Para o método de uma risca central, foi retirado o crescimento bacteriano com alça de platina e efetuado um risco no centro da placa de Petri, contendo meio de cultura BDA, em seguida, foram retirados dois discos de meio de cultura, de 6,0 mm de diâmetro, contendo estruturas da extremidade da colônia de *P. grisea*. Os discos foram pareados nas laterais do crescimento de *Bacillus*, em dois pontos equidistantes (MARIANO, 1993).

No método do ponto foi retirado o crescimento bacteriano com alça de platina e depositado uma gota em meio de cultura BDA, em um ponto diametralmente oposto àquele onde o disco de micélio do patógeno de 6 mm de diâmetro foi colocado na placa de bioensaio.

Para o método do Círculo transferiu-se assepticamente para placas de Petri, contendo meio de cultura BDA, um disco de 6 mm de diâmetro de fitopatógeno *P. grisea*, colocando-o no centro da placa. E utilizando um bastão de vidro inoculou-se a bactéria nos bordos da placa, formando um círculo de aproximadamente 5 cm de diâmetro (MARIANO, 1993).

No método de Três Riscas transferiu-se assepticamente para placas de Petri, contendo meio de cultura BDA, um disco de 6 mm de diâmetro do fitopatógeno *P. grisea*, colocando-o a 1,5 cm da borda da placa. Efetuaram-se três estrias com auxílio de alça de platina a 1,5 cm das bordas da placa com o crescimento dos isolados de *Bacillus* (REMUSKA & PRIA, 2007).

Neste ensaio adotou-se o delineamento inteiramente ao acaso, com seis repetições. A avaliação foi efetuada após sete dias, medindo-se o diâmetro da colônia.

Utilizando o método do círculo, selecionado anteriormente, foram avaliados, quanto à ação antagônica, 18 isolados de *Bacillus*, sendo eles: B6 (*Bacillus* sp); B7 e B7' (*Bacillus licheniformes*); B16 (*B. macerans*); B22, B33 e B46 (*B. polymyxa*); B22' (*B. pentotheticus*); B21

e BSB1 (*B. lentus*); B25, B31 e B35 (*B. pumilus*); B32 (*B. stearothersophilus*); B29 (*Bacillus* spp.); B36, B41, B45 e B47 (*B. cereus*). A avaliação foi realizada aos sete e quatorze dias, com delineamento experimental inteiramente casualizado, com quatro repetições.

Nos dois experimentos a testemunha constou somente do patógeno em BDA, onde cada placa constituiu-se em uma unidade experimental. A avaliação foi realizada medindo-se o diâmetro das colônias, em dois sentidos diametralmente opostos, com auxílio de uma régua milimetrada, definindo-se uma média para cada colônia, comparando com a testemunha. Os dados foram submetidos à Análise de Variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, utilizando o Programa ASSISTAT (2008).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Resultados

A partir dos materiais vegetais coletados nos dez municípios maranhenses obteve-se 21 isolados de *Bacillus* spp. Destes, 20 foram identificados (Quadro 1 e 2) e de acordo com os testes bioquímicos realizados, concluiu-se que os mesmos se encontram distribuídos em oito espécies: *B. macerans* (5 %), *B. stearothersophilus* (5 %), *B. licheniformes* (10 %), *B. pumilus* (10 %), *B. lentus* (15 %), *B. pentothenticus* (15 %), *B. polymyxa* (25 %) e *B. cereus* (25 %) (Quadro 1) (Figura 1). Ocorreu diversidade de espécies de *Bacillus* entre os isolados obtidos do filoplano do arroz, da mesma variedade de arroz proveniente de localidades diferentes, foram obtidos *Bacillus* de espécies diferentes.

No experimento, para seleção de métodos de cultivo do antagonista, houve diferença significativa entre os quatro métodos utilizados, sendo que o método do Ponto não diferenciou significativamente da testemunha, porém os métodos de Três Riscas, Uma Risca e do Círculo

foram superiores a testemunha. Dentre estes, se destacaram os métodos de Uma Risca Central e o método do Círculo, com respectivamente 37,4 % e 36,5 % de inibição do crescimento micelial de *P. grisea* no antagonismo com o B25 (*B. pumilus*), esses dois métodos não se diferenciaram estatisticamente, ambos obtendo um percentual significativo de inibição (Tabela 1).

No ensaio, para seleção de dezoito isolados de *Bacillus* spp., no controle do crescimento micelial de *P. grisea*, houve diferença significativa ao nível de 5% ($P < 0,5$) quanto ao período de crescimento da colônia do patógeno e ao antagonista. Quinze antagonistas promoveram maior inibição do crescimento micelial aos quatorze dias após o tratamento, variando de 53,54 % a 90,41 % de inibição. Neste período se destacaram os isolados B41 (*B. cereus*), B33 (*B. polymyxa*) e BSB1 (*B. lentus*), com 90,41 %, 76,69 % e 75,96 % de inibição, respectivamente. Aos sete dias se destacaram os isolados B41 (*B. cereus*), B6 e B29 (*Bacillus* sp.), com 86,58 %, 58,42 % e 57,63 % de inibição em relação à testemunha (Tabela 2).

Discussão

Houve diversidade de espécies de *Bacillus* entre os isolados obtidos do filoplano do arroz, fato justificado devido à variação das condições ambientais entre os municípios de coleta, bem como as diferentes variedades de arroz e idade da planta. Observou-se que da mesma variedade de arroz oriundas de localidades diferentes, foram obtidos *Bacillus* de espécies diferentes. Segundo (BLAKEMAN & FOKKEMA, 1982), dentre os fatores que interferem no crescimento e sobrevivência dos microrganismos na filosfera, a umidade relativa é o mais importante, uma vez que para suportar o crescimento de muitos microrganismos na superfície foliar, a umidade relativa deve estar por volta de 95 % ou mais. Outro fator importante é a disponibilidade de nutrientes, que no início do desenvolvimento das folhas é muito baixa, propiciando a colonização

de bactérias, pois aminoácidos estão disponíveis e açúcares são menos frequentes. Assim, o equilíbrio da comunidade microbiana do filoplano pode ser facilmente quebrado pela interferência humana (BETTIOL, 1997). Outros fatores, apontados por Guini (1991), que causam modificações na filosfera, estão relacionados à aplicação de produtos químicos, como fungicidas, inseticidas, acaricidas, hormônios e fertilizantes.

Dentre as espécies de *Bacillus* identificadas, as que possuem vários estudos sobre a sua aplicação no controle de pragas e doenças, e outros fins, são as bactérias *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. polymyxa* e *B. cereus*. As demais, *B. macerans*, *B. pentothenicus*, *B. lentus*, *B. stearothermophilus*, que apresentam potencial de aplicação no controle biológico carecem de estudos que viabilizem o uso das mesmas nas diversas culturas agrícolas.

As espécies de importância industrial desse gênero são *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. sphaericus*, *B. megaterium*, *B. pumilus*, *B. brevis* e *Bacillus* spp (MELO, 1998). Produtos a base de *Bacillus licheniformes* são apontados como biofungicida para uma variedade de fitopatógenos, tanto na prevenção como no controle de doenças, principalmente em manchas foliares e como bactéria promotora de crescimento pela provável produção de giberelinas (LUCAS-GARCIA et al., 2004). Já os *Bacillus polymyxa* tem sido apontados como produtores de levana por Ernandes e Garcia-Cruz (2005).

Quanto aos métodos utilizados no segundo experimento, em que o método do Círculo e o de Uma Risca obtiveram resultados estatisticamente semelhantes, sendo considerados os melhores, esses dados demonstram a importância na escolha do método de cultivo do antagonista para experimentos *in vitro* e se relacionam com a disposição dos fitopatógenos e antagonistas no pareamento e o mecanismo antagônico exercido pelo agente biocontrolador. Podem também ser

influenciados com a produção de enzimas que podem ter ação contra a parede celular fúngica (MAVINGUI & HEULIN, 1994). No método do Círculo, outro ponto que justifica a boa inibição do crescimento do patógeno é o fato deste estar circundado pelo antagonista forçando um confronto e impedindo a passagem para os limites da placa.

Na avaliação das bactérias, utilizando-se o método do Círculo, os *Bacillus* promoveram maior inibição no crescimento micelial de *P. grisea* aos quatorze dias, obtendo-se os melhores resultados com os isolados B41 (*B. cereus*), B33 (*B. polymyxa*), BSB1 (*B. lentus*), B6 (*Bacillus* sp.), B31 (*B. pumilus*) e B22 (*B. polymyxa*), com respectivamente, 90,41 % , 76,69 %, 75,96 %, 73,15 %, 69,76 % e 67,55 %, de redução do crescimento micelial do patógeno (Tabela 3). Estes resultados foram superiores aos encontrados em experimentos realizados por Remuska & Pria (2007), em que a bactéria *B. thuringiensis* mostrou-se muito eficaz como antagonista para *Sclerotium rolfii*, *Monilinia fruticola*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium solani*, com 39,41 %, 37,97 %, 37,44 % e 36,17 % respectivamente, de inibição do crescimento micelial dos fungos fitopatogênicos.

Quanto a interferência do período de aplicação dos *Bacillus* na inibição do crescimento micelial do patógeno, Wiwattanatapee et al. (2004), observaram que passados 20 dias da aplicação de diferentes isolados de *Bacillus megaterium*, estes não promoveram mais a redução do progresso da queima-das-bainhas em arroz.

Corroborando com os resultados encontrados, Assis et. al., (1997), avaliaram 20 isolados de *Bacillus* spp. contra *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* LFR-3 no campo em plantas de repolho ‘Midori’, e obtiveram 78 % e 71 % de redução de sintomas da doença com *B. cereus*.

Vários pesquisadores, entre os quais Remuska & Pria (2007), Kupper et al. (2003), Ludwig & Moura (2007) e Navon (2000) têm desenvolvido estudos que demonstram a eficiência

dessas bactérias e corroboram com os resultados encontrados no presente trabalho. Bettioli e Kimatti (1989), pesquisando a seleção de microorganismos antagônicos a *P. oryzae* verificaram que *B. subtilis* foi mais eficiente em inibir o crescimento micelial do patógeno.

Outra estratégia que tem sido utilizada é a microbiolização de sementes de arroz com *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus* sp., *B. subtilis*, e *Stenotrophomonas malthophilia*, sendo considerada um tratamento eficiente no controle da queima-das-bainhas (*Rhizoctonia solani*) tanto pela capacidade destes em reduzir a doença, quanto pela possibilidade da eficiência, utilizando-os associados a compostos que estimulem sua atividade (LUDWIG & MOURA, 2007).

Portanto a viabilização de novas pesquisas nessa área é necessária e a disponibilização de um maior número de espécies de *Bacillus* spp. com potencial para o biocontrole, proporcionará grande contribuição no entendimento da relação patógeno x antagônico, e na busca do desenvolvimento sustentável. Quanto aos *Bacillus* isolados, identificados e avaliados nos experimentos realizados *in vitro*, neste trabalho, pode-se afirmar que os mesmos apresentam potencial de uso no biocontrole, porém é necessário a realização de novos ensaios em nível de casa de vegetação e campo, que viabilizem o uso na agricultura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

American Public Health Association (2001) Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4th Ed. Washington. D. C.

Assis SMP, Mariano RLR, Michereff SJ, Coelho RSB (1997) Survival and redistribution of *Bacillus* spp., potential biocontrol agents of black rot, on kale phylloplane. In: Wenhua T, Cook RJ, Rovira A. (Ed) Advances in Biological control of Plant Diseases. Beijing, China. China Agricultural University Press. pp. 374-379.

