Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

Isolamento de micro-organismos antagonistas de solo para o controle de *Bipolaris oryzae*, agente causal da mancha parda em arroz

Dayson Fernando Ribeiro Brandão

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Fitopatologia

Piracicaba
2017

Dayson Fernando Ribeiro Brandão
Engenheiro Agrônomo

Isolamento de micro-organismos antagonistas de solo para o controle de *Bipolaris oryzae*,
agente causal da mancha parda em arroz

Orientador:
Prof. Dr. **SÉRGIO FLORENTINO PASCHOLATI**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Fitopatologia

Piracicaba
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Brandão, Dayson Fernando Ribeiro

Isolamento de micro-organismos antagonistas de solo para o controle de *Bipolaris oryzae*, agente causal da mancha parda em arroz / Dayson Fernando Ribeiro Brandão. - - Piracicaba, 2017.

78 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Controle biológico 2. *Bacillus* spp. 3. *Paecilomyces lilacinus* 4. *Oryza sativa* I. Título

DEDICATÓRIA

*Aos meus queridos pais, Dayson e Claudia, e irmã, Bruna,
por todo amor e carinho*
DEDICO

*Aos meus familiares e amigos que, mesmo de longe,
torceram por mim ao longo dessa jornada*
OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida e por, sempre, colocar pessoas e oportunidades maravilhosas em meu caminho.

À minha família pelo apoio contínuo ao longo de todos esses anos.

À Lívia pelo companheirismo, carinho e apoio por todo o tempo que passamos juntos.

Ao Prof. Dr. Sérgio Florentino Pascholati pela oportunidade e pela confiança em mim depositadas, e pelos conhecimentos transmitidos.

À Prof^a Dra. Dalilla Carvalho Rezende por ter me ensinado, desde os tempos de iniciação científica, muito sobre fitopatologia e, principalmente, sobre fé, humildade e dedicação.

Aos velhos amigos do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Fitopatológica, Silvia Blumer, Rafaela Roma Almeida, Simone Brand, Thiago de Melo, e aos mais recentes Victor de Souza, Janaina Barretta, Andressa Lopez, Suzani Paz, Samuel de Paula e Wesler Marcelino pela amizade e por tornarem tão alegre e agradável o nosso ambiente de trabalho.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia e Nematologia pelos importantes ensinamentos.

Aos amigos mestrando e doutorando do programa pela amizade e pelos momentos de descontração durante o acompanhamento das disciplinas.

À Silvia Lourenço, à Dra. Heloísa de Moraes, à Dra. Liliane Teixeira, à Iraides da Silva e à Fabiana Wolak pela amizade e pelas valiosas ajudas ao longo desses anos.

À Fernanda Groppo, ao José Rodolfo Groppo, ao Pedro Arthuso e ao Prof. Dr. Francisco Tanaka pela amizade e pelas agradáveis conversas.

Aos meus amigos de república Alberto, Jofre e Ronnie por todos os momentos de alegrias e aprendizado que fizeram essa etapa da minha vida tão especial.

Aos amigos feitos na Casa do Estudante Universitário por todos esses anos de amizade.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos que, sem a qual, esta etapa não seria viável.

A todos os amigos e familiares que me ajudaram na realização desse trabalho de alguma forma.

MUITO OBRIGADO!

"A smooth sea never made a skilled sailor."

Franklin D. Roosevelt

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1. A CULTURA DO ARROZ.....	13
2.2. A MANCHA PARDA.....	16
2.3. O CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS DE PLANTAS	20
3. MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1. COLETA E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS DE SOLO	25
3.2. ISOLAMENTO DE MICRO-ORGANISMOS DE SOLO, SELEÇÃO DE POTENCIAIS AGENTES DE BIOCONTROLE E IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS	25
3.3. OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DOS FITOPATÓGENOS <i>BIPOLARIS ORYZAE</i> , <i>MAGNAPORTHE ORYZAE</i> , <i>PHYTOPHTHORA INFESTANS</i> E <i>SCLEROTINIA SCLEROTIORUM</i>	27
3.4. OBTENÇÃO E CULTIVO DAS PLANTAS HOSPEDEIRAS	28
3.5. ANTAGONISMO ENTRE OS MICRO-ORGANISMOS ISOLADOS E <i>B. ORYZAE</i> , <i>M. ORYZAE</i> , <i>P. INFESTANS</i> E <i>S. SCLEROTIORUM</i>	28
3.6. PRODUÇÃO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS COM EFEITO SOBRE O CRESCIMENTO MICELIAL DE <i>B. ORYZAE</i>	29
3.7. OBTENÇÃO DOS FILTRADOS DE CULTIVO DOS MICRO-ORGANISMOS SELECIONADOS.....	30
3.8. AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS FILTRADOS DE CULTIVO SOBRE O DESENVOLVIMENTO <i>IN VITRO</i> DE <i>B. ORYZAE</i>	30
3.9. CONTROLE DA MANCHA PARDA EM FOLHAS DE ARROZ PELOS MICRO-ORGANISMOS ISOLADOS	32
3.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	33
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
4.1. ISOLAMENTO DE MICRO-ORGANISMOS DE SOLO, SELEÇÃO DE POTENCIAIS AGENTES DE BIOCONTROLE E IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS	35
4.2. ANTAGONISMO ENTRE OS MICRO-ORGANISMOS ISOLADOS E <i>B. ORYZAE</i> , <i>M. ORYZAE</i> , <i>S. SCLEROTIORUM</i> E <i>P. INFESTANS</i>	40
4.3. EFEITO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS PRODUZIDOS DOS MICRO-ORGANISMOS ISOLADOS SOBRE O CRESCIMENTO DE <i>B. ORYZAE</i>	47
4.4. AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS FILTRADOS DE CULTIVO DOS MICRO-ORGANISMOS ISOLADOS SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE <i>B. ORYZAE</i>	50
4.5. CONTROLE DA MANCHA PARDA EM FOLHAS DE ARROZ PELOS MICRO-ORGANISMOS ISOLADOS	58
5. CONCLUSÕES	63
REFERÊNCIAS	65

RESUMO

Isolamento de micro-organismos antagonistas de solo para o controle de *B. oryzae*, agente causal da mancha parda em arroz

O arroz (*Oryza sativa* L.) está entre as culturas mais importantes do mundo, tanto em valores de produção quanto em contribuição para a alimentação humana. A mancha parda, causada pelo fungo *Bipolaris oryzae*, destaca-se entre as principais doenças que afetam o arroz por reduzir a produtividade das lavouras e a qualidade dos grãos colhidos, colocando em risco a segurança alimentar de mais da metade da população mundial. O biocontrole de doenças como a mancha parda apresenta-se como uma alternativa mais sustentável em comparação ao controle químico que, por sua vez, apresenta elevados custos financeiro e ambiental. Os objetivos desse trabalho foram isolar micro-organismos antagonistas de solo com potencial de utilização no biocontrole da mancha parda, elucidar alguns dos mecanismos de ação ocorrentes no antagonismo entre os micro-organismos isolados e *B. oryzae*, avaliar os efeitos dos filtrados de cultivos dos micro-organismos isolados sobre o desenvolvimento do fitopatógeno e avaliar a eficácia dos micro-organismos isolados no controle da mancha parda em folhas de arroz. Dois micro-organismos antagonistas foram selecionados pela capacidade de produzirem metabólitos que inibem o crescimento de outros micro-organismos. Os antagonistas foram identificados como *Paecilomyces lilacinus* e *Bacillus amyloliquefaciens* ou *B. methylotrophicus* (o fragmento sequenciado de gDNA apresentou nível idêntico de similaridade para ambas as espécies), micro-organismos já utilizados na formulação de produtos biológicos para o controle de doenças de plantas. *Bacillus* spp. e *P. lilacinus* inibiram o crescimento micelial de *B. oryzae* em 52,5% e 37,3%, respectivamente, em ensaio de pareamento de culturas. Ambos os micro-organismos isolados foram capazes de inibir, também, o crescimento de outros importantes fitopatógenos como *Magnaporthe oryzae*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Phytophthora infestans*. Além dos metabólitos dissolvidos no meio de cultivo, foi verificada a produção de compostos orgânicos voláteis (COVs) pelos antagonistas. *Bacillus* spp. e *P. lilacinus* produziram COVs que reduziram o crescimento de *B. oryzae* em 19,3% e 20,6% respectivamente. Os filtrados de cultivo de *Bacillus* spp. e *P. lilacinus* apresentaram efeito fungistático sobre o desenvolvimento de *B. oryzae*. O filtrado da bactéria inibiu o crescimento, a esporulação e a germinação daquele patógeno em 74,7%, 94,2% e 100% respectivamente. O filtrado do fungo, por sua vez, foi capaz apenas de reduzir o crescimento micelial do patógeno (39,4%). Os metabólitos produzidos por *Bacillus* spp. demonstraram ser foto e termoe estáveis; enquanto que os produzidos por *P. lilacinus* perderam sua atividade inibitória na presença de luz ultravioleta de comprimento longo. O biocontrole da mancha parda foi avaliado em segmentos de folhas de arroz tratadas, separadamente, com suspensão de células e esporos de *Bacillus* spp. e *P. lilacinus* respectivamente, e em seguida inoculadas com esporos de *B. oryzae*. Não houve redução da incidência e da severidade da doença através do tratamento de segmentos de folhas de arroz com suspensões de células e esporos dos antagonistas. No presente estudo, os micro-organismos antagonistas isolados de solo foram capazes de inibir *in vitro* o crescimento de *B. oryzae* e outros 3 fitopatógenos; porém, nas condições experimentais avaliadas, não foram eficazes no controle *in vivo* da mancha parda.

Palavras-chave: Controle biológico; *Bacillus* spp.; *Paecilomyces lilacinus*; *Oryza sativa*

ABSTRACT

Isolation of antagonistic microorganisms from soil to control *Bipolaris oryzae*, the causal agent of brown spot in rice plants

Rice (*Oryza sativa* L.) is one of the most important crops in the world in terms of total production and contribution to human diet. Brown spot of rice, caused by the fungus *Bipolaris oryzae*, is among the diseases that most affect this crop, reducing both yield and grain quality, and threatening food security for millions of people across the world. Biological control is considered a more sustainable approach to control plant diseases since pesticides application presents higher economical and environmental costs. The objectives of this study were: isolating antagonistic microorganisms from soil which show potential for use in the biocontrol of brown spot; elucidating some of the antagonistic mechanisms of the interaction among the plant pathogen and the isolated microorganisms; assessing the effect of cell-free culture filtrates from the antagonists on the development of *B. oryzae*; and evaluating the efficacy of the antagonistic microorganisms on the biocontrol of brown spot in rice leaves. Two microorganisms were selected because of the production of metabolites which showed inhibitory effects on other microorganisms. The selected antagonists were identified as *Bacillus amyloliquefaciens* or *B. methylotrophicus* (gDNA sequenced fragments presented high similarity to both species), and *Paecilomyces lilacinus*, which are already used as commercial biocontrol products. *Bacillus* spp. and *P. lilacinus* inhibited mycelial growth of *B. oryzae* in 52.5 and 37.3%, respectively, in dual plate assays. Both microorganisms also inhibited mycelial growth of other important plant pathogens such as *Magnaporthe oryzae*, *Phytophthora infestans* and *Sclerotinia sclerotiorum*. Besides the production of metabolites dissolved in the culture medium, the antagonism among *B. oryzae* and the isolated microorganisms also involves volatile organic compounds (VOCs). *Bacillus* spp. and *P. lilacinus* produced VOCs which reduced mycelial growth of that pathogen in 19.3 and 20.6% respectively. The cell-free culture filtrate from both antagonists showed fungistatic effects on the development of *B. oryzae*. The filtrate obtained from *Bacillus* spp. inhibited mycelial growth (74.7%), spore formation (94.2%) and germination (100%) of the plant pathogen. On the other hand, the antagonistic fungus filtrate was only effective on the reduction of the mycelial growth of *B. oryzae* (39.4%). While the metabolites produced by *Bacillus* spp. remained stable after heat and light treatments, the ones produced by *P. lilacinus* lost their inhibitory activity under near-ultraviolet light exposure. Brown spot biocontrol was assessed in detached rice 5-cm leaf segments treated, simultaneously, with a spore suspension of *B. oryzae* and cell suspension of *Bacillus* spp. or spore suspension of *P. lilacinus*. No reduction in disease incidence and severity was observed in leaves treated with the antagonists in comparison to control (water). In the present study, the antagonistic microorganisms isolated from soil inhibited *in vitro* the mycelial growth of *B. oryzae* and other three plant pathogens; however, they were not able to control brown spot in rice leaves in the experimental conditions used.