Assistat versão 7.5 beta, www.assistat.com (Novembro 03, 2008)

BettioL W (1995) Isolamento seletivo de *Bacillus*. In: Melo IS, Sanhueza RMV. Métodos de seleção de microrganismos antagonísticos a fitopatógenos. Jaguariúna. EMBRAPA-CNPMA. pp. 35-36.

BettioL W (1997) Biocontrole na Filosfera: problemas e perspectivas. Revisão Anual de Patologia de Plantas 5:59-97.

Bettiol W, Kimatti H (1989) Seleção de microrganismos antagonísticos a *Pyricularia oryzae* Cav. para o controle da brusone do arroz (*Oryza sativa* L.). Summa Phytopathologica 15: 257 – 266.

Bettiol W, Ghini R (2001) Proteção de plantas em sistemas agrícolas alternativos. In: Sami Jorge Michereff, Reginaldo Barros. Proteção de plantas na agricultura sustentável. Recife. UFRPE, Imprensa Universitária. pp. 1-13.

Blakeman JP, Fokkema NJ (1982) Potential for biological control of plant diseases on the phylloplane. Annual Review of Phytopathology 20:167-192.

Ernandes FMPG, Garcia-cruz CH (2005) Levana bacteriana: aspectos tecnológicos, características e produção. Ciências Agrárias 26: 71-82.

Guini R (1991) Efeito de fungicidas sobre microorganismos não alvo. *Summa Phytopathol* 19: 62-63.

Kupper, KC, Fernandes NG, Goes A (2003) Controle biológico de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.28, n.3, P. 251-257.

Lobo, VLS (2008) Efeito do tratamento químico de sementes de arroz no controle da brusone nas folhas e na qualidade sanitária e fisiológica das sementes. *Tropical Plant Pathology* 33:162-166.

Lucas-Garcia JA, Probanza A, Ramos B, Ruíz-palomino M, Gutiérrez-mañero FJ (2004) Effecto of inoculation of *Bacillus licheniformis* on tomato and pepper. *Agronomie* 24:169-176.

Ludwig J, Moura AB (2007) Controle biológico da queima-das-bainhas em arroz pela microbiolização de sementes com bactérias antagonistas. *Fitopatologia Brasileira* 32:381–386.

Luna CI, Mariano RLR, Souto-Maior AM (2002) Production of a biocontrol agent for crucifers black rot disease. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 19:133-140.

Mariano RLR (1993) Métodos de seleção *in vitro* para o controle microbiológico de patógenos de plantas. In: Luz WC, Fernandes JM, Prestes AM, Picinini EC. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*. Passo Fundo.

Mariano RLR (2000) *Manual de Práticas em Fitobacteriologia*. Recife. UFRPE.

Mariano RLR, Silveira EB, Gomes AMA, Rodrigues VJLB, Assis SMP (2000) Biocontrole de doenças de plantas. In: Torres JB, Michereff SJ (Eds.) *Desafios do manejo integrado de pragas e doenças*. Recife. UFRPE. pp.77- 109.

Mariano RLR, Silveira EB, Assis SMP, Gomes AMA, Nascimento ARP, Donato VMTS (2004) Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável. *Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica* 1:89-111.

Mavingui P, Heulin T (1994) In vitro chitinases and antifungal activity of a soil, rhizosphere and rhizoplane population of *Bacillus polymyxa*. *Soil Biology & Biochemistry* 26: 801-803.

Melo IS (1998) Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: Mello IS; Azevedo JL (ed.). **Controle biológico**. Jaguariúna: EMBRAPA, v. 1, PP.264.

Navon, A (2000) *Bacillus thuringiensis* application in agriculture. In: Charles, J. F.; Delecluse, A.; NIELSEN-LE ROUX, C. (Ed.). **Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers. p.355-367.

Polanczyk R, Alves S (2003) *Bacillus thuringiensis*: uma breve revisão. *Agrociencia* VII: 1 – 10.

Remuska AC, Pria MD (2007) Efeito de *Bacillus thuringiensis* no crescimento de fungos fitopatogênicos. *Ci. Exatas Terra, Ci. Agr.* 13: 31-36.

Silveira EB (2001) Bactérias promotoras de crescimento de plantas e biocontrole de doenças. In: Sami Jorge Michereff, Reginaldo Barros. *Proteção de plantas na agricultura sustentável*. Recife. UFRPE, Imprensa Universitária. pp. 71-100.

Silva N, Junqueira VCA, Silveira NFA, Taniwaki MH, Santos RFS, Gomes RAR (2007) *Manual de Métodos de Análise de Microbiologia de Alimentos*. 3ª. Ed. São Paulo SP. Livraria Varela.

Wiwattanapatapee R, Pengoo A, Kanjanamaneesathian M, Matchavanich W, Nilratana L, Jantharangsri A (2004) Floating pellets containing bacterial antagonist for control sheath blight of rice: formulations, viability and bacterial release studies. *Journal of Controlled Release* 95: 455-462.

Quadro 01 - Resultados dos testes bioquímicos utilizados na identificação dos isolados de *Bacillus*. São Luís, 2008.

Cepas	Testes Bioquímicas						Espécies
	Citrato de Simmons	Redução de Nitrato	Uréia	Voges-Proskauer	Hidrolise do Amido	Glucose OF	
B7	+	+	-	+	-	F	<i>Bacillus licheniformis</i>
B7'	+	+	-	+	-	F	<i>Bacillus licheniformis</i>
B15	-	+	-	-	-	F	<i>Bacillus polymyxa</i>
B16	-	+	-	-	+	F	<i>Bacillus macerans</i>
B21	-	-	+	-	+	O	<i>Bacillus lentus</i>
B22	-	+	-	+		F	<i>Bacillus polymyxa</i>
B22'	+	+	-	-	-	F	<i>Bacillus pentothenticus</i>
B25	+	+	-	+	-	O/F	<i>Bacillus pumilus</i>
B31	+	+	V (+)	+	+	F	<i>Bacillus cereus</i>
B32	-	-	+	-	+	O/F	<i>Bacillus stearothermophilus</i>
B33	-	+	-	+	-	F	<i>Bacillus polymyxa</i>
B35	+	+	-	+	-	O/F	<i>Bacillus pumilus</i>
B36	+	+	V (+)	+	+	F	<i>Bacillus cereus</i>
B41	+	+	V (-)	+	+	F	<i>Bacillus cereus</i>
B45	+	+	V (-)	+	+	F	<i>Bacillus cereus</i>
B46	-	+	-	+	+	F	<i>Bacillus polymyxa</i>
B47	+	+	V (-)	+	+	F	<i>Bacillus cereus</i>
B15	-	+	-	-	-	F	<i>Bacillus polymyxa</i>
BP ₁	-	-	+	-	+	O	<i>Bacillus lentus</i>
BSB ₁	-	-	+	-	+	O	<i>Bacillus lentus</i>

Nota: Teste Glucose OF: F: fermentação (+); O: oxidação (-)

Quadro 2. Identificação e origem dos isolados de *Bacillus* obtidos a partir de amostras de folhas sadias de arroz, coletadas em municípios maranhenses. São Luís, 2008.

Isolados	*Identificação	Procedência	Variedade arroz
B6	<i>Bacillus</i> spp.	São Luís	IAC 400
B7 e 7''	<i>Bacillus licheniformis</i>	São Luís	Arariba
B12	<i>Bacillus</i> spp.	Arari	Tainha
B16	<i>Bacillus macerans</i>	Miranda	IAC-47
B21	<i>Bacillus lentus</i>	Arari	Lageado
B22	<i>Bacillus polymyxa</i>	Arari	3 meses
B22''	<i>Bacillus pentothenticus</i>	Arari	3 meses
B25	<i>Bacillus pumilus</i>	Arari	Primavera
B29	<i>Bacillus</i> spp.	Arari	Cabocla
B31	<i>Bacillus cereus</i>	Vitória do Mearim	Cica 7
B32	<i>B. stearothermophilus</i>	Vitória do Mearim	Bacaba roxa
B33	<i>Bacillus polymyxa</i>	Vitória do Mearim	70 dias/Gaúcho
B35	<i>Bacillus</i> spp.	Pindaré	Cabocla
B36	<i>Bacillus cereus</i>	Cidelândia	Cabocla
B41	<i>Bacillus cereus</i>	Grajaú	Cabocla
B45	<i>Bacillus cereus</i>	Grajaú	Cabocla
B46	<i>Bacillus polymyxa</i>	Davinópolis	Lageado
B47	<i>Bacillus cereus</i>	Davinópolis	Agulhinha
BSB1	<i>Bacillus lentus</i>	São Bento	Cabocla
BP1	<i>Bacillus lentus</i>	Palmerândia	Cabocla

* Testes bioquímico: Voges-Proskauer, Citrato, Nitrato, uréia, amido e glucose.

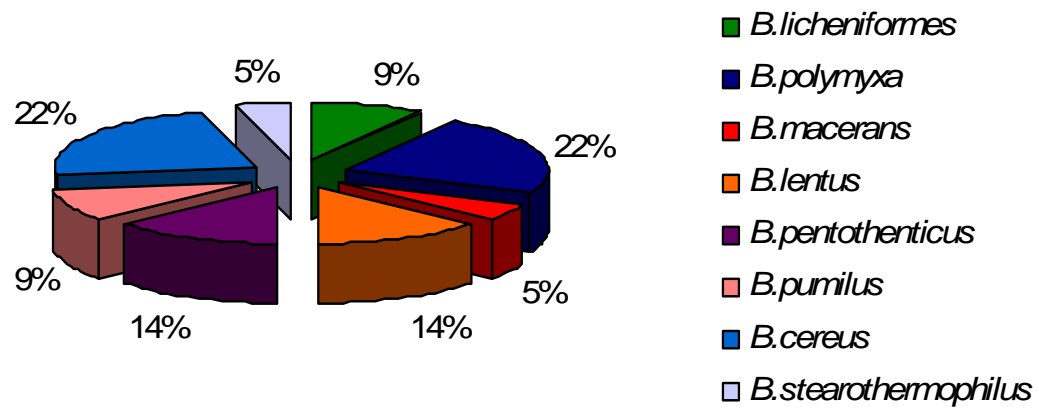


Figura 1 – Percentagem de cada espécie de *Bacillus* spp., obtidos a partir de amostras de folhas sadias de arroz, coletadas em municípios maranhenses. São Luís, 2008.

Tabela 1 – Avaliação comparativa de quatro métodos de seleção *in vitro* por pareamento, para teste antagônico de *Bacillus pumilis* e *Pyricularia grisea*. São Luís, 2008.

Métodos	Crescimento micelial (cm)	Inibição do Crescimento micelial (%)
Testemunha	2,14 a	0
Mét. Ponto	1,79 ab	16,4
Mét. 3riscas	1,50 bc	29,9
Mét. 1risca	1,34 c	37,4
Mét. Círculo	1,36 bc	36,5

*médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste Tukey ao nível de 1 % ($p < 0.1$). CV(%) = 16,12.