Keywords: Biological control; *Bacillus* spp.; *Paecilomyces lilacinus*; *Oryza sativa*

1. INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) está entre as culturas mais importantes no mundo, tanto em valores de produção quanto em termos de contribuição para a alimentação humana (SMITH & DILDAY, 2002). Estima-se que mais da metade da população mundial dependa do arroz como a principal fonte diária de calorias e proteínas (FAO, 2013). No Brasil, o nono maior produtor mundial, a produção supera as 12 milhões de toneladas, colhida em 2,2 milhões de hectares, e se concentra na região sul do país, principalmente no Estado do Rio Grande do Sul (71% da produção nacional) (CONAB, 2017).

Inúmeros são os fatores que prejudicam a rizicultura em todas as regiões produtoras e, certamente, as doenças que afetam essa cultura estão entre os principais desafios. Dentre todas as doenças, a mancha-parda é considerada uma das mais importantes, por reduzir tanto a produtividade das lavouras quanto a qualidade dos grãos colhidos (OU, 1985). Essa doença, que tem como agente causal o fungo *Bipolaris oryzae* (Breda de Haan) Shoemaker, é controlada, principalmente, pela aplicação de fungicidas, realizada através do tratamento de sementes ou durante as fases de florescimento e de formação dos grãos (BEDENDO & PRABHU, 2016).

No entanto, o custo desses produtos fitossanitários somado ao gasto com as operações agrícolas para aplicação dos mesmos limitam o uso desse método para muitos orizicultores em todo o mundo (OU, 1985). Além disso, tem aumentado cada vez mais a preocupação da sociedade com o impacto da atividade agrícola no meio ambiente, bem como com a contaminação de alimentos pelo uso excessivo de agrotóxicos, gerando uma demanda por métodos de controle de pragas e doenças alternativos ao químico (MORANDI & BETTIOL, 2009; BEDENDO et al., 2011).

No seu conceito mais clássico, o controle biológico pode ser definido como “a redução da quantidade de inóculo ou da atividade geradora de doença de um patógeno (crescimento, infectividade, virulência e agressividade) alcançada por ou através de um ou mais organismos que não o Homem” (COOK & BAKER, 1983). Esse controle pode ser realizado através de um ou mais dos mecanismos seguintes: antibiose, competição, hiperparasitismo, indução de resistência, e premunização (REDDY, 2009).

Como método de controle de doenças de plantas, o controle biológico pode ser implementado através de práticas culturais que favoreçam os antagonistas já presentes no

ambiente ou através da introdução de micro-organismos selecionados (MORANDI & BETTIOL, 2009; ALABOUVETTE & STEINBERG, 2006). Em ambos os casos, apresentar mais de um mecanismo de ação é considerada uma característica muito desejável de potenciais micro-organismos antagonistas, uma vez que serão aumentadas as suas chances de sucesso no biocontrole de uma dada doença (BETTIOL & GHINI, 1995).

Nesse sentido, a busca por novos micro-organismos antagonistas e a avaliação destes contra o fitopatógeno *B. oryzae* e sobre a incidência da mancha parda em plantas de arroz fornecem suporte para o desenvolvimento de medidas de controle mais econômicas e ecologicamente sustentáveis para o manejo dessa importante doença.

Diante do que foi exposto, os objetivos deste trabalho foram:

- a. Isolamento, seleção e identificação de micro-organismos com potencial uso como agentes de biocontrole de fitopatógenos;
- b. Elucidação de alguns dos possíveis mecanismos de ação ocorrentes no antagonismo entre os micro-organismos isolados e *Bipolaris oryzae*;
- c. Avaliação dos filtrados de cultivo dos micro-organismos isolados sobre o desenvolvimento do fitopatógeno;
- d. Avaliação da eficácia dos micro-organismos isolados no controle da mancha parda em folhas de arroz.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A cultura do arroz

Os cereais são a mais importante fonte de alimento para a humanidade. Dentre eles, o arroz destaca-se tanto em produção quanto em aspectos nutricionais (FAO, 2013). Cultivado em todos os continentes providos de terras onde é possível praticar a agricultura, são produzidas mais de 740 milhões de toneladas de arroz anualmente, o que o torna o 2º cereal mais importante em termos de produção, ficando atrás apenas do milho (FAO, 2014). Ainda assim, o arroz assume certa importância, uma vez que sua produção é quase que exclusivamente voltada para a alimentação humana. Este cereal é alimento básico para mais da metade da população mundial, representando a principal fonte diária de calorias e proteínas em diversas regiões do mundo, principalmente na Ásia (FAO, 2013; KHUSH, 1997).

A relação entre o Homem e esse alimento é antiga e os primeiros registros que indicam o uso do arroz na nossa alimentação datam de, pelo menos, 10.000 anos atrás em regiões tropicais e sub-tropicais da Ásia, onde uma espécie de gramínea selvagem (*Oryza rufipogon* Griff) era coletada e consumida pelos povos locais (KOVACH et al., 2007). Após um longo período de seleção para características favoráveis ao seu cultivo e consumo, como a não-deiscência e o tamanho dos grãos, há 6500 anos aproximadamente, foi finalizado o processo de domesticação daquela espécie selvagem no arroz asiático consumido hoje (*O. sativa*) (FULLER et al., 2009).

O arroz é uma espécie pertencente ao gênero *Oryza*, tribo Oryzeae, subfamília Ehrhartoideae e família Poaceae (CHANG, 1976; VAUGHAN et al., 2003). Esse gênero é composto por 23 espécies, sendo duas cultivadas e 21 consideradas selvagens, estando todas amplamente distribuídas em regiões das Américas do Sul e Central, África, Ásia e Oceania (VAUGHAN et al., 2003). As duas espécies de arroz cultivadas são o arroz asiático (*O. sativa*) e o arroz africano (*O. glaberrima* Steud.), sendo que o cultivo do primeiro está difundido por todo o mundo, enquanto o segundo tem importância restrita a algumas regiões no oeste da África (KHUSH, 1997). Em relação ao arroz cultivado asiático, as variedades dessa espécie ainda são subdivididas em 5 grupos: Indica, Aus, Aromático, Japônica temperado e Japônica tropical, sendo os grupos Indica e Japônica os mais importantes (GARRIS et al., 2005).

Adaptada ao ambiente aquático, *O. sativa* é uma planta anual cultivada em ciclos que variam desde 100 até 210 dias em variedades mais precoces e mais tardias respectivamente. Essas plantas podem medir de 0,3 m de altura, em mutantes anões, a mais de 7 m em variedades flutuantes. Da mesma forma, o sistema radicular do arroz pode variar de 0,4 a 1 m de profundidade, sendo bastante influenciado pelo método de irrigação utilizado no local de cultivo, uma vez que em áreas inundadas essas plantas têm o aporte de oxigênio para as suas raízes, realizado através do aerênquima, significativamente comprometido. O caule dessa planta recebe o nome de colmo que, por sua vez, é composto pelos nós e entrenós. A partir de cada nó, serão formadas uma folha e uma gema, sendo que cada colmo pode apresentar de 13 a 16 nós dependendo da variedade. O ramo da planta, apresentando colmo, folha, raízes e, geralmente, panícula é denominado perfilho, que se forma a partir do colmo principal de forma alternada. Por sua vez, a folha de uma planta de arroz é composta por lâmina, bainha, colar, aurícula e lígula. No início do desenvolvimento da lavoura, estes dois últimos apêndices foliares são importantes na diferenciação do arroz cultivado de outras gramíneas como, por exemplo, plantas daninhas. No arroz, a panícula, termo dado para a inflorescência da planta, situa-se sobre o último entrenó do colmo e é formada pela ráquis, pelos pedicelos e pelas espiguetas. Estas últimas, por fim, darão origem aos frutos do tipo cariopse (ABREU & OLIVEIRA, 2015; CHANG & BARDENAS, 1965; MAGALHÃES Jr. et al., 2004; PINHEIRO, 1999).

Estima-se que existam cerca de 120 mil variedades de arroz no mundo todo, selecionadas, através de programas de melhoramento, para o cultivo nas mais diversas condições edafoclimáticas. Assim, o arroz é cultivado atualmente desde a latitude 55°N na China até 36°S no Chile em pelo menos 114 países, ocupando uma área total de 162,7 milhões de hectares (KHUSH, 1997; MOHANTY et al., 2013). No entanto, apesar da vasta distribuição geográfica, mais de 90% do arroz é produzido e consumido na Ásia (FAO, 2013). Nesse continente, estão 9 dos 10 maiores produtores desse cereal no mundo, sendo que China e Índia juntas compõem mais de 49,7% da produção mundial em 74 milhões de hectares (FAO, 2014).

Uma particularidade da rizicultura é que, aproximadamente, 5% apenas do arroz produzido no mundo entra no mercado internacional, sendo o restante consumido no próprio local onde é produzido, evidenciando a importância nutricional dessa cultura nas regiões onde esta é cultivada. Os países que mais exportam esse cereal são Tailândia, Vietnã, Índia,

Paquistão e Estados Unidos, enquanto Indonésia, Nigéria, Bangladesh, Irã e Arábia Saudita são os maiores importadores (WANDER, 2015).

Na América do Sul, o consumo de arroz é significativamente menor do que nos países asiáticos, porém é maior do que o observado na Europa, África, Oceania e no restante da América. Aqui, os maiores produtores são Brasil, Argentina e Uruguai, em que a produção dos dois últimos é, parcialmente, voltada para a exportação para o mercado brasileiro. Na América do Sul, além de ser o maior produtor, o Brasil apresenta também o maior consumo desse cereal que compõe diariamente a dieta de pessoas de todas as faixas sócio-econômicas em todas as regiões do país (PINTO et al., 2015; AZAMBUJA et al., 2004).

O mais recente levantamento realizado pela Companhia Nacional de Abastecimento – CONAB (2017) traz o fechamento da safra 2016/2017 de arroz, apresentando os números finais de área plantada, produção e produtividade da cultura. A produção brasileira terminou a safra com 12,3 milhões de toneladas de arroz base casca, o que classifica o país como o nono maior produtor mundial (FAO, 2014). Apesar de o arroz ser cultivado em praticamente todos os estados do país, a maior parte da produção é encontrada na região sul, onde Rio Grande do Sul e Santa Catarina respondem por, aproximadamente, 80% da produção nacional. Em termos de área, a rizicultura brasileira é praticada em, aproximadamente, 2 milhões de hectares (CONAB, 2017). De toda essa área, 1,1 milhão de hectares (55,5%) estão localizados no Estado do Rio Grande do Sul, onde o cultivo é feito, tradicionalmente, em áreas irrigadas (CONAB, 2017). Nesse sistema, a área recebe irrigação, pelo método de inundação ou aspersão, durante todo o ciclo da cultura, conferindo elevados valores de produtividade (média de 7.868 kg ha⁻¹ na safra atual). O sistema irrigado é utilizado em 73,5% da área destinada ao cultivo do arroz no país e é responsável por 90% da produção nacional, sendo o restante oriundo do sistema denominado arroz de terras altas ou sequeiro (CONAB, 2017). Neste último, a lavoura é implantada em áreas sem a influência de rios ou de lençóis freáticos (solos não hidromórficos) e sem o uso de irrigação, sendo a necessidade hídrica da cultura suprida apenas pela água proveniente das chuvas (LORENÇONI, 2013). Atualmente, os principais produtores de arroz de sequeiro são os Estados do Mato Grosso e Maranhão, onde a produtividade média das lavouras são de, aproximadamente, 2.500 kg ha⁻¹ (CONAB, 2017).