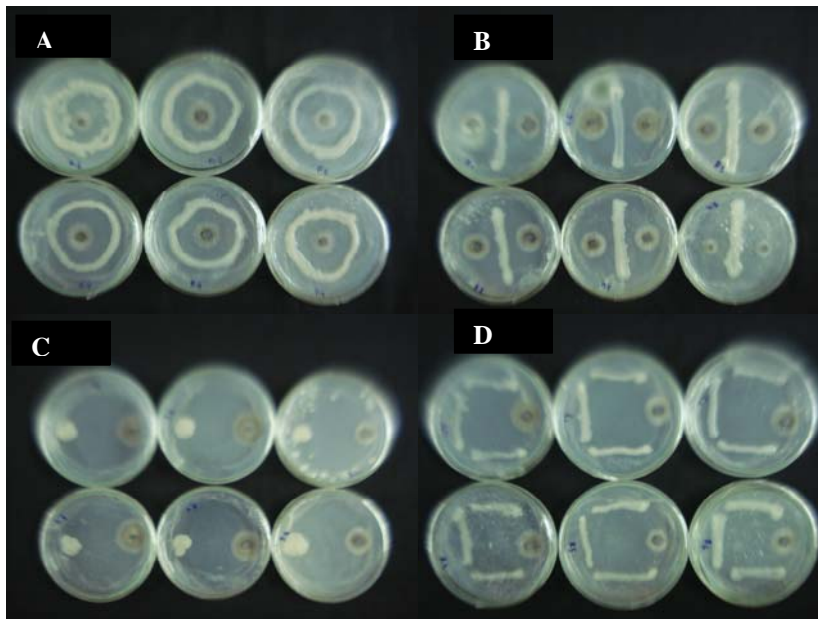


Figura 2: Comparação *in vitro* entre quatro métodos quanto ao antagonismo *Bacillus* spp. x *Pyricularia grisea*: A – Círculo. B – Uma risca central. C – Ponto. D – Três riscas. Laboratório de Fitopatologia-UEMA, São Luís, 2008.

Tabela 2 . Avaliação da Inibição do crescimento micelial de *Pyricularia grisea* por isolados de *Bacillus* spp. São Luís, 2008.

Tratamento	Diâmetro da colônia (cm)		% Inibição	
	7 dias	14 dias	7 dias	14 dias
Testemunha	3,80 abcB	6,78 aA		
B25	2,54 abcdA	2,65 cA	33,16	60,91
B22	1,97 abcdA	2,20 cdA	48,16	67,55
B22'	2,52 abcdA	3,06 cA	33,68	54,86
B46	2,48 abcdA	2,68 cA	34,74	60,47
B45	4,00 aB	7,00 aA	- 5,26	-3,24
B7 e 7'	2,98 abcdA	3,10 cA	21,58	54,27
B21	1,87 cdeA	2,45 cdA	50,79	63,86
B32	2,42 abcdeA	2,70 cA	36,32	60,17
B31	2,14 abcdeA	2,05 cdA	43,68	69,76
B47	2,51 abcdA	3,03 cA	33,95	55,31
B36	3,52 abcdB	6,62 aA	7,37	2,35
B35	3,05 abcdA	3,15 bcA	17,11	53,54
BSB1	1,67 deA	1,63 cdA	56,05	75,96
B6	1,58 deA	1,82 cdA	58,42	73,15
B33	1,65 deA	1,58 cdA	56,58	76,69
B41	0,51 eA	0,65 dA	86,58	90,41
B29	1,61 deA	2,33 cdA	57,63	65,63
B16	3,92 abB	5,08 abA	- 3,16	25,07

Médias seguidas da mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5 % ($p < 0.5$) de significância. CV= 27,22. T= testemunha; B6, B29 = *Bacillus* sp.; B7 e B7' = *B. licheniformis* B16= *B. macerans*; B22,B33,B46 = *B. polymyxa*; 22' = *B.pentothenticus*; B21, BSB1 = *B. lentus*; B31, B36, B41, B45, B47 = *B.cereus* ; B25, B35= *B.pumilus*; B32= *B. stearotherophilus*.

**MICROBIOLIZAÇÃO DE SEMENTES DE ARROZ COM *Bacillus* spp. NA REDUÇÃO
DE PATÓGENOS.**

CAPITULO II

MICROBIOLIZAÇÃO DE SEMENTES DE ARROZ COM *Bacillus* spp. NA REDUÇÃO DE PATÓGENOS.

Ivaneide de Oliveira Nascimento^{1,2}; Antônia Alice Costa Rodrigues^{1,2}

¹Mestrado em Agroecologia - UEMA; ²Laboratório de Fitopatologia - UEMA; Universidade Estadual do Maranhão, Cx. Postal 09, CEP:65054-970, São Luís, MA, e-mail: aacrodrigues@bol.com.br; alicecosta@cca.uema.br; ivaneide_agro@yahoo.com.br

(Aceito para publicação em / /)

Autora para correspondência: Antonia Alice Costa Rodrigues

NASCIMENTO, I. O.; RODRIGUES, A. A. C. Microbiolização de sementes arroz com *Bacillus* spp. na redução de patógenos. **Revista Brasileira de Sementes**. 2008.

RESUMO

As sementes são componentes essenciais da economia e do comércio mundial, nelas está contida a vida e a possibilidade de disseminação de doenças, sendo importante a sanidade destas para obtenção de plantas saudáveis com altos rendimentos. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a qualidade sanitária de sementes de arroz variedade Bonança e a redução de fitopatógenos, utilizando a microbiolização de sementes com *B. macerans*, *B. polymyxa*, *B. pentothenicus*, *B. lentus*, *B. pumilus*, *B. stearothermophilus* e *Bacillus* sp. e para o teste de sanidade foi empregado o método do *Blotter Test*. As sementes microbiolizadas com a suspensão de bactéria em solução salina (NaCl 0,85 %), na concentração de $OD_{540} = 0,5$ para cada isolado, foram plaqueadas em papel de filtro e semeadas em solo esterilizado, em experimentos conduzidos em laboratório e em casa de vegetação, com delineamento inteiramente casualizado. Os parâmetros avaliados foram incidência e redução dos patógenos em sementes e plantas de arroz aos sete e quatorze dias após a semeadura. As sementes foram avaliadas observando-as em lupa binocular para identificar colônias de fungos. Quanto às plantas, em cada época retirou-se 100 plantas, as quais passaram por assepsia usual e em seguida foram plaqueadas em meio de cultura batata-dextrose-ágar. Os resultados obtidos permitiram concluir: em teste *in vitro* as sementes de arroz variedade Bonança, microbiolizadas com os *Bacillus* spp., tiveram reduzidas a incidência de *Curvularia oryzae* e *Aspergillus niger*. Nas plantas originadas das sementes microbiolizadas com os *Bacillus* spp. observou-se a redução da incidência dos patógenos *Curvularia oryzae*, *Aspergillus Níger* e *Scopulariopsis* sp. A ação dos isolados foi diferenciada quanto ao patógeno e o tempo após a microbiolização das sementes.

Palavras-Chave: Controle Biológico, fitopatógenos de semente, arroz.

ABSTRACT

Seeds are essential components of the economy and world trade, in them life is contained and the possibility of diseases dissemination as well, so their health is important to obtain healthy plants with high incomes. This paper aimed to evaluate the rice seed sanitary quality, Bonança variety, and the reduction of plant pathogens, using seed microbiolization with *B. macerans*, *B. polymyxa*, *B. pentothenicus*, *B. lentus*, *B. pumilus*, *B. stearothermophilus* and *Bacillus* sp. and to the sanitary test it was used the *Blotter Test* method. Seeds microbiolized with a bacterial suspension in saline solution (NaCl 0,85 %), in the concentration of $OD_{540} = 0,5$ to each isolate, were scattered in filter paper and sowed in sterilized soil, in experiment conducted in laboratory and in greenhouse, with entirely randomized design. The parameters evaluated were incidence and reduction of pathogens in rice seeds and plants at seven and fourteen days after sowing. Seeds were evaluated by observation in binocular microscope to identify fungi colonies. About the plants, in each period, 100 plants were taken, which passed to usual aseptic and after that they were scattered in potato-dextrose-agar medium. The results obtained enabled to conclude: *in vitro* test of rice seed, Bonança variety, microbiolized with *Bacillus* spp. had the incidence of *Curvularia oryzae* and *Aspergillus niger* reduced. In the plants which came from seeds microbiolized with *Bacillus* spp. a reduction of *Curvularia oryzae*, *Aspergillus niger* and *Scopulariopsis* sp. incidence was observed. Isolates action was differentiated as for the pathogen and the period after the microbiolization of the seeds.

Key words: Biological Control, seed plant pathogen, rice.

INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é cultivado em aproximadamente 100 nações e nesses países quase toda a produção se destina ao consumo interno. Reservado quase que exclusivamente para a alimentação humana, este cereal constitui metade do regime alimentar de 2 bilhões de pessoas e, entre 25 % e 50 %, da dieta de outros 600 milhões (ALONÇO et al., 2005). No Brasil, o arroz assumiu grande importância social, econômica e política, desde os tempos coloniais, alcançando a condição de maior produtor no hemisfério ocidental (PEREIRA, 2002).

A introdução de um patógeno em uma nova área de cultivo e a disseminação dos mesmos a longas distâncias se dá principalmente através de sementes infectadas ou infestadas (MACHADO, 1988). Portanto, o aspecto sanitário das sementes é de grande importância para prevenção de doenças vinculadas potencialmente por seu intermédio. A transmissão por semente em um determinado campo pode originar uma quantidade inicial de inóculo suficiente para o desenvolvimento de uma epidemia capaz de reduzir o rendimento da cultura (SHAH, 2000).

Dentre os principais microrganismos patogênicos transmitidos pelas sementes, o grupo dos fungos é o mais numeroso, cerca de 50 espécies já relatadas (MACHADO et al., 2000). Dentre as doenças fúngicas se destacam a brusone (*Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc), mancha parda (*Dreschlera oryzae* (Breda de Hann) Subr. & Jain (sin. *Bipolaris oryzae*), mancha estreita (*Cercospora janseana* Miyek), escaldadura (*Microdochium oryzae* Hashioka Yokogi), queima das bainhas (*Rhizoctonia oryzae* Riker & Gooch) e manchas dos grãos (*Phoma* sp., *Dreschlera oryzae* Breda de Hann, *Curvularia lunata* (Wakker) Boedijn, *Nigrospora oryzae* Berk & Broome, *Alternaria* sp., *Fusarium* sp.). Na cultura do arroz, Amaral et al. (1985), aponta *Pyricularia grisea* e *Bipolaris oryzae* como os principais patógenos associados às sementes, seguidos de *Gerlachia oryzae*, *Cercospora janseana*, *Phoma* spp., dentre outros.

Diversas espécies de *Bacillus* são citadas como produtoras de antibióticos podendo secretar metabólitos comercialmente importantes como enzimas amilolíticas e enzimas proteolíticas (BETTIOL & GHINI, 1995). Lazzaretti et al. (1994) estudando o antagonismo de *Bacillus subtilis* aos principais patógenos associados a sementes, observaram a alta capacidade dos metabólitos produzidos por *B. subtilis* de inibirem os fungos patogênicos associados às sementes de feijão e trigo.

No manejo integrado de doenças, o tratamento sanitário das sementes é considerado uma das medidas mais recomendadas por controlar doenças na fase que antecede à implantação da cultura, possibilitando um menor uso de defensivos químicos, evitando problemas graves de poluição do ambiente (MACHADO et al., 2000). Portanto a busca do controle de fitopatógenos através de medidas que não afetem o equilíbrio do ambiente e nem causem dano à saúde humana e animal, se faz fundamental como mais uma alternativa para o controle de doença de plantas na busca de uma agricultura sustentável e com menor impacto ambiental.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a qualidade sanitária das sementes de arroz variedade Bonança e a incidência e redução de fitopatógenos em sementes e plantas a partir da microbiolização de sementes com *Bacillus* spp .