Nas últimas duas décadas, a produção nacional de arroz apresentou um crescimento de 35,1%, passando das 9,1 milhões de toneladas na safra 1996/1997 para as atuais 12,3 milhões de toneladas. Para o mesmo período, observou-se uma redução de 44,6% na área de cultivo desse cereal, indicando um expressivo aumento na produtividade das lavouras, conseguido

através da pesquisa e da utilização de novas tecnologias no setor orizícola, tais como o desenvolvimento de cultivares mais produtivas e mais resistentes a estresses bióticos e abióticos, e o uso de irrigação (CONAB, 2017; YOKOYAMA et al., 1999).

Em ambos os sistemas de cultivo do arroz, a aplicação de agrotóxicos é listada entre os principais itens que compõem os gastos em uma lavoura orizícola (WANDER & SILVA, 2013). Esse dado revela, através do elevado impacto dessa operação agrícola no custo final de produção, a grande ameaça que doenças e pragas representam para a rizicultura nacional.

2.2. A mancha parda

Mais de 80 doenças já foram relatadas afetando o arroz nas diversas regiões produtoras em todo o mundo (PRABHU et al., 1999). A ocorrência dessas doenças diminui a produtividade das lavouras orizícolas e, também, a margem de lucro dos produtores devido aos gastos com a aplicação de fungicidas. No Brasil, os fungos destacam-se como o grupo de micro-organismos fitopatogênicos que mais causam danos a esta cultura, principalmente nas regiões de clima tropical como o Norte e o Centro Oeste do nosso país (SCHEUERMANN, 2015). Dentre todas as doenças que afetam o cultivo do arroz, a mancha parda destaca-se por estar amplamente distribuída nas áreas onde se pratica a rizicultura no Brasil e no mundo (OU, 1985; PRABHU et al., 1999; MEW & GONZALES, 2002; BEDENDO & PRABHU, 2016).

O agente causal da mancha parda é o fungo *Bipolaris oryzae* (Breda de Haan) Shoem. [sin. *Drechslera oryzae* (Breda de Haan) Subr. & Jain e *Helminthosporium oryzae* (Breda de Haan)], o qual corresponde à fase anamórfica de *Cochliobolus miyabeanus* (S. Ito & Kurib.) Drechsler ex Datur, sendo que este ainda não teve a sua ocorrência relatada em condições naturais no Brasil. Esse fungo pertence à classe Hyphomycetes e à família Dematiaceae (BARNWAL et al., 2013; BEDENDO & PRABHU, 2016). Sua hifa é do tipo septada e o micélio apresenta-se de forma aveludada e, geralmente, de coloração cinzenta escura. Lateralmente às hifas, são formados os conidióforos que carregam, no ápice ou nos lados, os conídios formados. Esses conídios medem 35-170 µm x 11-17 µm e são caracteristicamente curvados, apresentando-se de forma mais larga na região central e, à medida que se aproxima das extremidades, tornam-se mais finos. Essas células apresentam de 1-14 núcleos e germinam, na maioria dos casos, pelas extremidades basal e apical, formando o tubo germinativo e, posteriormente, o apressório e a hifa de penetração, a fim de invadir o tecido

hospedeiro. *B. oryzae* tem o seu desenvolvimento fortemente influenciado pelas condições de cultivo (temperatura, pH, luz e meio de cultivo) às quais ele é exposto. Sendo assim, as condições ótimas para o crescimento desse patógeno incluem temperaturas na faixa de 27-30 °C, valores de pH entre 6,6 - 7,4, alternância de períodos de claro e escuro para estimular a esporulação e meios de cultivo contendo peptona e sacarose como fontes de nitrogênio e carboidrato respectivamente. Ainda assim, esse fungo apresenta elevada variabilidade de forma que as condições ótimas de cultivo podem variar bastante de acordo com o isolado (OU, 1985). No campo, a sobrevivência do patógeno ocorre em restos culturais, hospedeiros alternativos e sementes de arroz, sendo que esta última é uma importante forma de dispersão do patógeno a longas distâncias (PRABHU et al., 1995). Nas sementes infectadas, *B. oryzae* pode sobreviver por até quatro anos, caracterizando-se como a principal fonte primária de inóculo. No entanto, apesar de a infecção primária através da semente ser recorrente, nem todas as plantas geradas são sintomáticas (OU, 1985).

No parte histórica da Fitopatologia, a mancha parda recebe destaque por ser relacionada à Grande Fome de Bengala em 1943. Nessa região, situada entre a Índia e Bangladesh, a ocorrência de condições climáticas atípicas, como altas temperaturas, dias nublados e elevado índice pluviométrico, somada à presença do patógeno virulento e ao plantio de variedades suscetíveis compuseram o cenário ideal para a formação de uma epidemia. Visto isso e levando em consideração a grande importância nutricional do arroz na dieta do povo local, a redução de até 90% em produtividade observada nas lavouras foi catastrófica. As estimativas feitas à época apontam a morte de 2 milhões de pessoas devido à escassez de alimento, o que classifica a Grande Fome de Bengala como o evento mais grave dessa natureza juntamente da epidemia causada por *Phytophthora infestans* em batata na Irlanda na metade do século XIX (PADMANABHAN, 1973).

A incidência da mancha parda nas lavouras é um problema comum às regiões onde se cultiva, principalmente, o arroz irrigado, podendo ocorrer durante todas as fases de desenvolvimento da planta, mas de forma mais prevalente durante a fase de florescimento e, posteriormente, na formação dos grãos (PRABHU et al., 1995). Os sintomas típicos dessa doença em plantas de arroz podem ser observados no coleoptilo, nas folhas e bainhas, nas ramificações das panículas, nas glumelas e nos grãos. Nesses locais, *B. oryzae* causa lesões circulares ou ovais de coloração marrom, avermelhadas nas bordas e com centro acinzentado ou esbranquiçado. As glumas, por sua vez, apresentam manchas marrom-escuras que, sob alta incidência do patógeno, coalescem, podendo tomar toda a superfície do grão

(SCHEUERMANN, 2016; PRABHU et al., 1999; WEBSTER & GUNNELL, 1992; OU, 1985).

Quanto aos danos, estes são observados na redução da produtividade e na qualidade dos grãos que são colhidos (OU, 1985). De acordo com as condições edafoclimáticas locais e com a susceptibilidade da cultivar semeada, a diminuição na produção pode ser bastante significativa. Prabhu et al. (1980) observaram uma relação entre infecção do patógeno nas folhas e nos grãos e o número de grãos por panículas, sendo que em cultivares tardias as perdas variaram de 36 a mais de 82%. Aluko (1975), por sua vez, relatou quedas em produtividade na faixa de 30-43% nos casos de infecções mais severas da doença. Em ensaios de campo no Rio Grande do Sul, Dallagnol et al. (2006) e Celmer et al. (2007) observaram, respectivamente, 13% e 12-15% de severidade da mancha parda em algumas cultivares de arroz irrigado, indicando que medidas de controle são necessárias para a prevenção dos danos causados pelo fitopatógeno. Os últimos autores estimaram, ainda, uma expressiva redução de mais de 3.000 kg ha⁻¹ em produtividade relacionada à incidência de mancha parda e da escaladura do arroz nas cultivares avaliadas. Um outro dano da ocorrência da doença pode ser observado nos estádios mais iniciais da cultura, quando a infecção do patógeno nas sementes implica na diminuição da germinação das mesmas e na morte de plântulas de arroz (MALAVOLTA et al., 2002). Além disso, a incidência da mancha parda sobre os grãos reduz a eficiência da etapa de beneficiamento devido ao aumento do número de grãos quebrados durante esse processo (PRABHU et al., 1999).

Vale ressaltar que o fitopatógeno *B. oryzae* também está relacionado à incidência de outra importante doença na cultura do arroz. *B. oryzae*, *Pyricularia grisea*, *Phoma sorghina*, *Microdochium oryzae*, *Alternaria padwickii*, *Alternaria* spp., *Curvularia lunata* e *Nigrospora oryzae* são os fungos mais comumente associados à mancha dos grãos, que sob elevado índice de severidade em campo reduz o número de grãos cheios e o peso da panícula, além de aumentar a porcentagem de espiguetas estéreis (MALAVOLTA et al., 2007). Portanto, a fim de garantir o potencial produtivo das cultivares e uma elevada rentabilidade econômica nas lavouras, o controle desse fitopatógeno torna-se imprescindível.

As estratégias de controle recomendadas para a mancha parda envolvem, principalmente, o controle genético, o cultural e o químico (BEDENDO & PRABHU, 2016; SCHEUERMANN, 2015; NUNES et al., 2004; PRABHU et al. 1999; OU, 1985). Em relação ao controle biológico, apesar de diversos trabalhos demonstrarem a eficácia de alguns antagonistas em reduzir os danos causados por *B. oryzae* (LUDWIG & MOURA et al., 2009;

BARNWAL et al., 2013), esse método ainda não é utilizado nas lavouras (BEDENDO & PRABHU, 2016).

O plantio de cultivares resistentes é o método mais prático e econômico para o controle das doenças na cultura do arroz. No entanto, as cultivares disponíveis comercialmente não apresentam alto nível de resistência para todas as doenças ocorrentes em uma dada área e, além disso, não são adaptadas para as condições climáticas de todas as regiões produtoras. Especificamente para a mancha parda, praticamente não existem programas de melhoramento destinados à obtenção de cultivares resistentes a essa doença, o que explica o fato de que quase metade das cultivares recomendadas para plantio na região sul do país são suscetíveis ou não apresentam informações sobre a reação ao patógeno *B. oryzae* (BEDENDO & PRABHU, 2016; SOSBAI, 2014).

Em relação ao controle cultural, este apresenta-se como uma importante ferramenta para o controle da mancha parda, uma vez que sua incidência está fortemente associada a áreas com solos de baixa fertilidade e sem um manejo hídrico adequado, os quais colocam a planta sob estresse fisiológico, tornando-as pré-dispostas à infecção pelo fitopatógeno (OU, 1985). Sendo assim, recomenda-se ao produtor medidas que evitam a entrada ou que aumentam a concentração do inóculo na área, que tornam o ambiente desfavorável ao desenvolvimento da doença e que garantam o equilíbrio nutricional das plantas. Dentre essas medidas, destacam-se o preparo antecipado do solo a fim de se eliminar possíveis fontes de inóculo como restos culturais e plantas daninhas; a semeadura em época e em densidade adequada e o uso de sementes sadias, livres do patógeno; uma adubação adequada, principalmente em potássio, magnésio e silício, e, por fim, um bom manejo da irrigação na área (NUNES et al., 2004; SOSBAI, 2014; BEDENDO & PRABHU, 2016).