MATERIAL E MÉTODOS

Localização do experimento

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Fitopatologia e em casa de vegetação da Universidade Estadual do Maranhão – UEMA. As sementes utilizadas são da variedade Bonança e os isolados B6 (*Bacillus* sp.), B16 (*B. macerans*), B22 (*B. polymyxa*), B22’

(*B. pentothenticus*), B25 (*B. pumilus*), B31 (*B. cereus*), B32 (*B. stearothermophilus*), B33 (*B. polymyxa*), B35 (*B. pumilus*) e B41 (*B. cereus*) extraídos de folhas de arroz no Laboratório de Fitopatologia da UEMA.

Sanidade de Sementes

As amostras de sementes de arroz foram inicialmente desinfectadas por cinco minutos através de imersão em uma solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 1,5 % de cloro ativo, seguida de duas lavagens com água esterilizada. Em seguida, as sementes foram plaqueadas em placas de Petri, previamente desinfectadas por autoclavagem a 1 atm por 20 minutos e por exposição à luz ultravioleta (UV), durante 20 minutos, contendo três camadas de papel de filtro esterilizado e umedecido com água destilada esterilizada. Foram plaqueadas 400 sementes, de acordo com as regras de análise de sementes pré-estabelecidas (BRASIL, 1992), empregando-se 20 sementes por recipiente. As sementes foram incubadas em condições de fotoperíodo de 12 horas, à temperatura de aproximadamente 26 ± 5 °C, durante sete dias. O levantamento da população fúngica das sementes não germinadas e plântulas foi realizado com auxílio de microscópio estereoscópico (Zeiss com aumento de 50x), após sete dias do plaqueamento. As colônias desenvolvidas sobre as sementes e plântulas foram transferidas para meio BDA (Batata–Dextrose–Ágar), para viabilizar sua identificação.

Microbiolização de sementes de arroz variedade Bonança com *Bacillus* spp. para instalação de experimento *in vitro*.

Para avaliar a redução da incidência dos fitopatógenos em sementes de arroz, foi adotada a metodologia citada por Ludwig et al (2004) com modificações, que consiste em microbiolizar as sementes com os isolados de *Bacillus*, na forma de suspensão, adicionando-se solução salina (NaCl 0,85%) a cada um dos *Bacillus*, sendo a concentração ajustada para $OD_{540}=0,5$. As sementes foram imersas nesta suspensão e passaram por agitação durante 30 minutos à 25 °C, em recipientes contendo 100 sementes. Após esse procedimento as sementes foram plaqueadas, usando-se 100 sementes/*Bacillus* pelo método do papel de filtro em placas de Petri (BRASIL, 1992), incubadas à 26,5 °C, sob regime de fotoperíodo de 12 horas de luz/ 12 horas de escuro. A avaliação da incidência dos patógenos ocorreu após sete dias, examinando-se individualmente as sementes em microscópio estereoscópico para observação da incidência dos fitopatógenos.

O delineamento estatístico adotado foi inteiramente casualizado, com dez isolados e cinco repetições, sendo que cada placa de Petri com 20 sementes constituiu uma unidade experimental. A testemunha constou somente das sementes imersas na solução salina.

Microbiolização de sementes de arroz variedade Bonança com *Bacillus* spp. para instalação de experimento em casa de vegetação.

As sementes de arroz foram tratadas de acordo com a metodologia citada por Ludwig et al. (2004), descrita anteriormente. Após o tratamento com dez espécies de *Bacillus* spp., as sementes foram semeadas em 22 bandejas contendo solo autoclavado. Em cada recipiente semeou-se 200 sementes, distribuídas em quatro repetições, no delineamento inteiramente casualizado. As avaliações foram realizadas em duas épocas, aos 7 e 14 dias após a semeadura,

coletando-se 100 planta ao acaso, cuidadosamente, de modo a causar o mínimo de danos em seus órgãos. As plantas foram lavadas em água corrente para retirada do excesso de solo aderido ao sistema radicular e levadas ao laboratório. De cada planta, destacaram-se as glumas, raízes, colo, caule e folhas, em seguida fez-se assepsia do material em hipoclorito de sódio (1 %) por 3 min, seguido de lavagem com água esterilizada, e o plaqueamento das partes da planta em meio de cultura BDA, acrescido de antibiótico. O material foi incubado durante sete dias em condições ambiente do laboratório e fotoperíodo de 12 horas de luz/ 12 horas de escuro. Foi considerado infectado o órgão onde foi possível identificar colônia e/ou estruturas do fungo sob microscópio estereoscópico.

Os dados foram expressos em porcentagem de controle do fungo em função da incidência na planta, quando comparado a testemunha.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Germinação e sanidade das sementes de arroz variedade Bonança

As sementes de arroz cultivar Bonança obtiveram um percentual de germinação de 88 % e 32,75 % de sementes sadias (figura 1). No teste de sanidade foi detectado maior incidência de *Curvularia oryzae* (70,20 %), seguida de *Aspergillus flavus* (8,87 %), *Rhizoctonia* spp. (8,25 %), *Aspergillus fumigatus* (7,76 %), *Aspergillus niger* (3,33 %), e menor ocorrência de *Fusarium* spp. (1,60%) (Figura 1). Esses dados confirmam a potencialidade das sementes como transportadoras e transmissoras de um grande número de agentes fitopatogênicos. Em teste de sanidade com essa mesma variedade, Silva (2008) observou resultados semelhantes aos encontrados neste trabalho para a incidência de *Aspergillus* spp. e maior ocorrência de *Fusarium* spp. (29,25 %). A grande incidência de fitopatógenos em sementes de arroz também foi encontrada por Marassi et al (2008) que observaram, em trezentos e sessenta e cinco amostras representativas de diferentes

variedades de arroz, oriundas de diversos municípios maranhenses, a contaminação de 100 % das amostras, sendo o gênero *Aspergillus* e teleomorfos mais freqüente na microbiota isolada (68 %). Os mesmos autores citam que a grande incidência de fitopatógenos em sementes está relacionada às condições do clima tropical que apresenta altas temperaturas e níveis de umidade relativa do ar o que acelera a colonização dos grãos por fungos. Aliada a essa condição há também o armazenamento inadequado dos grãos que são utilizados para o consumo humano ou para plantios da próxima safra. De acordo com Reddy (2008), um dos grandes problemas da cultura do arroz é a presença de fungos produtores em potencial de micotoxinas, como espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. Em consequência do número e das espécies de patógenos encontradas nas sementes de arroz, nesta cultura podem ser encontradas uma série de micotoxinas, como as alatoxinas, aflatoxinas, ácido fusárico, ocratoxinas, citrinina e fumonisinas (PARK et al., 2005; HINOJO et al., 2006; NGUYEN et al., 2007; DINIZ, 2002), que podem representar um risco em potencial para o consumo dos grãos tanto para animais quanto para humanos. O fungo *Penicillium citreonigrum* produz a Citreoviridina, considerada uma micotoxina neurotóxica (STUBBLEFIELD et al., 1988), que interfere no metabolismo do tecido nervoso e muscular, competindo com a absorção de tiamina (vitamina B1) pelas células destes tecidos provocando deficiência desta vitamina, doença denominada beribéri (BRASIL, 2007).

As micotoxinas apresentam, entre outras, propriedades carcinogênicas, mutagênicas e teratogênicas (SANTOS et al., 2001).

As porcentagens de contaminação ou infecção de sementes podem ocorrer a níveis de 1 até 100 %, com ou sem consequências drásticas para a cultura (ANSELME, 1985). Contudo, os riscos estão sempre presentes, pois a probabilidade de transmissão, a partir de uma baixa porcentagem, pode ser compensada pela taxa de reprodução do patógeno (FAIAD et al., 1994). Outros problemas apontados por Bergamin Filho (2005) em relação a contaminação das sementes por patógenos são perdas na colheita e aumento dos custos de produção das lavouras em razão do controle das doenças, que por sua vez vão contribuir para a contaminação do solo e da água, tendo em vista a necessidade de aplicação de agroquímicos para o controle das doenças surgidas.

Avaliação da incidência e controle de fitopatógenos em sementes de arroz, pela microbiolização com *Bacillus spp.* em teste *in vitro*.

De acordo com os resultados obtidos, nas sementes microbiolizadas com *Bacillus spp.* houve diferença significativa na incidência de *Curvularia oryza*, *Fusarium sp* e *Rhizoctonia sp.* quando comparada com a testemunha. Em relação aos fungos *Aspergillus niger* e *Rhizopus stolonifer* não ocorreu diferença significativa na incidência entre a testemunha e os tratamentos com os *Bacillus* (tabela 01), porém observou-se que as médias do número de colônias de *A. niger* em todos os tratamentos foram menores que na testemunha.

Os resultados indicaram que a microbiolização das sementes com os isolados de *Bacillus spp.* controlou a incidência de *C. oryzae* sobressaindo-se as espécies *B. pentothenicus* (B22'), *B. stearothermophilus* (B32) e *B. pumilus* (B35) com 69,00 %, 61,57 % e 61,57 % de controle, respectivamente. Os patógenos *Fusarium sp.*, *Rhizoctonia sp.* e *R. stolonifer* não foram controlados pela maioria dos *Bacillus spp.* Em relação ao *A. niger*, todos os tratamentos controlaram o Patógeno, mesmo não apresentando estatisticamente diferença significativa na incidência (tabela 01 e 02). A partir desses resultados, foi possível inferir que, apenas uma parcela das bactérias do filoplano teve papel no controle de fitopatógenos em sementes de arroz. Corroborando com os resultados apresentados os autores Romeiro et al. (2000); Halfeld-Vieira et al. (2004); Macagnan (2001), demonstraram que a maioria dos *Bacillus* obtidos de filoplano não apresenta efeito contra os patógenos desafiantes e, em alguns casos podem até acentuar a severidade da doença.

Os resultados positivos de controle de fitopatógenos observados neste trabalho foram similares aos encontrados por Lazzaretti & Bettioli (1997) em que observaram redução

significativa nas populações de *D. oryza*, *P. oryza* e *Rhizosporium sativum* em sementes de arroz, tratadas com um produto formulado à base de células e de metabólitos de *Bacillus subtilis*.

Avaliação da incidência e controle de fitopatógenos em plantas de arroz, pela microbiolização com *Bacillus spp.*

Nas plantas, provenientes de sementes tratadas com *Bacillus*, aos sete dias houve diferença significativa entre a testemunha e os tratamentos na incidência de *Curvularia oryzae*, *A. niger* e *Scopulariopsis sp.*, sendo a média de incidência menor nos tratamentos com os *Bacillus* quando comparado com a testemunha, com exceção dos tratamentos com os isolados B6 para *C. oryzae*, B31 para *A. niger* e *Scopulariopsis sp.* e B33 para *A. niger*. Não ocorreu diferença significativa entre a testemunha e os tratamentos na incidência de *A. flavus* e *Penicillium sp.* Os isolados que proporcionaram menor incidência de fitopatógenos foram B31 para *C. oryzae*, B35 para *Scopulariopsis sp.*, ambos da espécie *B. pumilus* e B22' (*B. pentothenicus*), B41 (*B. cereus*) para *A. niger* (tabela 3). Nas plantas, aos 14 dias após a semeadura, a incidência de *C. oryzae*, *A. niger*, *A. flavus* e *Penicillium* não foi diferente entre a testemunha e os tratamentos com os *Bacillus*, com exceção dos tratamentos B22' e B35 para *C. oryzae*. Nesse período o fungo *Scopulariopsis sp.*, apresentou diferença significativa entre os tratamentos e a testemunha, os *Bacillus* que promoveram menor incidência desses fitopatógenos foram *B. macerans* (B16) e *B. polymyxa* (B33) (Tabela 04).