Quando a mancha parda é ainda identificada no campo, apesar da adoção dos métodos de controle supracitados, os produtores lançam mão da aplicação de fungicidas, realizada através do tratamento de sementes ou durante as fases de florescimento e de formação dos grãos (BEDENDO & PRABHU, 2016). Na maioria dos casos, o uso do controle químico para o controle de doenças em plantas como a mancha parda confere uma maior estabilidade na produção, um aumento da qualidade de grãos e, conseqüentemente, um consistente retorno econômico (OTTONI et al., 2000; CELMER et al., 2007). No entanto, outros trabalhos relatam que a aplicação de fungicidas para controlar a incidência de *B. oryzae* em plantas de arroz não apresentou resultados satisfatórios (PRABHU & SANTOS, 1988; GROTH et al., 1990; SANTOS et al., 2011). Dessa forma, o uso de métodos alternativos de

controle, dentro de um manejo integrado de doenças, apresenta-se como uma ferramenta importante para garantir a segurança da rizicultura nacional.

2.3. O controle biológico de doenças de plantas

O controle de doenças incidentes nas áreas produtoras de arroz através da aplicação de fungicidas apresenta, entre outros aspectos negativos, elevados custos econômico e ambiental. Pelo lado ambiental, a contaminação de recursos hídricos (águas superficiais e subterrâneas) com agrotóxicos pode ser citada como um dos principais impactos negativos da orizicultura sobre as áreas adjacentes às propriedades agrícolas, oferecendo risco para a fauna e flora locais (SCORZA Jr. et al., 2010). Nas regiões orizícolas do Rio Grande do Sul, o cultivo do arroz irrigado, caracterizado pela inundação da área cultivada, apresenta um elevado risco de contaminação desses recursos hídricos, onde é frequente a detecção de resíduos dos agrotóxicos utilizados nas lavouras (MATTOS et al., 2011; SILVA et al., 2011; SILVA et al., 2009). Além disso, esse resíduos também têm sido encontrados em diversos alimentos de origem vegetal, inclusive no arroz (PARA, 2016), o que vem gerando uma grande preocupação e demanda da sociedade por sistemas de produção mais sustentáveis. Nesse contexto, métodos alternativos de controle de doenças como o biológico têm recebido, recentemente, uma maior atenção e aceitação pelos produtores e empresas do ramo químico (MORANDI & BETTIOL, 2009).

O controle biológico, como foi definido por Cook & Baker (1983), é “a redução da quantidade de inóculo ou da atividade geradora de doença de um patógeno (crescimento, infectividade, virulência e agressividade) alcançada por ou através de um ou mais organismos que não o Homem”. Esse método de controle baseia-se nas relações antagônicas que ocorrem entre diferentes populações de micro-organismos presentes na natureza e que mantêm o equilíbrio ecológico entre essas comunidades em um dado hábitat (COOK & BAKER, 1983; BEDENDO et al., 2011).

As relações antagônicas com potencial uso no controle biológico de doenças de plantas são, principalmente, a antibiose, a competição e o parasitismo (ALABOUVETTE & STEINBERG, 2006; BEDENDO et al., 2011). Além desses, outros mecanismos de controle tendo como base o uso de micro-organismos são a premunização e a indução de resistência (REDDY, 2011). Micro-organismos utilizados no controle biológico, também denominados agentes de biocontrole, podem atuar por mais de um dos mecanismos citados anteriormente, o

que, de maneira geral, é uma característica altamente desejada durante a seleção desses agentes por aumentar as chances de sucesso no controle de um fitopatógeno (BETTIOL & GHINI, 1995).

A antibiose é definida como o antagonismo resultante da produção de um metabólito secundário por um micro-organismo que apresenta efeito inibitório sobre o desenvolvimento de outro (ALABOUVETTE & STEINBERG, 2006; KARLOVSKY, 2008). Diversos são os micro-organismos capazes de produzir esses metabólitos secundários (ou antibióticos), com diversos já disponíveis comercialmente para uso no controle de fitopatógenos (BETTIOL et al., 2012). Dentre os fungos, podemos destacar as espécies do gênero *Trichoderma*, das quais já foram identificadas centenas de metabólitos secundários (BETTIOL et al., 2008; CONTRERAS-CORNEJO et al., 2016) que, por sua vez, atuam na inibição de importantes fitopatógenos como *Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum*, *Gaeumannomyces graminis*, *Sclerotium rolfii*, *Phytophthora cinnamomi*, *Fusarium oxysporum*, *Bipolaris sorokiniana*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum lini* entre muitos outros (VINALE et al., 2006; EVIDENTE et al., 2003; DICKINSON et al., 1989; DUNLOP et al. 1989; REINO et al., 2008; CONTRERAS-CORNEJO et al., 2016). Em relação às bactérias, recebem destaque aquelas espécies pertencentes aos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas* (O'BRIEN, 2017), principalmente *B. subtilis* e *P. fluorescens*, as quais são frequentemente usadas no biocontrole de doenças causadas por *Pythium* spp., *Phytophthora* spp., *Rhizoctonia* spp. e *Fusarium* spp. (REDDY, 2011).

Outra relação interespecífica explorada pelo controle biológico é a competição. Naturalmente, a competição por água, espaço, oxigênio e nutrientes ocorre entre micro-organismos patogênicos e não-patogênicos dividindo o mesmo nicho ecológico (BETTIOL & GHINI, 1995; ALABOUVETTE & STEINBERG, 2006). No contexto do controle de doenças de plantas, a presença de um ou mais micro-organismos que apresentam a capacidade de competir por aqueles fatores com fitopatógenos pode representar mais uma ferramenta de controle da população de patógenos daquele local (BEDENDO et al., 2016). Exemplos desse mecanismo podem ser observados no controle de *Penicillium* spp. e *Fusarium* spp. em frutos de citros e plantas de linho respectivamente. Dois isolados de *Pseudomonas syringae*, inoculados em limão e laranja, demonstraram a capacidade de ocupar espaços nos ferimentos presentes nas superfícies daqueles frutos e reduzir a incidência do bolor causado por *Penicillium digitatum* e *P. italicum* (BULL et al., 1997). Em outro caso, o tratamento com um isolado não patogênico de *Fusarium oxysporum* e outro de *Pseudomonas* spp. reduziu a

incidência da murcha em plantas de linho através da competição no solo por carbono e ferro, respectivamente, com o isolado patogênico de *F. oxysporum* (DUIJFF et al., 1999).

Por fim, o parasitismo entre diferentes espécies de micro-organismos também tem sido explorado comercialmente no controle biológico de doenças de plantas. Por definição, o parasitismo refere-se à relação nutricional entre duas espécies, o parasita e o hospedeiro, em que a primeira obtém seu alimento, parcialmente ou totalmente, a partir e às custas da segunda (BEDENDO et al., 2016). Quando um micro-organismo parasita um fitopatógeno, aquele recebe o nome de hiperparasita e, ao atacar hifas e estruturas de reprodução e sobrevivência do seu hospedeiro, pode ser utilizado no biocontrole de doenças, atuando na redução da infecção e do inóculo do patógeno (BETTIOL & GHINI, 1995). Espécies do gênero *Trichoderma* também recebem destaque por controlar, através do parasitismo de fitopatógenos, doenças em importantes culturas. Já foram relatadas ao menos 75 espécies desse fungo com potencial de parasitar patógenos como *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Pythium* spp. e *Fusarium* spp. (HARMAN et al, 2004; DRUZHININA et al., 2011) através de um complexo processo que vai desde o reconhecimento do hospedeiro, adesão e enrolamento sobre o micro-organismo alvo e, finalmente, o ataque, realizado através da liberação de enzimas extracelulares (CONTRERAS-CORNEJO et al., 2016).

Por se tratar de relações ecológicas existentes entre micro-organismos que habitam um mesmo ambiente, o controle biológico de doenças de plantas já ocorre na natureza e, conseqüentemente, nas lavouras (MENDES, 2016). No entanto, o sistema de cultivo atual baseado na monocultura e a grande dependência nos produtos químicos para o controle de fitopatógenos afetam a ocorrência natural desse método, aumentando a população dos micro-organismos patogênicos e diminuindo a dos benéficos (BETTIOL & GHINI, 1995; BETTIOL et al., 2009). Nesse sentido, o controle biológico nessas áreas pode ser implementado pela introdução de micro-organismos antagonistas, através do uso de produtos biológicos disponíveis comercialmente (O'BRIEN, 2017).

Em comparação aos produtos químicos, os de origem biológica ainda representam uma pequena fatia do mercado de defensivos agrícolas no Brasil (BEDENDO et al., 2011; PEDRAZZOLI & HERRMANN, 2016). No entanto, o mercado nacional de produtos biológicos está em plena expansão, com aumento de 15 a 20% nas projeções de venda do setor para os próximos anos (ABCBio, 2016). Conforme mencionado, a maior pressão da sociedade pela produção de alimentos com menor impacto ao meio ambiente e sem resíduos

de agrotóxicos tem gerado a demanda por métodos de controle alternativos. Como consequência disso, as empresas tradicionais do ramo têm buscado adaptar seu portfólio a este novo cenário que, por sua vez, tem atraído também empresas multinacionais para o mercado brasileiro que, atualmente, conta com 51 empresas e um total de 118 produtos registrados para o controle de pragas e doenças na agricultura (PEDRAZZOLI & HERRMANN, 2016; ABCBio, 2016).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos deste trabalho, com exceção da coleta das amostras de solo, foram conduzidos em Piracicaba - SP, no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Fitopatológica e no campo experimental do Departamento de Fitopatologia e Nematologia, ambos localizados na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

3.1. Coleta e armazenamento das amostras de solo

Foram coletadas amostras de solo nas dependências do Parque José da Silva Nogueira, localizado no município de Maceió, Estado de Alagoas. A amostragem constituiu-se da coleta de porções de solo, em várias profundidades, na proximidade de duas árvores da espécie *Prosopis juliflora* (Swartz) DC, conhecida popularmente como algarobeira. Para ambas as árvores, foi realizada a amostragem a uma distância de 4 metros do tronco, retirando-se porções de solo nas profundidades de 10, 20, 30, 40, 50 e 60 centímetros a partir da superfície. Após a coleta, as 12 amostras de solo foram acondicionadas em recipientes plásticos e enviadas para o Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Fitopatológica (ESALQ/USP), onde foram armazenadas sob refrigeração (10°C) durante o desenvolvimento das atividades deste projeto.

3.2. Isolamento de micro-organismos de solo, seleção de potenciais agentes de biocontrole e identificação dos isolados

O método escolhido para o isolamento de micro-organismos das amostras de solo foi a diluição seriada, conforme descrito por Mukerji et al. (2002). De cada uma das 12 amostras coletadas, foram pesados 10g de solo e transferidos, separadamente, para frascos Becker contendo 90 mL de água destilada autoclavada. A suspensão obtida em cada frasco foi agitada manualmente e transferida para um liquidificador, onde as amostras foram processadas por 60 s. Esta etapa teve por objetivo aumentar a recuperação de fungos que apresentam baixa produção de esporos e daqueles que estão ligados fortemente à hifa (BOOTH, 1971). Em seguida, foi transferido 1 mL da solução de solo para um tubo de ensaio contendo 9 mL de água destilada autoclavada, obtendo-se, assim, a diluição 10^{-1} . Após, procedeu-se até a diluição 10^{-5} , sendo que a cada transferência entre tubos, a suspensão foi agitada em um

agitador de tubos para garantir uma boa homogeneização. Em seguida, as diluições 10^{-4} e 10^{-5} foram selecionadas e vertidas, em condições assépticas, sobre placas contendo meio de cultivo com antibiótico (0,03 g pentabiótico L⁻¹).

Nesse ensaio, foram utilizados os meios de cultivo batata-dextrose-ágar (BDA), “complex medium” (CM) (ACHATZ, 2006) e Martin (MARTIN, 1950), com 3 repetições para cada amostra de solo, meio e diluição, totalizando 216 placas. Essas placas foram mantidas, durante 10 dias, em câmara do tipo BOD a 28°C no escuro. Após esse período, todas as placas foram avaliadas quanto à formação de halos de inibição entre os micro-organismos presentes nas mesmas. Este parâmetro foi considerado como o critério para a seleção de potenciais agentes de biocontrole, uma vez que é um indicativo da produção de metabólitos capazes de inibir o desenvolvimento de outros micro-organismos. Por fim, os micro-organismos selecionados foram repicados para placas contendo meio BDA e incubados em câmara do tipo BOD a 28°C no escuro, onde foram mantidos ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

A identificação dos micro-organismos selecionados foi realizada pela empresa de biotecnologia Helixxa Serviços Genômicos. Para a condução desse procedimento, placas de Petri contendo colônias isoladas dos micro-organismos foram enviadas para a sede da empresa localizada em Paulínia – SP.

Para o isolado fúngico, a extração de DNA foi realizada com o kit Norgen Fungi/Yeast conforme protocolo indicado pelo fabricante, e o gDNA obtido foi quantificado por espectrofotometria UV-Vis no aparelho Nanodrop (Thermo Scientific). Para a amplificação, foi utilizado um par de primers degenerados (WHITE et al., 1990; TOJU et al., 2012) desenhados para abranger a região ITS1—ITS4, com variação de tamanho entre 500 a 750bp, entre as unidades pequena e grande (SSU e LSU, respectivamente) do rRNA. Após, o fragmento amplificado foi purificado a partir do gel de agarose e o sequenciamento foi realizado por eletroforese capilar no equipamento ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), com os primers forward (ITS1) e reverse (ITS4), utilizando o Kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing. Por fim, as sequências bidirecionais obtidas foram editadas e alinhadas, gerando uma sequência consenso final que foi comparada contra a base de dados do NCBI (2017), a fim de se obter a identidade, em nível de espécie, da amostra analisada.

Para o isolado bacteriano, a extração de DNA foi realizada com o kit Reliaprep Tissue (Promega), conforme protocolo de extração para células indicado pelo fabricante, e o gDNA obtido foi quantificado por espectrofotometria UV-Vis no aparelho Nanodrop (Thermo Scientific). Para a amplificação, foi utilizado um par de primers degenerados (SCHMALENBERGER et al. 2011) desenhados para abranger a região V1-V9, com aproximadamente 1500bp, da sequência do gene 16S rRNA. Em seguida, os fragmentos amplificados foram purificados a partir do gel de agarose e o sequenciamento foi realizado por eletroforese capilar no equipamento ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) com os primers forward (27F) e reverse (1492R), utilizando o Kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing. Por fim, as sequências bidirecionais obtidas foram editadas e alinhadas, gerando sequências consenso finais que foram comparadas contra a base de dados do NCBI (2017), a fim de se obter a identidade, em nível de espécie, de cada produto de PCR/amostra analisado.

3.3. Obtenção e manutenção dos fitopatógenos *Bipolaris oryzae*, *Magnaporthe oryzae*, *Phytophthora infestans* e *Sclerotinia sclerotiorum*

O isolado de *B. oryzae* utilizado nos ensaios foi cedido pela Dra. Maria Heloísa Duarte de Moraes, do Laboratório de Patologia de Sementes (ESALQ/USP), e foi incubado a 20 °C, fotoperíodo de 12h, em câmara de crescimento equipada com lâmpadas cujo espectro luminoso se estendia do visível até o ultravioleta próximo. Em pré-ensaios conduzidos, o comprimento de onda referente ao ultra violeta próximo foi essencial para a esporulação desse isolado. O isolado de *M. oryzae* foi fornecido por pesquisadores da EMBRAPA Trigo e cultivado em meio aveia (60 g de farinha de aveia e 5 g de sacarose L⁻¹ de água). O isolado de *P. infestans* que, por sua vez, está armazenado na coleção de micro-organismos fitopatogênicos do Departamento de Fitopatologia e Nematologia (ESALQ/USP), foi cedido pela técnica Fernanda Groppo e cultivado em meio BDA. Já o isolado de *S. sclerotiorum* foi obtido com pesquisadores da Universidade Estadual de Londrina e cultivado em meio BDA. Os isolados de *M. oryzae*, *S. sclerotiorum* e *P. infestans* foram incubados em câmara do tipo B.O.D equipadas com lâmpadas tipo L.E.D. brancas convencionais, com fotoperíodo de 12h a 25 °C, com exceção de *S. sclerotiorum* que foi incubado a 21 °C.

3.4. Obtenção e cultivo das plantas hospedeiras

As sementes de arroz da cultivar IAC-202, susceptível à mancha parda (SOARES et al., 2003), foram fornecidas pelo Prof. Dr. Geraldo José Aparecido Dario, do Departamento de Produção Vegetal (ESALQ/USP) e armazenadas em câmara fria a 10 °C até o uso nos ensaios *in vivo*.

Para o ensaio de biocontrole (**item 3.9**), vasos de plástico de 12 cm de diâmetro e 10 cm de altura foram preenchidos com solo autoclavado e semeados (uma semente por vaso) com a cultivar citada anteriormente, superficialmente desinfestada com solução de hipoclorito 10% (REZENDE et al., 2009). Os vasos foram mantidos em casa de vegetação, molhados diariamente e as plantas foram utilizadas com 50 dias de idade.

3.5. Antagonismo entre os micro-organismos isolados e *B. oryzae*, *M. oryzae*, *P. infestans* e *S. sclerotiorum*

O potencial antagônico dos micro-organismos selecionados foi avaliado pelo método de pareamento de culturas em placas de poliestireno de 90 mm contendo meio BDA. O antagonismo entre os fitopatógenos e os potenciais antagonistas foi avaliado em ensaios conduzidos separadamente. Os micro-organismos isolados e os fitopatógenos foram cultivados conforme descrito nos **itens 3.2 e 3.3** respectivamente. Discos de meio (5 mm de diâmetro) contendo estruturas de cada um dos potenciais antagonistas foram retirados de colônias com 10 dias de idade e foram transferidos para um dos lados das placas, distantes 1 cm da borda. As placas foram, então, incubadas em câmara tipo B.O.D. a 28 °C e escuro por 4 dias. Depois desse período, discos de meio (5 mm de diâmetro) contendo micélio dos fitopatógenos foram retirados de colônias com 10 dias de idade e foram depositados no lado oposto de onde encontravam-se as colônias dos potenciais antagonistas. Após, as placas foram incubadas em câmara do tipo B.O.D., sob as condições descritas na **Tabela 1**. O tratamento controle consistiu de placas contendo meio BDA para as quais foram transferidos, apenas, discos dos fitopatógenos. A avaliação do ensaio foi feita pela medição do raio da colônia dos patógenos com auxílio de um paquímetro digital no 7º dia após a transferência dos mesmos para as placas. Com o objetivo de verificar o efeito das interações antagônicas entre os isolados e *S. sclerotiorum* sobre a produção de escleródios do fitopatógeno, as placas desse ensaio foram incubadas, sob as mesmas condições, por mais 1 semana e, então, foi feita a

contagem das estruturas de sobrevivência. A partir dos dados obtidos pela medição dos raios das colônias dos fitopatógenos, também foi calculada a respectiva porcentagem de inibição de crescimento micelial (PIC), conforme a fórmula abaixo:

$$\text{PIC (\%)} = \left(\frac{\text{Raio da colônia no tratamento} - \text{Controle}}{\text{Controle}} \right) * 100$$

Tabela 1 – Condições de incubação para os ensaios de antagonismo contra os quatro patógenos.

Fitopatógeno	Temperatura (°C)	Fotoperíodo*
<i>B. oryzae</i>	28	escuro
<i>M. oryzae</i>	25	12h
<i>P. infestans</i>	25	12h
<i>S. sclerotiorum</i>	21	12h

* lâmpadas tipo L.E.D. brancas

Os ensaios com cada fitopatógeno foram conduzidos, separadamente, conforme mencionado anteriormente, e montados em delineamento inteiramente casualizado com 3 tratamentos (controle; antagonista 1 x fitopatógeno; antagonista 2 x fitopatógeno) e 4 repetições, em que cada repetição foi representada por uma placa contendo o fitopatógeno na presença ou não de um dos micro-organismos isolados.

3.6. Produção de compostos orgânicos voláteis com efeito sobre o crescimento micelial de *B. oryzae*

A produção de compostos orgânicos voláteis produzidos pelos micro-organismos isolados e capazes de inibir, *in vitro*, o desenvolvimento de *B. oryzae* foi avaliada em ensaio com placas de poliestireno de 90 mm de diâmetro, divididas ao meio por um septo, contendo meio BDA em ambos os lados. Discos de meio (5 mm de diâmetro) contendo estruturas dos antagonistas, cultivados conforme descrito no **item 3.2**, foram retirados de colônias com 10 dias de idade e transferidos para o centro de um dos lados das placas. As placas foram, então, incubadas em câmara tipo B.O.D. a 28 °C e escuro. Após 4 dias, discos de meio (5 mm de diâmetro) contendo micélio do fitopatógeno, cultivado conforme **item 3.3**, foram retirados de colônias com 10 dias de idade e foram depositados no compartimento oposto de onde encontravam-se as colônias dos antagonistas, distantes 1 cm da borda. Em seguida, as placas foram incubadas em câmara tipo B.O.D. a 28 °C e escuro, sendo avaliadas após 4 dias da transferência de *B. oryzae*. O tratamento controle consistiu de placas contendo, em um dos

lados, apenas meio BDA e, no outro, o fitopatógeno. O parâmetro avaliado, com auxílio de um paquímetro digital, foi o raio da colônia do *B. oryzae*. Com base nos dados obtidos, foi calculada, também, a PIC do patógeno.

O ensaio foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com 3 tratamentos (controle; antagonista 1 x *B. oryzae*; antagonista 2 x *B. oryzae*) e 8 repetições, em que cada repetição foi representada por uma placa contendo o fitopatógeno na presença ou não de um dos micro-organismos isolados.

3.7. Obtenção dos filtrados de cultivo dos micro-organismos selecionados

Os dois micro-organismos isolados foram cultivados, conforme descrito anteriormente (**item 3.2**), por 10 dias. Depois, 5 discos de meio (5 mm de diâmetro) contendo estruturas dos dois micro-organismos foram transferidos para frascos Erlenmeyer (250 mL) contendo 100 mL de meio BD (batata e dextrose). Em seguida, os frascos foram incubados em incubadora refrigerada sob agitação (225 rpm), a 28 °C e escuro por 7 dias. Após esse período, a suspensão de células de cada micro-organismo foi, separadamente, filtrada em filtro Whatman nº 40 com auxílio de bomba a vácuo. Os filtrados obtidos foram, então, centrifugados a 12352 g por 10 min e, em câmara de fluxo laminar, os sobrenadantes foram filtrados com membrana tipo Millipore 0,22 µm (Merck). Por fim, os filtrados livres de células foram transferidos para frascos de vidro esterilizados e, em seguida, foram armazenados em geladeira (10 °C).