O fungo *Scopulariopsis sp.* de maior ocorrência nas plantas não ocorreu nas sementes em condições de laboratório, o que leva a crer que o cultivo no solo proporcionou condições favoráveis para a manifestação desse fungo, pois de acordo com Dhingra (2005) a umidade do

solo, individualmente ou em combinação com a temperatura, é um fator igualmente importante que determina a transmissão dos patógenos de sementes para a planta. A umidade do solo influencia a germinação dos esporos, que é muito importante no caso de esporos veiculados externamente.

Em relação ao controle da incidência de patógenos em plantas de arroz, os *Bacillus* spp. proporcionaram, melhor efeito aos sete dias após o tratamento das sementes, para os patógenos *C. oryza*, *Penicillium* sp. e *Scopulariopsis*, para os fungos *A. niger* e *A. flavus* o tratamento foi mais eficaz aos quatorze dias (Tabela 5).

Os *Bacillus* testados neste trabalho apresentam potencial para o controle da incidência de fitopatógenos nas sementes e plantas, merecendo mais estudos em relação ao tempo, pois foram testados aos sete e quatorze dias, não se observando sintomas nas plantas, que segundo Chung & Lee (1983), mesmo em elevada incidência na semente, o aparecimento de sintoma de doenças na plântula é muito baixa. Quanto à diminuição do efeito de bactérias biocontroladores, em trabalho realizado por Assis et al. (1997), testando isolados de *Bacillus* spp. contra *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, os pesquisadores observaram que no controle da podridão-negra das crucíferas, em diferentes períodos de aplicação em relação à inoculação com o patógeno, os melhores resultados foram obtidos com *B. subtilis* aplicado 4 dias antes + simultaneamente + 4 dias depois da inoculação. Portanto a eficácia dos *Bacillus* spp. está relacionada ao período de aplicação, segundo Kohl & Fokkema (1998) o período de tempo que o antagonista dispõe para interagir com o patógeno é um fator importante para o sucesso do biocontrole. Outro fator que pode ter interferido na ação das bactérias do filoplano é o mecanismo de interação entre patógeno e antagonista, de acordo com Rollemberg (2008) bactérias nativas do filoplano são capazes de interagir em fases específicas do desenvolvimento de patógenos foliares, podendo alterar sua fisiologia.

De acordo com os resultados alcançados pode-se afirmar que os *Bacillus* spp. apresentam efeito diferenciado de acordo com o patógeno e o tempo após a aplicação. E todas as espécies testadas *Bacillus* sp., *B. macerans*, *B. polymyxa*, *B.pentothenticus*, *B. lentus*, *B.pumilus*, *B. stearothermophilus* e *B. cereus*, de forma geral, apresentam potencial de uso como biocontroladores dos patógenos *Curvularia oryzae*, *Aspergillus niger* e *Scopulariopsis* sp.

CONCLUSÕES

Nas condições em que foi desenvolvido o presente trabalho pode-se concluir que:

- Em sementes de arroz variedade Bonança, tratadas e não tratadas, o patógeno de maior ocorrência foi *Curvularia oryzae*, sendo a taxa menor nas sementes microbiolizadas com *Bacillus* spp.
- Nas plantas originadas de sementes microbiolizadas com as bactérias ocorreu redução da incidência de *C. oryzae*, *A. niger* e *Scopulariopsis* sp.
- A microbiolização das sementes de arroz variedade Bonança com *B. macerans*, *B. polymyxa*, *B. pentothenicus*, *B. lentus*, *B. pumilus*, *B. stearothermophilus*, *B. cereus* e *Bacillus* sp., proporcionou controle de *C. oryzae* e *A. niger* em ensaios *in vitro*. Em testes *in vivo* o controle de *C. oryzae*, *Penicilium* sp. e *Scopulariopsis* nas plantas foi eficaz aos sete dias após o tratamento das sementes. Para os fungos *A. niger* e *A. flavus* o tratamento foi eficiente aos quatorze dias.
- As espécies de *Bacillus* estudadas apresentam potencial de uso para o biocontrole de patógenos do arroz e podem ser recomendados para ensaios de campo, que possam fundamentar o uso na agricultura.

REFERÊNCIAS

- ALONÇO, A. S.; SANTOS, A. B.; GOMES, A. S.; GRUTZMACHER, A. S et al. **Cultivo do arroz irrigado no Brasil**. EMBRAPA clima temperado. Nov 2005, ISSN 1808-9207 (Versão eletrônica). / Sistemas de produção.captia.embrapa.br/Fontes HTML/Arroz/Arroz Irrigado Brasil/Cap. 18.htm- 24 k. Acesso em: 25 nov. 2008.
- AMARAL, H. M.; FURLAN, S. H.; MENTEM, J.O. Localização de *Drechslera oryzae*, *Rhynchospodium 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.
- ANSELME, C. Mecanisme de la transmission des parasites par les semences et quelques aspects physiologique de la pathologie des semences. In: Curso de Patologia de Sementes, 3. Fortaleza, 1985. 8p. (mimeografado).
- ASSIS S.M.P.; MARIANO R.L.R.; MICHEREFF S.J.; COELHO R.S.B. Survival and redistribution of *Bacillus* spp., potential biocontrol agents of black rot, on kale phylloplane. In: Wenhua T, Cook RJ, Rovira A. (Ed) Advances in Biological control of Plant Diseases. Beijing, China. China Agricultural University Press., 1997, p. 374-379.
- BERGAMIN FILHO, A. Função de dano e epidemiologia de patógenos veiculados por sementes. In: Zambolim, L. **Sementes: qualidade fitossanitária**. Viçosa: UFV; DFP, 2005. p. 35-52.
- BETTIOL, W.; GHINI, R. Controle Biológico. In: BERGAMIN, A. F.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de Fitopatologia. Princípios e Conceitos**. 3.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. p.717-728.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Departamento Nacional de Defesa Vegetal. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 1992. 365p.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância Em Saúde. **Nota Técnica**. Brasília, 2007.
- CHUNG, H. S.; LEE, C.U. Detection and transmission of *Pyricularia oryzae* in germinating rice seed. **Seed Science and Technology**, Zürich, v.11, p.625-637. 1983.

DINIZ, S. S. S. **Micotoxinas**. São Paulo: Livraria e Editora Rural Ltda, 2002.

DHINGRA, O. D. Teoria da transmissão de patógenos fúngicos por sementes. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Sementes: qualidade fitossanitária**. Viçosa: UFV - DFP, 2005. p.75- 134.

FAIAD, M. G. R.; MACHADO, J. C.; VIEIRA, M. G. G. C.; CORNÉLIO, V. M. O. Efeitos e transmissibilidade de *Pyricularia oryzae* cav. Em sementes de arroz (*oryza sativa* L.) sob condições controladas. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.16, n.1, p.45-49, 1994.

HALFELD-VIEIRA, B. A.; ROMEIRO, R. S.; MIZUBUTI, E. S. G. Métodos de isolamento de bactérias do filoplano de tomateiro visando populações específicas e implicações como agentes de biocontrole. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, n.6, p.638-643, 2004.

HINOJO, M. J.; MEDINA, A.; VALLE-ALGARRA, F. M.; GIMENO-ADELANTADO J. V.; JIMÉNEZ, M.; MATEO, R. Fumonisin production in rice cultures of *Fusarium verticillioides* under different incubation conditions using an optimized analytical method. **Food Microbiology**, v.23, n.2, p. 119–127, 2006.

KOHL, J.; FOKKEMA, N. J. **Strategies for biological control of necrotrophic fungal foliar pathogens**. In: Boland, G. J.; Kuykendall, L. D. (Eds). Plant-microbe interactions and biological control. New York Basel Hong Kong: Marcel Dekker, Inc., 1998. p.49-88.

LAZZARETTI, E.; BETTIOL, W. Tratamento de sementes de arroz, trigo, feijão e soja com um produto formulado à base de células e de metabólitos de *Bacillus subtilis*. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.54, n.1-2, Jan./Aug., 1997.

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

LUDWIG, J.; MOURA, A. B.; SANTOS, A. S.; LORENSI, J. Incidência de *Gerlachia oryzae* em lotes de sementes microbiolizadas com isolados de bactérias biocontroladoras. SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 8, 2004, João Pessoa, **Anais...**João Pessoa, 2004. p. 184.

MACAGNAN, D. **Seleção de procariotas residentes de filoplano visando o biocontrole da vassoura-de-bruxa do cacauero (*Theobroma cacao* L.) incitada por *Crinipellis pernicios* (Stahel) Singer.**, Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2001. 57p. (Dissertação de Mestrado).

MACHADO, J. C. **Patologia de sementes: fundamentos e aplicações.** Brasília: MEC/ESAL/FAEPE, 1988. 107p.

MACHADO, J. C.; COUTINHO, W. M.; PEREIRA, L. A.A.; MAGALHÃES, F.H.L.; PENA, R. da C. M.; VIEIRA, M. das G.G.C. Qualidade fisiológica de sementes de arroz em função da ocorrência diferenciada de *Drechslera oryzae*. **Ciência e Agrotecnologia**, v.24, n.1, jan/mar 2000. Disponível em: <http://www.editora.ufla.br/revista/24_1/art16.pdf>Acesso em: 3 maio 2008.

MARASSI, A. C.; BARBOSA, T. S.; KELLER, L. A. M.; RODRIGUES, M. A. A.; KRUGER, C. D.; ROSA, C. A. R. Microbiota isolada de amostras de arroz provenientes do Estado do Maranhão destinadas ao consumo humano, em áreas de ocorrência de beribéri. **Revista Ciência Vida**. Seropédica, RJ, EDUR, v.28, **suplemento**, 2008.

NGUYEN, M. T.; TOZLOVANU, M.; TRAN, T. L.; PFOHL-LESZKOWICZ, A. Occurrence of aflatoxin B1, citrinin and ochratoxin A in rice in five provinces of the central region of Vietnam. **Food Chemistry**. v.105, n. 1, p.42–47, 2007.

PARK, J. W. T.; SANG-YOUN, C.; HWANG, H. -J.; KIM, Y. -B. Fungal mycoflora and mycotoxins in Korean polished rice destined for humans. **International Journal of Food Microbiology**, v.103, n.3, p.305-314, 2005.

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

ROMEIRO, R. S.; NEVES, D. M. S.; CARVALHO, M. G.; CARRER FILHO, R. Seleção de bactérias residentes de filoplano de tomateiro como agentes de biocontrole de enfermidades da parte aérea da cultura. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v.26, p.220-224, 2000.

REDDY, K. R. N.; REDDY, C. S.; MURALIDHARAN, K. Potential of botanicals and biocontrol agents on growth and aflatoxin production by *Aspergillus flavus* rice grains. **Food Control**. Impress, doi:10.1016/j.foodcont.2008.03.009, 2008.

ROLLEMBERG, C. L. **Mancha das folhas da macieira: caracterização fisiológica dos agentes causais, controle biológico com bactérias residentes de filoplano e sensibilidade dos antagonistas a fungicidas e inseticidas.** Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2008. 120p. (Dissertação Mestrado).

SANTOS, C. C. M.; LOPES, M. R. V.; KOSSEKI, S. Y. Ocorrência de aflatoxinas em amendoim e produtos de amendoim comercializados na região de São José de Rio Preto/SP. Revista do Instituto Adolfo Lutz, v.60, n.2, p.153-157, 2001.

SILVA, L. L. S. **Quantificação da transmissão de fungos associados às sementes de arroz.** 2008. 37f. Monografia (graduação), Agronomia, Universidade Estadual do Maranhão, São Luís-MA, 2008.

SHAH, D.A.; BERGSTROM, G.C.; FERNANDES, J.M.C. Epidemiologia e manejo de patógenos transmitidos por sementes, com ênfase nos fungos que formam picnídios. In: LUZ, W.C.; FERNANDES, J.M.; PRESTES, A.M.; PICININI; E.C. Revisão Anual de Patologia de Plantas, Passo Fundo. v. 8., 2000. p.339-364.

STUBBLEFIELD, R. D.; GREER, J. I.; SHOTWELL, O. L. Liquid chromatographic method for determination of citreoviridin in corn and rice. **J. AOAC**, v.71, n.4, p.721-724, 1988.

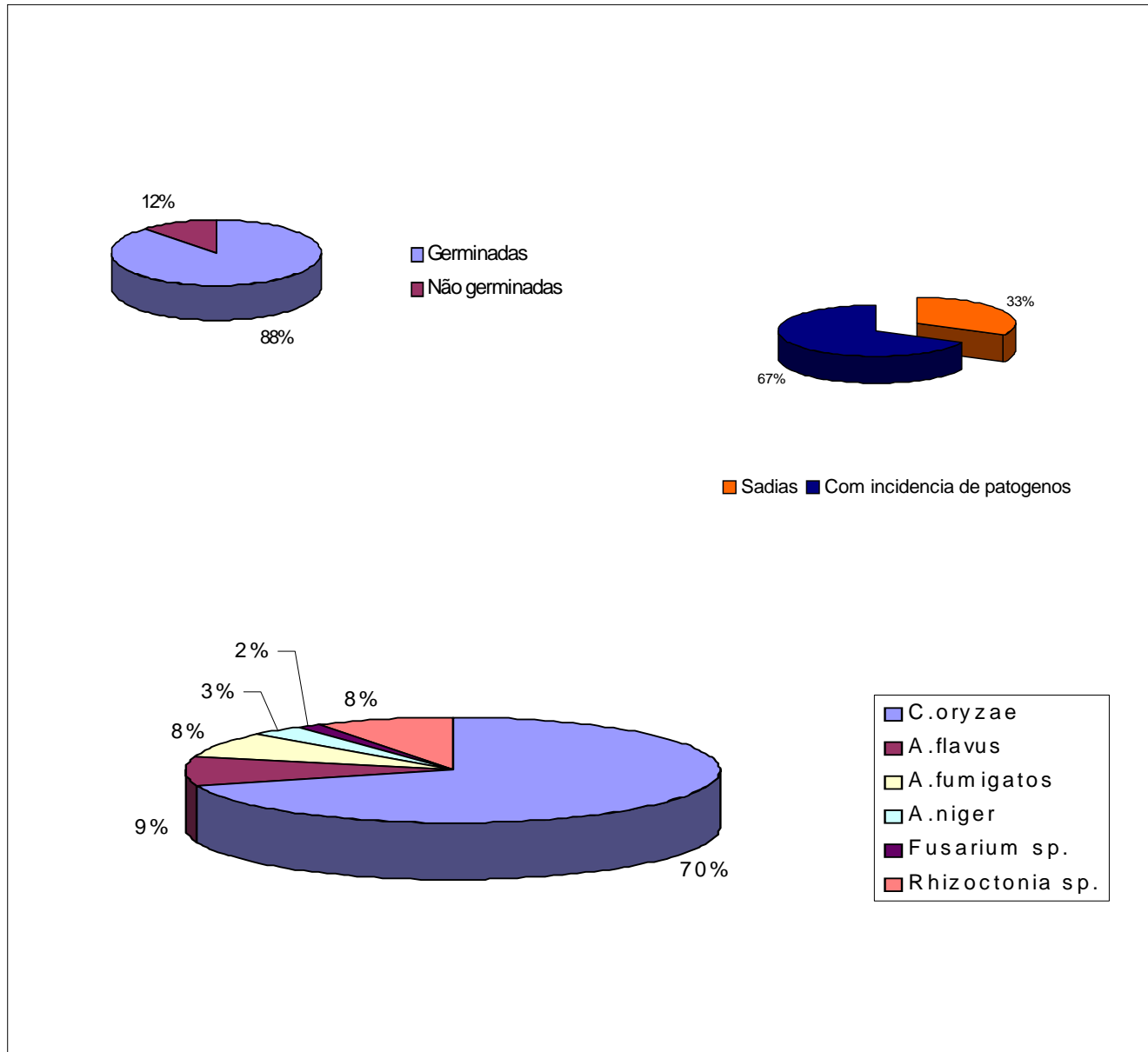


Figura 01 – Percentagem de Germinação de sementes de arroz ‘Bonança’ e incidência de patógenos nas sementes infestadas naturalmente e sem tratamento no blotter test. São Luís – MA, 2008.

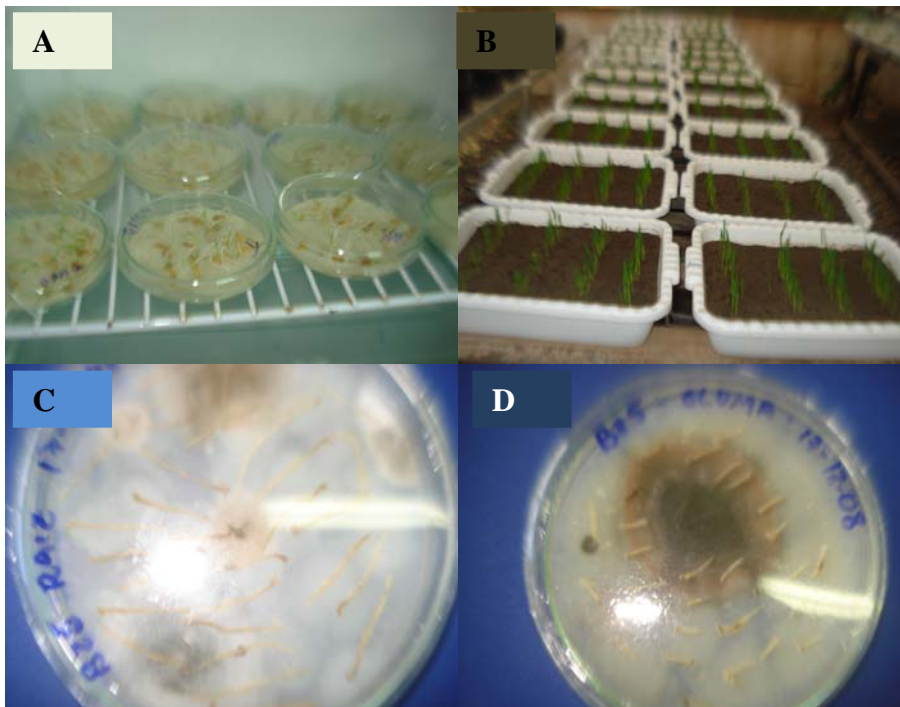


Figura 2: Avaliação da incidência de patógenos. A – Experimento *in vitro* em BOD. B – Experimento em casa de vegetação. C e D – Isolamento dos órgãos da planta em meio de cultura. São Luís, 2008.

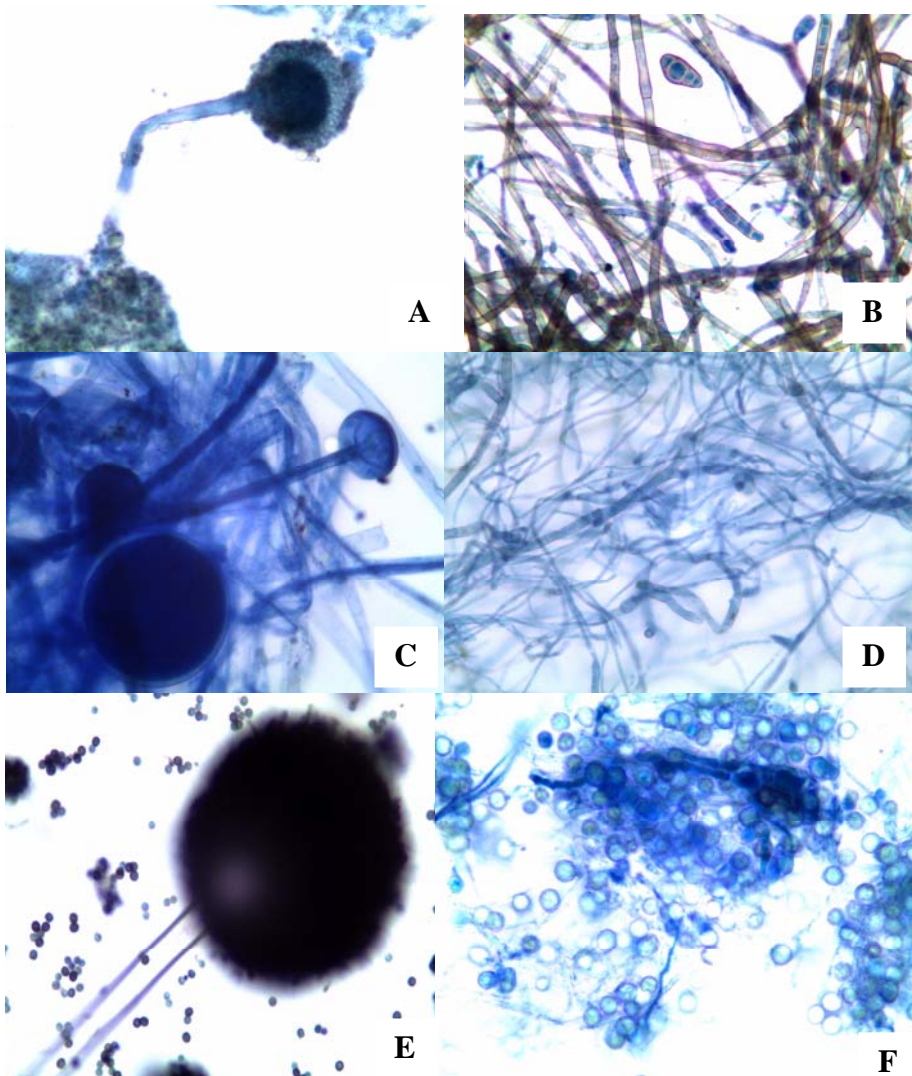


Figura 3. Fungos detectados em sementes e plantas de arroz variedade Bonança. A – *A. flavus*. B – *C. oryzae*. C - *Rhizopus stolonifer*. D – *Rhizoctonia* sp. E – *A. niger*. F – *Scopulariopsis* sp. Laboratório de Fitopatologia-UEMA, São Luís, 2008.

Tabela 01 – Incidência de patógenos em sementes de arroz microbiolizadas com *Bacillus*, sete dias após a semeadura. São Luís– MA, 2008.