3.8. Avaliação do efeito dos filtrados de cultivo sobre o desenvolvimento *in vitro* de *B. oryzae*

Os filtrados de cultivo dos micro-organismos isolados foram obtidos de acordo com o **item 3.7** e avaliados, separadamente, quanto a eficácia de inibição do crescimento micelial e da esporulação de *B. oryzae*. Nesse ensaio, o efeito dos filtrados foi avaliado pela adição desses ao meio de cultivo BDA na proporção de 10% v/v. Em câmara de fluxo laminar, os filtrados foram adicionados em frascos Erlenmeyer (250 mL) contendo meio BDA recém-autoclavado e ainda em estado líquido. Após, os frascos foram agitados manualmente para garantir uma boa homogeneização da mistura filtrado-meio, e esta foi vertida para placas de poliestireno de 90 mm de diâmetro. Estas, por sua vez, foram vedadas com filme PVC e

mantidas a temperatura ambiente para o resfriamento e solidificação do meio. Depois de 24 horas, foram depositados, no centro das placas, discos de meio (5 mm de diâmetro) contendo micélio do fitopatógeno. As placas, em seguida, foram incubadas em câmara tipo B.O.D. a 28 °C e escuro, e avaliadas após 5 dias. O tratamento controle consistiu de placas contendo, em um dos lados, o patógeno e meio BDA apenas no outro. O parâmetro avaliado, com auxílio de paquímetro digital, foi o diâmetro da colônia do patógeno, sendo que, a partir desses dados, foi calculada a PIC.

O delineamento inteiramente casualizado foi utilizado nesse ensaio, com 3 tratamentos (controle; filtrado do antagonista 1; filtrado do antagonista 2) e 8 repetições, em que cada repetição foi representada por uma placa contendo o fitopatógeno na presença ou não de um dos micro-organismos isolados no outro lado da placa.

A fim de se verificar o efeito sobre a esporulação do patógeno e a termoestabilidade dos metabólitos produzidos pelos antagonistas e presentes nos filtrados, uma variação do ensaio anterior foi conduzida. Nesse novo ensaio, os filtrados de cultivo de cada micro-organismo foram autoclavados (120 °C e 1 atm por 20 min.) e adicionados ao meio BDA, conforme descrito anteriormente. Para estimular a esporulação do fitopatógeno, as placas, diferentemente do primeiro ensaio, foram incubadas em câmara de crescimento equipada com lâmpadas cujo espectro luminoso se estendia do visível até o ultravioleta próximo, fotoperíodo de 12 h e 20 °C. A avaliação do crescimento micelial foi feita, com auxílio de um paquímetro digital, 5 dias após a transferência do patógeno. No 10º dia, com o objetivo de se verificar a natureza do efeito dos metabólitos presentes nos filtrados, discos de meio (5 mm de diâmetro) contendo micélio do patógeno foram retirados da zona periférica das colônias e transferidos para placas contendo meio BDA. Após a retirada dos discos, foram adicionados àquelas placas 20 mL de solução de Tween 20 0,01%. Por fim, a concentração das suspensões de esporos obtidas de cada tratamento foi calculada em Câmara de Neubauer.

Nesse segundo ensaio, foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado com 5 tratamentos (controle; filtrado não autoclavado do antagonista 1; filtrado autoclavado do antagonista 1; filtrado não autoclavado do antagonista 2; filtrado autoclavado do antagonista 2) e 8 repetições, em que cada repetição foi representada por uma placa com o fitopatógeno crescendo sobre meio BDA suplementado ou não com um dos filtrados.

Também foi conduzido um ensaio a fim de se estudar o efeito dos filtrados de cultivo sobre a germinação de esporos de *B. oryzae*. Sendo assim, uma suspensão de esporos do fitopatógeno foi preparada pela adição de 20 mL de solução de Tween 20 0,01% a colônias, cultivadas conforme **item 3.3**, com 15 dias de idade. Em seguida, foi feita a raspagem superficial dessas colônias com alça de Drygalski. A suspensão obtida foi, então, calibrada em Câmara de Neubauer para uma concentração de 1.10^{-5} esporos mL^{-1} . Após, alíquotas de 20 μL dessa suspensão foram transferidas para a parte externa de placas de polistireno de 35 mm de diâmetro. A esses 20 μL , foram adicionados, separadamente, 20 μL do filtrado de cultivo de cada um dos micro-organismos isolados, obtidos conforme **item 3.7**. Para esse ensaio, dois tratamentos controle foram preparados. Em um deles, as gotas de suspensão de esporos de *B. oryzae* receberam 20 μL de meio BD; no outro, receberam este mesmo volume de água destilada autoclavada. A fim de se evitar que a suspensão de esporos secasse, as placas foram colocadas no interior de placas de vidro maiores (90 mm de diâmetro), contendo pedaços de algodão umedecidos em água destilada autoclavada. Em seguida, as placas de vidro foram vedadas com filme PVC e incubadas no escuro, a temperatura ambiente (25 °C) por 6 horas, condições favoráveis à germinação dos esporos (OU, 1985). Após esse período, a germinação foi interrompida pela adição de lactoglicerol à suspensão de esporos e estas foram examinadas em microscópio óptico. A avaliação dos tratamentos foi feita pela contagem aleatória de 100 conídios e o critério adotado foi o comprimento do tubo germinativo, em que um conídio foi considerado germinado se o tubo germinativo deste apresentasse comprimento maior do que o referido conídio.

O ensaio foi montado em delineamento inteiramente casualizado com 4 tratamentos (água; meio BD; filtrado antagonista 1; filtrado antagonista 2) e 5 repetições, em que cada repetição consistiu de uma placa de poliestireno (35 mm de diâmetro) contendo 20 μL da suspensão de esporo e 20 μL de um dos tratamentos.

3.9. Controle da mancha parda em folhas de arroz pelos micro-organismos isolados

Esse ensaio foi conduzido tendo como base o trabalho de Jia et al. (2003). O biocontrole da doença foi avaliado pelo tratamento de segmentos de folhas de plantas de arroz com suspensões de células ou esporos dos dois antagonistas. Para o isolado bacteriano, colônias com 10 dias de idade, cultivadas de acordo com o **item 3.2**, receberam 10 mL de

água destilada autoclavada e foram raspadas, superficialmente, com alça de Drygalski. A suspensão obtida foi calibrada, em espectrofotômetro, para uma transmitância de 50% (600 nm). Para o tratamento com o isolado fúngico, colônias com 10 dias de idade, cultivadas conforme **item 3.2**, receberam 20 mL de água destilada autoclavada e, em seguida, foram raspadas com alça de Drygalski superficialmente. Por fim, a suspensão obtida foi calibrada, em Câmara de Neubauer, para uma concentração de $1,75 \cdot 10^6$ esporos mL^{-1} .

As folhas de plantas de arroz, obtidas de acordo com o **item 3.4**, foram cortadas em segmentos de 5 cm de comprimento e, imediatamente, colocadas dentro de placas de vidro (90 mm de diâmetro), contendo papel filtro embebido em água destilada autoclavada. Nas extremidades cortadas das folhas, foram colocados pedaços de algodão umedecidos em água destilada autoclavada, com o objetivo de evitar o ressecamento das mesmas. Em seguida, 20 μL de uma suspensão de esporos do fitopatógeno ($1,5 \cdot 10^5$ esporos mL^{-1}), acrescida de gelatina incolor (1% m/v) para evitar o escorrimento na folha, foram adicionados sobre a superfície adaxial do segmento de folha. Após, 20 μL de suspensões de células ou esporos de cada antagonista foram adicionados, separadamente, sobre a suspensão de esporos do fitopatógeno.

Quatro tratamentos controle foram preparados nesse ensaio: segmentos de folhas que receberam apenas os antagonistas sem a inoculação de *B. oryzae*, segmentos que só receberam o patógeno e segmentos que apenas receberam água. As placas foram, então, incubadas a temperatura ambiente (25 °C) e escuro por 2 dias, quando foram avaliadas a incidência e a severidade da mancha parda nos segmentos de folhas com o auxílio do programa QUANT (VALE et al., 2003).

O ensaio foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com 6 tratamentos (água; *B. oryzae*; antagonista 1 + patógeno; antagonista 1 – patógeno; antagonista 2 + patógeno; antagonista 2 - patógeno) e 7 repetições, em que cada repetição consistiu de uma placa de Petri com um segmento de folha.

3.10. Análise Estatística

Todos os ensaios deste trabalho foram conduzidos duas vezes e os dados coletados de cada um foram inseridos no software de estatística SASM-Agri (CANTERI et al., 2001) e submetidos à análise de variância e ao teste de separação de médias Tukey, a um nível de significância de 5%.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Isolamento de micro-organismos de solo, seleção de potenciais agentes de biocontrole e identificação dos isolados

No presente estudo, duas espécies de antagonistas foram selecionadas de amostras de solo de Maceió, Alagoas. A escolha do local da amostragem de solo é justificada pelo projeto desenvolvido por este autor anteriormente. O objetivo do referido projeto era isolar do solo daquela região o fungo endofítico *Piriformospora indica*, que demonstrou em vários trabalhos a capacidade de colonizar o sistema radicular de diversas espécies de plantas, incluindo briófitas, pteridófitas, gimnospermas, mono e dicotiledôneas, além de conferir aos seus hospedeiros um maior crescimento, resistência a estresses abióticos e bióticos, aumento na produção etc. (FAKHRO et al., 2009; PASCHOLATI et al., 2012 ;VARMA et al., 1999; VARMA et al., 2001; SHAHOLLARI et al., 2005). *P. indica* foi isolado da rizosfera de duas espécies arbóreas no deserto de Thar na Índia (VERMA et al., 1998), sendo uma delas *Prosopis juliflora* (Swartz) DC. (Leguminosae: Mimosoidae), conhecida popularmente como “algarobeira”. *P. juliflora* é uma planta nativa da América do Sul e Central e foi introduzida na Índia em 1857 (NASCIMENTO, 2008; TEWARI et al., 1993) e no Brasil, na região Nordeste, em 1942 (NASCIMENTO, 2008). Portanto, o objetivo daquele projeto foi verificar a ocorrência desse basidiomiceto associado a *P. juliflora* em solo nordestino e, posteriormente, estudar o mesmo como um indutor de resistência biótico no patossistema arroz x mancha parda, o que traria resultados de grande relevância para o controle da referida doença.

Infelizmente, considerando a enorme quantidade de micro-organismos presentes no solo, a inexistência, na literatura, de um meio de cultivo seletivo para o isolamento de *P. indica* e o insucesso do uso de sondas moleculares para auxiliar no isolamento, o desenvolvimento daquele trabalho foi alterado.

Durante as tentativas de isolamento de *P. indica* através do método de diluição seriada, dois micro-organismos chamaram a atenção por apresentarem halos de inibição nas placas onde estes cresceram, o que seriam indicativos da produção de metabólitos com capacidade de inibir o crescimento de outros micro-organismos (**Figura 1**). Pela referida observação, esses dois micro-organismos foram selecionados na época para se verificar uma possível inibição de *B. oryzae*, simultaneamente à condução do antigo projeto.

Figura 1 – Produção de metabólitos com atividade inibitória observada em placas com micro-organismos isolados de solo pelo método de diluição seriada. As fotos representam as placas de onde foram isolados os antagonistas após 14 dias de incubação.

A observação dos micro-organismos isolados em microscopia óptica indicou possíveis gêneros aos quais os potenciais antagonistas poderiam pertencer (**Figura 2**). Um dos isolados apresentou, de acordo com a análise do micologista Prof. Dr. Luís Fernando Pascholati Gusmão (Universidade Estadual de Feira de Santana), aspectos morfológicos característicos de um fungo pertencente ao gênero *Paecilomyces* como, por exemplo, as longas cadeias de pequenos conídios. O segundo isolado, por sua vez, apresentou morfologia característica de bactérias, com células em formato de bastonete. Como os meios de cultivo utilizados durante o método de isolamento foram suplementados com pentabiótico (Pentabiótico Veterinário Reforçado, Fort Dodge, Brasil) trata-se, portanto, de uma espécie bacteriana resistente aos tipos de antibióticos presentes no referido reagente na concentração utilizada no ensaio.