Tratamento	Incidência (média n° colônia)					Média
	<i>C. oryzae</i>	<i>Fusarium</i> sp.	<i>A. niger</i>	<i>Rhizoctonia</i> sp.	<i>Rhizopus</i> <i>stolonifer</i>	
T	2,29 aA	1,17 abB	1,43 aAB	1,11 bcdB	0,88 aB	6,88
B6	1,60 abA	0,71 bA	0,71 aA	1,35 bcdA	0,92 aA	5,29
B16	1,23 abAB	0,88 bAB	0,71 aB	1,93 bcdA	0,71 aB	5,46
B22	1,16 abAB	0,71 bB	0,71 aB	2,26 abA	0,71 aB	5,55
B22'	0,71 bA	0,71 bA	0,71 aA	0,94 cdA	0,71 aA	3,78
B25	2,21 aA	2,37 aA	0,71 aB	1,33 bcdAB	0,71 aB	7,33
B31	1,66 abAB	1,52 abAB	0,71 aB	2,21 abcA	1,03 aB	7,13
B32	0,88 bA	1,32 abA	0,71 aA	0,71 dA	1,61 aA	4,62
B33	1,15 abA	0,71 bA	0,81 aA	0,71 dA	1,03 aA	5,02
B35	0,88 bB	0,88 bB	0,90 aB	3,33 aA	0,71 aB	6,70
B41	1,55 abA	1,25 abA	0,71 aA	1,15 bcdA	0,71 aA	5,37
Média	1,39	1,11	0,80	1,55	0,88	5,74
Incidência	24,22	19,34	13,94	27,00	15,33	

(%)

*T= testemunha; B6= *Bacillus* sp.; B16= *B. macerans*; B22, B33= *B. polymyxa*; B22'= *B. pentothenicus*; B25, B31, B35= *B. pumilus*; B32= *B. stearothersophilus*; B41= *B. cereus*.

Valores seguidos da mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% .Valores transformados para $\sqrt{x+0,5}$. CV = 55,23.

Tabela 02 – Percentagem de controle de patógenos em semente de arroz variedade Bonança microbiolizadas com *Bacillus*, sete dias após o plaqueamento. São Luís – MA, 2008.

Tratamento	Controle (%)				
	<i>C.oryzae</i>	<i>Fusarium</i> sp.	<i>A. niger</i>	<i>Rhizoctonia</i> sp.	<i>Rhizopus</i> <i>stolonifer</i>
T	0	0	0	0	0
B6	30,13	39,32	50,35	NC	NC
B16	46,29	24,79	50,35	NC	19,32
B22	49,34	39,39	50,35	NC	19,32
B22'	69,00	39,39	50,35	15,32	19,32
B25	3,49	NC	50,35	NC	19,32
B31	27,51	NC	50,35	NC	NC
B32	61,57	NC	50,35	36,04	NC
B33	49,78	NC	43,36	36,04	NC
B35	61,57	24,79	37,06	NC	19,32
B41	32,31	NC	50,35	36,04	19,32

*T= testemunha; B6= *Bacillus* sp.; B16= *B. macerans*; B22,B33= *B. polymyxa*; B22'= *B. pentothenticus*; B25, B31, B35= *B. pumilus*; B32= *B. stearothermophilus*; B41= *B.cereus*.

NC = não controlou

Tabela 03 – Incidência de patógenos em plantas de arroz Variedade Bonança, aos sete dias após a semeadura, a partir de sementes microbiolizadas com *Bacillus*. São Luís – MA, 2008.

Tratamento	Incidência (media nº de colônia)				
	<i>C. oryzae</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. flavus</i>	<i>Penicilium sp.</i>	<i>Scopulariopsis sp.</i>
T	3,2 aB	1,5 abC	1,3 aC	1,1 aC	5,9 aA
B6	3,4 aBC	2,4 aCD	0,7 aE	0,9 aE	4,7 abcA
B16	2,5 abC	1,1 abD	0,7 aD	0,7 aD	4,1 bcdAB
B22	2,1 abcC	1,2 abCD	0,7 aD	0,7 aD	3,5 deB c
B22'	1,6 bcC	0,7 bC	1,5 aC	0,7 aC	3,4 cdeB
B25	2,1 abcBC	1,5 abCD	1,5 aCD	0,7 aD	3,1 deAB
B31	0,9 cC	1,9 abC	1,5 aC	0,7 aC	6,2 aA
B32	2,5 abBC	1,3 abCD	0,7 aD	0,9 aD	2,7 eB
B33	1,1 bcB	1,3 abB	1,0 aB	0,9 aB	5,5 abA
B35	2,1 abcB	0,9 bBC	1,0 aBC	0,7 aC	0,7 fC
B41	2,1 abcC	0,7 bD	0,7 Ad	0,9 aCD	4,1 cdeB
Média	2,15	1,32	0,96	0,81	3,99
Incidência (%)	23,37	14,37	10,43	8,80	43,37

*T= testemunha; B6= *Bacillus* sp.; B16= *B. macerans*; B22, B33= *B. polymyxa*; B22'= *B. pentothenticus*; B25, B31, B35= *B. pumilus*; B32= *B. stearothermophilus*; B41= *B. cereus*.

Valores seguidos da mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade (< 0,01). Valores transformados para $\sqrt{x+0,5}$. CV (%) = 20,80.

Tabela 04 –Incidência de patógenos em plantas de arroz ‘Bonança’, aos quatorze dias após a semeadura, a partir de sementes microbiolizadas com *Bacillus*. São Luís – MA, 2008.

Tratamento	Incidência (media nº de colônia)				
	<i>C. oryzae</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. flavus</i>	<i>Penicilium sp.</i>	<i>Scopulariopsis sp.</i>
T	3,9 abCD	2,1 aDE	1,7 aE	1,8 aDE	8,0 aA
B6	3,7 abCD	1,9 aDE	0,8 aE	2,3 aDE	8,0 aA
B16	3,2 abBC	1,6 aC	1,7 aBC	1,3 aC	5,5 bA
B22	3,8 abB	1,6 aC	1,3 aC	1,3 aC	8,9 aA
B22'	2,2 bCD	1,5 aD	1,1 aD	1,6 aD	9,1 aA
B25	3,3 abB	1,4 aBC	0,7 aC	1,5 aBC	8,0 aA
B31	4,3 abBC	1,4 aD	0,7 aD	2,0 aD	7,2 abA
B32	3,5 abB	1,7 aBC	1,1 aC	1,1 aC	7,5 abA
B33	4,1 abA	1,3 aB	1,1 aB	1,4 aB	5,5 bA
B35	4,6 aB	2,6 aBC	0,9 aC	2,7 aBC	7,9 aA
B41	3,8 abB	1,4 aC	1,2 aC	1,7 aBC	7,7 abA
Média	3,67	1,68	1,12	1,70	7,65
Incidência	23,20	10,62	7,08	10,75	48,36

(%)

*T= testemunha; B6= *Bacillus sp.*; B16= *B. macerans*; B22,B33= *B. polymyxa*; B22'= *B.pentothenticus*; B25, B31, B35= *B.pumilus*; B32= *B. stearothermophilus*; B41= *B.cereus*.

Valores seguidos da mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade (< 0,01). Valores transformados para $\sqrt{x+0,5}$. CV (%) = 25,53.

Tabela 05 – Percentagem de controle de patógenos em plantas de arroz ‘Bonança’, aos 7 e 14 dias após a semeadura, a partir de sementes microbiolizadas com *Bacillus*. São Luís – MA, 2008.

Tratamento	Período	Controle (%)				
		<i>C. oryzae</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. flavus</i>	<i>Penicilium</i> sp	<i>Scopulariopsis</i> sp
T	7 DIAS	0	0	0	0	0
B6		NC	NC	46,15	18,18	20,34
B16		21,88	26,67	46,15	46,15	30,51
B22		34,38	20,00	46,15	46,15	40,68
B22'		50,00	53,33	NC	46,15	42,37
B25		34,38	NC	NC	46,15	47,46
B31		71,88	NC	NC	46,15	NC
B2		21,88	13,33	46,15	18,18	54,24
B33		65,63	13,33	23,08	18,18	6,78
B35		34,38	40,00	23,08	46,15	88,14
B41		34,38	53,33	46,15	18,18	30,51
T	14 DIAS	0	0	0	0	0
B6		5,13	9,52	52,94	NC	NC
B16		17,95	23,81	NC	27,78	31,25
B22		2,56	23,81	23,53	27,78	NC
B22'		43,59	28,57	35,29	11,11	NC
B25		15,38	33,33	58,82	16,67	NC
B31		NC	33,33	58,82	NC	10,00
B2		10,26	19,05	35,29	38,89	6,25
B33		NC	38,10	35,29	22,22	31,25
B35		NC	NC	47,06	NC	1,25
B41		2,56	33,3	29,41	5,56	3,75

*T= testemunha; B6= *Bacillus* sp.; B16= *B. macerans*; B22,B33= *B. polymyxa*; B22'= *B.pentothenticus*; B25, B31, B35= *B.pumilus*; B32= *B. stearothermophilus*; B41= *B.cereus*.

CONCLUSÕES GERAIS

CONCLUSÕES GERAIS

- O filoplano se constitui numa fonte de diversidade de *Bacillus* spp., sendo a variedade da cultura e as condições ambientais, fatores preponderantes na variação das espécies obtidas.

- Os métodos de seleção *in vitro* interferem nos resultados de inibição do crescimento micelial do patógeno, sendo necessário uma pré-avaliação de métodos a serem utilizados nestes testes. Os resultados obtidos demonstram que a inibição do crescimento micelial do fungo *Pyricularia grisea* foi favorecido pelos métodos de Uma Risca Central e o do Círculo.

- O controle biológico com *Bacillus* spp. tem eficiência diferenciada no controle dos patógenos da cultura de arroz, dependendo do tempo, após o tratamento e das condições ambientais existentes.

- Há diferenciação na incidência de patógenos em testes *in vitro* e casa de vegetação. Neste trabalho houve a incidência de fungos nas plantas que não ocorreu nas sementes em testes *in vitro*, sendo a incidência dependente das condições ambientais, tais como umidade do solo e do ar.

- Os experimentos demonstraram que dos dezoito isolados bacterianos, quinze foram capazes de inibir o crescimento micelial de *Pyricularia grisea* em testes *in vitro*. Dez isolados bacterianos foram capazes de reduzir a incidência de patógenos veiculados por sementes de arroz em ensaios *in vitro* e em casa de vegetação.

ANEXOS

MÉTODOS DE PAREAMENTO UTILIZADOS EM ENSAIOS *IN VITRO*.

Método de três risca



Método de uma risca central



Método do círculo



Método do ponto

Revista Brasileira de Sementes

ISSN 0101-3122 *versão impressa*
ISSN 1806-9975 *versão on-line*

INTRUÇÕES AOS AUTORES

- [Escopo e política](#)
- [Forma e preparação de manuscritos](#)

Escopo e política

Serão aceitos para publicação trabalhos científicos originais, revisões de conjunto, notas prévias, ainda não publicados nem encaminhados à outra revista para o mesmo fim.

Pelo menos a metade dos autores deverá ser sócio da ABRATES e estar, rigorosamente, em dia com a taxa da anuidade.

Os dados, opiniões e conceitos emitidos nos artigos, bem como a exatidão das referências bibliográficas, são de inteira responsabilidade do(s) autor(es). A eventual citação de produtos e marcas comerciais não significa recomendação de seu uso pela ABRATES. Contudo, o EDITOR, com assistência da Comissão Editorial e dos Assessores Científicos, reservar-se-á o direito de sugerir ou solicitar modificações aconselháveis ou necessárias.