Para a confirmação dessas observações, os dois isolados foram enviados para a empresa Helixxa Serviços Genômicos para a identificação através de método molecular. Para o isolado fúngico, a extração de gDNA e amplificação por PCR, utilizando o par de primers ITS1 e ITS4, compreendendo toda a região ITS, resultou em um fragmento bem definido e de tamanho esperado (500-750bp) para a amostra analisada (**Figura 3**). As bandas obtidas em gel de agarose foram cortadas e purificadas para reação de sequenciamento no equipamento ABI3500 Genetic Analyzer. As sequências geradas, então, foram editadas para regiões de baixa qualidade (HQ<30) e os consensos gerados, através da montagem da fita “forward” e “reverse”, foram comparados contra a base de dados NCBI (2017). Por fim, a comparação da

sequência obtida contra a base de dados apresentou 100% de identidade, com cobertura de 100% dos 622bp da sequência consenso gerada contra a região ITS1-4 do gene 18S rRNA da espécie fúngica *Paecilomyces lilacinus*.

Figura 2 – Aspectos morfológicos dos micro-organismos isolados de solo crecidos em meio BDA por 7 dias. (A) e (C) ilustram a colônia de um dos antagonistas e suas hifas e estruturas características do gênero *Paecilomyces*, observadas em microscópio óptico (aumento de 400 x); (B e D) mostram características da colônia do outro antagonista e suas células em formato de bastonete, coradas com cristal violeta e observadas em microscópio óptico (aumento de 1000 x).

Figura 3 – Produtos da amplificação por PCR com par de primers degenerados para a região ITS em gel de agarose 1% para o isolado fúngico. Marcador de massa molecular (100bp) (M); controle positivo (C+); amostra analisada (1).

Para o isolado bacteriano, a extração de gDNA e amplificação por PCR, utilizando par de primers 27F-1492R, resultou em um único fragmento bem definido e de tamanho esperado (1500p) para a amostra (**Figura 4**). Após, a sequência obtida foi alinhada, gerando uma única sequência consenso por amplicon, através da montagem da fita “forward” e “reverse”, e comparadas contra a base de dados NCBI (2017) utilizando a ferramenta BLAST. A comparação da sequência obtida contra a base de dados apresentou 99% de identidade, com cobertura de 100% dos 1344 bp da sequência consenso gerada contra a região do gene 16S rRNA do gênero *Bacillus* sp. Foi observado, entretanto, que a mesma sequência consenso apresentou nível idêntico de similaridade e cobertura contra espécies pertencentes ao mesmo gênero, sendo elas *Bacillus amyloliquefaciens* e *Bacillus methylotrophicus*.

Os resultados acima indicaram espécies já utilizadas no controle biológico de plantas e, inclusive, disponíveis comercialmente como produtos biológicos (AGROFIT, 2017). O fungo *P. lilacinus* é comumente isolado de solos e é um conhecido agente de biocontrole de diversas espécies de nematoides parasitas de plantas (BONANTS et al., 1995; SIDDIQUI & MAHMOOD, 1996; KHAN et al., 2003; KIEWNICK & SIKORA, 2006; ANASTASIADIS et al., 2008; HASHEM & ABO-ELYOUSR, 2011; SHARMA et al., 2014). As espécies desse gênero recebem destaque pela elevada produção de enzimas extracelulares (proteases e quitinases) e de dezenas de metabólitos com atividade inibitória sobre importantes espécies de fitonematoides (CAYROL et al., 1989 ; KHAN et al., 2003a; KHAN et al., 2003b; DEGENKOLB & VILCINSKAS, 2016). *P. lilacinus* foi, recentemente, reclassificado como *Purpureocillium lilacinum* (LUANGSA-ARD et al., 2011); entretanto, o antigo nome ainda é

o mais utilizado nos trabalhos sobre controle biológico (DEGENKOLB & VILCINSKAS, 2016). Sendo assim, a classificação antiga será a adotada no presente trabalho.

Figura 4 – Produtos da amplificação por PCR com par de primers degenerados para a região 16S rRNA em gel de agarose 1% para o isolado bacteriano. (M) Marcador de massa molecular (100bp); (C-) controle negativo; (A) amostra analisada.

Por sua vez, o gênero *Bacillus* destaca-se entre as bactérias mais exploradas comercialmente no biocontrole de doenças de plantas (BETTIOL et al., 2012). *Bacillus* spp. são bactérias gram-positivas e que apresentam características interessantes para agentes de biocontrole, como a rápida multiplicação, a produção de diversos antibióticos, a promoção de crescimento de plantas, a indução de resistência em plantas contra patógenos, e a formação de endósporos, estruturas altamente resistentes a condições ambientais adversas (YOSHIDA et al., 2001; RAMÍREZ; KLOEPPER, 2010; AIT-KAKI et al., 2014; WU et al., 2015; LI et al., 2016).

O processo de desenvolvimento de um novo produto biológico para o controle de doenças de plantas depende de métodos de isolamento e seleção dos potenciais antagonistas (ALABOUVETTE & STEINBERG, 2006). Muitos trabalhos têm sido conduzidos para o isolamento de antagonistas dos mais diversos ambientes. No entanto, o isolamento a partir de solo, por apresentar-se como uma rica fonte de biodiversidade e, conseqüentemente, de interações interespecíficas com potencial usal no controle biológico, é o método empregado mais frequentemente (COOK & BAKER, 1983; O'BRIEN, 2017). Preferencialmente, o potencial antagonista deve ser isolado de um mesmo ambiente ao qual o patógeno alvo habita. Esse critério garante uma maior adaptação do antagonista às condições ambientais

(temperatura, pH, luminosidade, umidade entre outros) onde o mesmo será utilizado, possibilitando a sua sobrevivência por um maior período de tempo e, consequentemente, uma maior eficiência no controle do fitopatógeno (MELO, 1998). Como consequência, a maior parte dos produtos biológicos disponíveis no mercado atualmente são formulados a partir de micro-organismos isolados do solo e, portanto, são direcionados, principalmente, ao controle de fitopatógenos habitantes desse ambiente (BETTIOL et al., 2012).

Bettiol et. al. (2012) fizeram um levantamento dos produtos biológicos disponíveis comercialmente para o controle de doenças de plantas em diversos países. De acordo com os autores, os micro-organismos pertencentes aos gêneros *Bacillus* e *Paecilomyces*, ambos isolados no presente estudo, estão entre os antagonistas mais utilizados na formulação de produtos com aplicação no biocontrole de doenças de plantas, atrás apenas de espécies do gênero *Trichoderma*. Nos mais de 130 produtos incluídos no levantamento citado, espécies dos gêneros *Bacillus* e *Paecilomyces* são utilizadas em 16 e 8% do total respectivamente .

4.2. Antagonismo entre os micro-organismos isolados e *B. oryzae*, *M. oryzae*, *S. sclerotiorum* e *P. infestans*

Os resultados desse ensaio indicaram a ocorrência de antibiose entre os micro-organismos isolados e *B. oryzae*. Os metabólitos produzidos por *Bacillus* spp. e *P. lilacinus* reduziram o crescimento micelial do fitopatógeno em comparação com o controle (**Figura 5**).

Figura 5 – Antagonismo entre os micro-organismos isolados de solo e *B. oryzae*. Os antagonistas foram transferidos 4 dias antes do patógeno, e as fotos representam o último dia de avaliação do ensaio, 7 dias após a transferência de *B. oryzae*. Controle (A), *B. oryzae* x *Bacillus* spp. (B) e *B. oryzae* x *P. lilacinus* (C).

A redução no crescimento do patógeno foi estatisticamente significativa pelo co-cultivo com ambos os antagonistas em relação ao controle (**Tabela 2**). Além disso, foi possível observar diferenças entre os potenciais antagônicos dos dois isolados avaliados. A inibição do crescimento de *B. oryzae* causada por *Bacillus* spp. foi significativamente maior do que aquela proporcionada por *P. lilacinus* (**Tabela 2**).

Tabela 2 – Inibição do crescimento de *B. oryzae* por *Bacillus* spp. e *P. lilacinus* em ensaio de pareamento de culturas.

Tratamento	Raio da colônia (cm)	PIC (%)
Controle	5,9 ± 0,4 a	-
<i>B. oryzae</i> x <i>P. lilacinus</i>	3,7 ± 0,3 b	37,3
<i>B. oryzae</i> x <i>Bacillus</i> spp.	2,8 ± 0,3 c	52,5

As medidas do último dia de avaliação foram consideradas para a análise estatística. Médias seguidas por uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Inúmeros relatos na literatura demonstram o potencial de micro-organismos antagonistas em inibir o crescimento de fitopatógenos através de ensaios *in vitro* como o pareamento de culturas. No entanto, poucos trabalhos têm sido conduzidos para demonstrar a eficácia de antagonistas na inibição do crescimento do agente causal da mancha parda em arroz (BARNWAL et al., 2013).

Khalili et al. (2012) avaliaram 45 isolados de *Trichoderma* em ensaios de antagonismo *in vitro* e verificaram que todos os antagonistas estudados, isolados da rizosfera e de plantas de arroz, foram capazes de inibir o crescimento de *B. oryzae* através da produção de metabólitos voláteis e não-voláteis. Em ensaio de pareamento de culturas, a redução no crescimento do fitopatógeno pelos isolados, pertencentes às espécies *T. harzianum*, *T. virens* e *T. atroviride*, variou de 48,5 a 78,4%. Essa inibição, de acordo com os autores, foi resultado dos mecanismos de antibiose e competição entre *Trichoderma* spp. e *B. oryzae*. Nesse estudo, o parasitismo entre os antagonistas e o patógeno não teve contribuição para a inibição observada. Esses resultados estão de acordo com o que foi relatado por Abdel-Fattah et al. (2007), que também observaram uma redução no crescimento micelial de *B. oryzae* causada por *Trichoderma* spp. Quando cultivado simultaneamente com um isolado de *T. harzianum*, o fitopatógeno teve seu crescimento inibido em 48% ao sexto dia de ensaio. Assim como no trabalho anterior, não houve o parasitismo entre *T. harzianum* e *B. oryzae*, o que, segundo os autores, pode indicar que o fitopatógeno em questão não esteja incluído entre os hospedeiros do antagonista.

No presente estudo, o antagonismo observado entre os isolados de *Bacillus* spp. e *P. lilacinus* e o fitopatógeno *B. oryzae* também pode envolver a ocorrência de parasitismo. Apesar de não terem sido conduzidos ensaios específicos para a verificação desse mecanismo na interação entre os antagonistas e o patógeno, existem na literatura trabalhos revelando a produção de enzimas extracelulares como quitinases por espécies dos gêneros *Bacillus* e *Paecilomyces* (KHAN et al., 2003; KHAN et al., 2004; AVUPATI et al., 2017; GURAV et al., 2017). A quitina é um dos principais compostos constituintes das paredes celulares de fungos e está presente também na composição dos ovos de nematoides (SIDDIQUI & MAHMOOD, 1996; ADAMS, 2004), o que permite inferir que parte da redução do crescimento micelial de *B. oryzae* observada no ensaio de antagonismo pode ser devida à produção de quitinases, entre outras enzimas extracelulares, pelos micro-organismos antagonistas.

Em trabalho avaliando cinco isolados de rizobactérias, dentre elas duas de *Bacillus*, no controle de alguns patógenos de arroz, Souza Jr. et al. (2017) verificaram relações antagônicas entre os isolados estudados e *B. oryzae*. Em ensaio *in vitro*, os isolados de *Bacillus* DFs416 e DFs418 e o de *Pseudomonas* DFs223 inibiram em 20, 35 e 61% o desenvolvimento do fitopatógeno respectivamente. Dentre esses isolados, DFs223 e DFs418 foram capazes de produzir sideróforos, indicando, segundo os autores, que a competição por nutrientes, além da produção de antibióticos, também foi responsável pela inibição de *B. oryzae*.