Originais. Na elaboração dos originais, deverão ser atendidas as seguintes normas:

Informações

Gerais

Os trabalhos deverão ser apresentados digitados em *linhas numeradas em espaço duplo* e com margens de 2cm, utilizando fonte Times New Roman 14 para o título, com letras maiúsculas e 12 para o texto, que deverão ser escritos corridamente, sem intercalação de tabelas e figuras que, feitas separadamente, serão anexadas ao final do trabalho; para REFERÊNCIAS, RESUMO e ABSTRACT serão iniciadas páginas novas, mesmo que haja espaço na anterior; *as páginas*

ordenadas em texto, tabelas e figuras serão numeradas seguidamente; as páginas com texto não deverão exceder 30 linhas. O texto não deve exceder um total de 20 páginas, incluindo as ilustrações (figuras e tabelas), o que equivale aproximadamente a oito páginas, na configuração final do trabalho. No caso do trabalho exceder oito páginas, será cobrada do(s) autor(es) uma taxa de R\$ 100,00 (cem reais) por página adicional.

A digitação do trabalho deverá ser feita utilizando-se o editor de texto *Word for Windows* com o arquivo no formato *rtf* e os gráficos em programas compatíveis com o *WINDOWS*, como o *EXCEL*, e formato de imagens: *CDR, TIFF, WMF, GIF e JPEG*. No caso de desenhos, mapas e fotografias, enviá-las em alta qualidade, e em arquivo separado (nos formatos mencionados acima), portanto fora do texto do trabalho propriamente dito.

A redação dos trabalhos deverá apresentar concisão, objetividade e clareza, com a linguagem no passado impessoal; no texto, os sinais de chamadas para as notas de rodapé serão números arábicos colocados em sobrescrito, após a palavra ou a frase que motivou a nota; a numeração será uma só e em números contínuos; as notas serão colocadas ao pé da página em que estiver o respectivo sinal de chamada; todas as tabelas e todas as figuras deverão ser mencionadas no texto; no RESUMO e no ABSTRACT não serão permitidos parágrafos, bem como a apresentação de dados em colunas ou em quadros e a inclusão de citações bibliográficas.

O(s) nome(s) do(s) autor(es) deverá(ão) ser mencionado(s) por extenso logo abaixo do título. No rodapé da primeira página, através de chamadas apropriadas, deverá ser feita menção ao patrocinador, caso tenha havido subvenção à execução do trabalho, citar se for o caso, dissertação de mestrado ou tese de doutorado do primeiro autor, trabalho apresentado em Reuniões Científicas e à filiação científica do(s) autor (es), mencionado Departamento ou Seção, Instituição, Caixa Postal, CEP, Município, Estado e o e-mail de cada autor.

Siglas e abreviaturas dos nomes de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no trabalho, serão colocadas entre parênteses e precedidas do nome por extenso;

Forma e preparação de manuscritos

Organização dos trabalhos

Os trabalhos deverão ser organizados em TÍTULO RESUMIDO (colocado centralizado no início da

primeira página com no máximo 75 caracteres), TÍTULO, RESUMO, ABSTRACT, INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO, CONCLUSÕES, AGRADECIMENTOS E REFERÊNCIAS. Serão necessários no RESUMO e no ABSTRACT os “Termos para indexação / Index terms”.

Citações no Texto. As citações de autores, no texto, são feitas pelo sobrenome com apenas a primeira letra em maiúsculo, seguida do ano de publicação. No caso de dois autores, são incluídos os sobrenomes de ambos, intercalado por “&”, havendo mais de dois autores, é citado apenas o sobrenome do primeiro, seguindo de “et al.”. Em caso de citação, deve-se obedecer a seguinte ordem: - o autor não consultado deve aparecer em primeiro lugar seguido da expressão “citado por” e o sobrenome do autor da obra consultada, seguido da data de publicação. No caso de duas ou mais obras do(s) mesmo(s) autor (es), publicadas no mesmo ano, elas devem ser identificadas por letras minúsculas (a, b, c, etc.), colocadas imediatamente após o ano de publicação. Comunicações pessoais, trabalhos em andamento e inéditos devem ser citados no rodapé, não devendo aparecer nas Referências. Evitar sempre que possível, utilizar texto de autor não identificável.

Referências. As referências bibliográficas devem ser apresentadas em ordem alfabética pelo sobrenome do autor ou do primeiro autor, sem numeração; mencionar todos os autores do trabalho separados por “;”. Seguir as normas da ABNT NBR6023. Alguns exemplos são apresentados a seguir:

- **Artigos de Periódicos:**

SANTOS, V.L.M.; BANCI, C.A.; CALIL, A.C.; MENDOZA, R.M.; SILVA, R.F.; SANTOS, C.M. Utilização do teste de tetrazólio na avaliação da germinação e do vigor de sementes de algodão (*Gossypium hirsutum* L.), como um teste complementar ao teste de germinação. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.14, n.2, p.155-159, 1992.

- **Artigos de Anais ou Resumos:**

ANDREOLLI, D.M.C.; GROTH, D.; RAZERA, L.F. Qualidade fisiológica de sementes de café (*Coffea canephora* L.) cv. Guarani após secagem natural e artificial. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA AGRÍCOLA, 20, Londrina, 21/26 jul. 1991. **Anais**. Londrina: SBEA/IAPAR/UDEL, 1991. v.2, p.1453-1466.

- **Livros:**

POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente**. Brasília: AGIPLAN, 1985. 289p.

BRASIL. Ministério da Agricultura e da Reforma Agrária. Regras para análise de

sementes. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 1992. 365p.

- **Capítulo de Livro:**

ROBERTS, E.H.; KING, M.W.; ELLIS, R.H. Recalcitrant seeds: their recognition and storage. In: HOLDEN, J.H.W.; WILLIAMS, J.F. (eds.). **Crop genetic resources: conservation and evaluation**. London: Allen and Unwin, 1984. p.38-52.

- **Dissertações e Teses:**

FAGUNDES, S.R.F. **Latent effects of mechanical injury on soybean seed (*Glycine max* (L.) Merrill)**. Mississippi State: Mississippi State University, 1971. 80p. (Dissertação Mestrado) ou (Tese Doutorado).

- **Artigos com autor anônimo:**

Anônimo. Novas técnicas - Revestimento de sementes facilita o plantio. **Globo Rural**, v.9, n.107, p.7-9, 1994.

- **Artigo de revista não científica:**

KRZYZANOWSKI, F.C.; FRANÇA-NETO, J.B.; HENNING, A.A. Relato dos testes de vigor para as grandes culturas. **Informativo ABRATES**, Londrina, v.1, n.2, p.15-50, 1991.

- **Leis, Decretos, Portarias:**

País ou Estado. Lei, Decreto, ou Portaria nº .../ano, de (dia) de (mês) de (ano). Órgão que publicou (Secretaria da ..., ou Ministério da ...). **Diário Oficial da União**, local de publicação, data mês e ano. Seção ..., p.

- **Relatório Técnico:**

FRANÇA-NETO, J.B.; HENNING, A.A.; COSTA, N.P. Estudo da deterioração da semente de soja no solo. In: RESULTADOS DE PESQUISA DE SOJA 1984/85. Londrina: EMBRAPA/CNPSo, 1985. p.440-445.

Tabelas. As tabelas numeradas consecutivamente com algarismos arábicos, recebendo a denominação de TABELA, devem ser encabeçadas por um título conciso e claro, com letras minúsculas, não devendo ser usadas linhas verticais para separar colunas. Quando for o caso, as tabelas deverão ter indicação de fonte.

Figuras. As figuras (gráficos, desenhos, mapas ou fotografias) deverão ser numeradas consecutivamente em algarismos arábicos e deverão, obrigatoriamente, ser executadas em programas compatíveis com o **WORD FOR WINDOWS**; os desenhos e fotografias deverão ser escaneados, com alta qualidade e **enviados/apresentados no tamanho que devem ser publicados na revista.**

As legendas deverão ser digitadas logo abaixo da figura e iniciar com a denominação de FIGURA, seguida do respectivo número e texto, em minúsculos; havendo possibilidade de dúvida, deverá ser indicada a parte superior da figura. **As figuras poderão ser impressas em cores, quando requeridas, cabendo ao(s) autor(es) o pagamento do acréscimo do custo.**

Toda correspondência com a RBS deverá ser feita preferivelmente via internet, portanto, o trabalho deverá ser encaminhado eletronicamente ao EDITOR através do e-mail da revista, ou em disquete através do endereço postal da EDITORIA da Revista.

O EDITOR após avaliação preliminar do trabalho poderá aceitá-lo ou não para publicação. Sendo aceito previamente o trabalho, o EDITOR designará um EDITOR ASSOCIADO, por área de especialidade, que procederá a editoração com o auxílio de pelo menos dois ASSESSORES CIENTÍFICOS DA RBS, tendo as mesmas prerrogativas de aceitar ou não o trabalho para publicação. O EDITOR ASSOCIADO manterá contato com o(s) autor(es) até a obtenção da versão final por parte deste(s). Depois de revisado e aprovado o(s) autor(es), encaminhará(ão) eletronicamente ao EDITOR ASSOCIADO que fará a avaliação final do trabalho, sua aprovação e encaminhará ao EDITOR para avaliação, composição e publicação.

Os artigos serão publicados conforme a ordem de aprovação.

As orientações explicitadas nessas instruções deverão ser seguidas plenamente pelo(s) autor(es).

Tropical Plant Pathology – Fitopatologia Brasileira ISSN 1982-5676

Instruções para Autores

Versão 15 feb 2008

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".

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 considerados em consonância com o escopo da revista serão avaliados por um Editor Associado 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

1 Manuscritos devem ser enviados para:

Ludwig H. Pfenning, Editor Chefe
Tropical Plant Pathology – Comissão Editorial
Universidade Federal de Lavras
Cx. Postal 3066
37200-000 Lavras MG

2 Documentos necessários para submissão de manuscrito:

- a) Uma carta de encaminhamento, assinada por todos os autores, declarando a sua anuência com a submissão do manuscrito e que a matéria não está sendo avaliada nem publicada em outro periódico;
- b) Declaração de transferência de direitos autorais à Editora, disponível na página da revista na Web;
- c) Uma versão impressa do manuscrito, incluindo fotografias e demais elementos gráficos;
- d) Cópia digital do texto e tabelas em plataforma Windows, Figuras em TIFF or JPEG, gravadas em arquivos separados. (Para Figuras, veja também instruções detalhadas no item 3.1.h.) CD's e disquetes devem ser identificados com o nome e sobrenome do primeiro autor;
- e) Comprovante de depósito da taxa de tramitação no valor de R\$ 50, em favor de Banco do Brasil, agência 0364-6, conta no. 36.981-0.

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.

3 Formatos

3.1 Artigo Científico

O texto do manuscrito deve ser redigido em Inglês, 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. Manuscritos redigidos em Português ou Espanhol também serão aceitos.

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; título resumido de até 35 caracteres com espaços; 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. Todos os manuscritos incluem também um Resumo em português. Manuscritos redigidos em português ou espanhol incluem também um Abstract em inglês.

c) O **texto** deve ser redigido da forma mais sucinta e objetiva possível. 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., 1966a, 1966b, 2000). 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.

O texto 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.

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 não são aceitos como referência. Os autores devem evitar a citação de Teses e Resumos.

“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, Kylo 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*. 5th 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^a. 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

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 (Dezember 12, 2007)

LEM Software, 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. Para submissão, veja item 2 (Submissão de manuscrito).

j) **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

Fungos: Index Fungorum, www.speciesfungorum.org/Names/Names.asp

Bactérias: www.isppweb.org/names_bacterial.asp

Nematóides: 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.

3.2 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.

3.3 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.

3.4 Artigo de revisão

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

4 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.

5 Separatas

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

6 Autoria

Quem submete manuscritos para **Tropical Plant Pathology – Fitopatologia Brasileira** 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.