Considerando que a produção de sideróforos por espécies de *Bacillus* e *Paecilomyces* já foi relatada em outros trabalhos (HOLINSWORTH & MARTIN, 2009; AIT-KAKI et al., 2014), a competição por nutrientes específicos, no caso o ferro, também pode ser um dos fatores ocasionando a inibição de *B. oryzae* pelos micro-organismos isolados no presente trabalho. Os sideróforos são compostos quelantes, produzidos por vários organismos como plantas, fungos e bactérias, e que apresentam elevada afinidade para íons de ferro. Quando secretados para o meio por um micro-organismo, por exemplo, esses compostos se ligam aos íons disponíveis, formando um complexo sideróforo-íon que se conecta a receptores protéicos específicos presentes na superfície da célula do micro-organismo. Esse complexo, por fim, é translocado para o interior da célula através de transporte ativo (KHAN et al., 2017).

Outros antagonistas estudados no controle de *B. oryzae* e que ocasionaram, *in vitro*, uma inibição do desenvolvimento do fitopatógeno são as bactérias dos gêneros *Pseudomonas*,

Streptomyces e *Paenibacillus*, e os fungos *Penicillium* spp. e *Aspergillus* spp. (ROSALES et al., 1993; LORENTZ et al., 2006; NINGTHOUJAM et al., 2009; MANIMEGALAI et al., 2011; BOUKAEW & PRASERTSAN, 2014).

O potencial antagônico de *P. lilacinus* contra diversas espécies de nematoides, como *Meloidogyne* spp., *Heterodera* spp., *Globodera* spp., *Tylenchulus* spp. e *Radopholus* spp. tem sido amplamente relatado em diversos trabalhos da área de controle biológico (JATALA, 1986; CHEN & DICKSON, 1996; SIDDIQUI & MAHMOOD, 1996; KHAN et al., 2006; SOUZA et al., 2015). No entanto, ao contrário do que se observa para *Bacillus* spp., ainda são raros os trabalhos voltados para o uso de *P. lilacinus* no controle de outros grupos de fitopatógenos. Wicklow & Wilson (1990), estudando a sobrevivência de escleródios de *Aspergillus flavus* no solo, observou as espécies de fungos que colonizavam aquelas estruturas. De um total de 85 fungos isolados dos escleródios, 66 (78%) foram identificados como *P. lilacinus*. De acordo com os autores, esse resultado indica que ocorra no solo o micoparasitismo desses escleródios pelo antagonista e não apenas uma colonização saprofítica das estruturas mortas ou danificadas, o que revela um grande potencial de uso de *P. lilacinus* no biocontrole de *A. flavus* nesse ambiente.

Buscando controlar o patógeno *Rhizoctonia solani*, agente causal da podridão do caule em plantas de poinsettia (*Euphorbia pulcherrima*), Cartwright & Benson (1995) avaliaram mais de 300 micro-organismos isolados de solos e plantas vindos de diversas regiões do Estado da Carolina do Norte (EUA). A primeira parte do trabalho envolveu avaliações *in vitro* do antagonismo entre os isolados e o fitopatógeno; e a segunda, avaliações relacionadas ao controle *in vivo* da doença em plantas cultivadas em substrato de enraizamento e inoculadas com *R. solani*. Dentre todos os micro-organismos testados, apenas dois, sendo um deles *P. lilacinus*, foram selecionados para ensaios de biocontrole mais aprofundados, onde este antagonista foi capaz de reduzir a incidência e a severidade da doença. Em outro trabalho, Yang et al. (2015) estudou o potencial antagônico de um isolado *P. lilacinus* e de um mutante obtido pela transformação deste último por *Agrobacterium tumefaciens*. Em ensaio de pareamento de culturas com *Sclerotinia sclerotiorum*, enquanto o isolado selvagem não apresentou efeito antagônico algum sobre o fitopatógeno, o mutante inibiu o crescimento micelial de *S. sclerotiorum* em 65%, indicando, segundo os autores, a produção de metabólitos fungistáticos pelo isolado transformado. A análise dos resultados dos três trabalhos citados acima, assim como dos resultados do presente estudo, permite inferir

que o potencial antagônico de *P. lilacinus* pode variar de acordo com o isolado avaliado e, também, com o patógeno alvo do controle.

Os resultados positivos do ensaio de antagonismo criaram expectativas sobre a ação dos antagonistas sobre outros micro-organismos. Assim, três outros patógenos de grande importância agrônômica foram obtidos para a realização do mesmo ensaio de pareamento de culturas: *M. oryzae*, *S. sclerotiorum* e *P. infestans*, isolados patogênicos de trigo, soja, e de plantas de batata respectivamente.

Assim como no primeiro ensaio, os resultados observados pelo método de pareamento culturas indicaram a ocorrência de antagonismo (**Figuras 6, 7 e 8**). Os antagonistas *Bacillus* spp. e *P. lilacinus* reduziram significativamente o crescimento micelial de *M. oryzae*, *S. sclerotiorum* e *P. infestans* em comparação com cada controle (**Tabela 3**). Mais um vez, o potencial antagônico apresentado por *Bacillus* spp. foi maior, comparado com *P. lilacinus*, em termos de inibição do crescimento dos três patógenos avaliados (**Tabela 3**).

Figura 6 – Antagonismo entre os micro-organismos isolados de solo e *M. oryzae*. Os antagonistas foram transferidos 4 dias antes do patógeno, e as fotos representam o último dia de avaliação do ensaio, 7 dias após a transferência de *M. oryzae*. Controle (A); *M. oryzae* x *P. lilacinus* (B); *M. oryzae* x *Bacillus* spp.

Figura 7 – Antagonismo entre os micro-organismos isolados de solo e *S. sclerotiorum*. Os antagonistas foram transferidos 4 dias antes do patógeno, e as fotos representam o último dia de avaliação do ensaio, 7 dias após a transferência de *S. sclerotiorum*. Controle (A); *S. sclerotiorum* x *P. lilacinus* (B); *S. sclerotiorum* x *Bacillus* spp.

Figura 8 – Antagonismo entre os micro-organismos isolados de solo e *P. infestans*. Os antagonistas foram transferidos 4 dias antes do patógeno, e as fotos representam o último dia de avaliação do ensaio, 7 dias após a transferência de *P. infestans*. Controle (A); *P. infestans* x *P. lilacinus* (B); *P. infestans* x *Bacillus* spp.

Tabela 3 – Inibição do crescimento de *M. oryzae*, *S. sclerotiorum* e *P. infestans* por *Bacillus* spp. e *P. lilacinus* em ensaio de pareamento de culturas.

Tratamento	Raio da colônia (cm)	PIC (%)
Controle	3,4 ± 0,1 a	-
<i>M. oryzae</i> x <i>P. lilacinus</i>	2,4 ± 0,1 b	29,8
<i>M. oryzae</i> x <i>Bacillus</i> sp.	1,4 ± 0,1 c	59,1
Controle	7,4 ± 0,4 a	-
<i>S. sclerotiorum</i> x <i>P. lilacinus</i>	4,2 ± 0,1 b	43,2
<i>S. sclerotiorum</i> x <i>Bacillus</i> sp.	3,8 ± 0,3 b	48,4
Controle	6,8 ± 0,4 a	-
<i>P. infestans</i> x <i>P. lilacinus</i>	3,5 ± 0,2 b	47,5
<i>P. infestans</i> x <i>Bacillus</i> sp.	2,2 ± 0,2 c	67,3

As medidas do último dia de avaliação foram consideradas para a análise estatística. Médias seguidas por uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Espécies do gênero *Sclerotinia* são polífitas e atacam mais de 360 espécies de plantas. O controle desses patógenos de solo apresenta grandes limitações, uma vez que esses fungos produzem estruturas de sobrevivência, denominadas escleródios, que podem persistir no

solo por muito tempo (INOUE-NAGATA et al., 2016). Visto isso, além da inibição do crescimento micelial de *S. sclerotiorum*, foi avaliado também o efeito dos antagonistas sobre a produção de escleródios pelo fitopatógeno. Apesar de ambos os antagonistas inibirem o crescimento de *S. sclerotiorum*, nessa avaliação complementar apenas *Bacillus* spp. foi capaz de reduzir a formação de escleródios sobre a colônia do fitopatógeno. Essa inibição, ao 14º dia de ensaio, significou uma redução de 98,3% na formação das referidas estruturas de sobrevivência (**Tabela 4**).

Tabela 4 – Efeito antagônico de *Bacillus* spp. e *P. lilacinus* sobre a produção de escleródios por *S. sclerotiorum* em ensaio de pareamento de culturas.

Tratamento	Número médio de escleródios
Controle	12,2 a
<i>S. sclerotiorum</i> x <i>P. lilacinus</i>	10,6 b
<i>S. sclerotiorum</i> x <i>Bacillus</i> spp.	0,2 c

A contagem no 14º dia após o início do ensaio foi considerada para a análise estatística. Médias seguidas por uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os resultados observados no antagonismo entre os micro-organismos isolados neste trabalho e os fungos *B. oryzae*, *M. oryzae* e *S. sclerotiorum*, e o oomiceto *P. infestans*, fitopatógenos de grande importância na agricultura, permitem concluir que os antagonistas *Bacillus* spp. e *P. lilacinus* possuem um amplo espectro de ação contra fitopatógenos, tanto os de parte aérea quanto os de solo. A ação sobre mais de um patógeno de uma dada cultura e, preferivelmente, em patógenos de diversas culturas é uma característica muito desejável para potenciais antagonistas, principalmente sob o aspecto de comercialização daqueles micro-organismos como produtos biológicos (SUÁREZ-ESTRELLA et al., 2013; LUDWIG & MOURA, 2009; SPADARO & GULLINO, 2005).

Portanto, a inibição do crescimento micelial de *M. oryzae* e *S. sclerotiorum* e *P. infestans* causada pelos antagonistas *Bacillus* spp. e *P. lilacinus* no presente estudo abre caminho para investigações do uso desses isolados no controle da brusone em trigo, do mofo branco em soja e da requeima em plantas de batata, assim como em outros importantes patossistemas.

4.3. Efeito de compostos orgânicos voláteis produzidos pelos micro-organismos isolados sobre o crescimento de *B. oryzae*

O efeito antagônico de *Bacillus* spp. e *P. lilacinus* sobre *B. oryzae* envolve, também, a produção de compostos orgânicos voláteis (**Figura 9**).

Figura 9 – Efeito de compostos orgânicos voláteis produzidos pelos micro-organismos isolados sobre o crescimento micelial de *B. oryzae*. Os antagonistas foram transferidos 4 dias antes do patógeno, e as fotos representam o último dia de avaliação do ensaio, 4 dias após a transferência de *B. oryzae*. Controle (A); *B. oryzae* x *P. lilacinus* (B); *B. oryzae* x *Bacillus* spp.

Esses compostos produzidos pelos antagonistas reduziram em 20%, aproximadamente, o crescimento micelial do fitopatógeno (**Tabela 5**). Ao contrário do que foi observado no ensaio de pareamento de culturas, não houve diferença estatística entre os efeitos dos compostos orgânicos voláteis produzidos pelos isolados *Bacillus* spp. e *P. lilacinus* em termos de redução do crescimento de *B. oryzae*. Através daquele ensaio, não é possível diferir qual a relativa participação dos metabólitos voláteis e dos não-voláteis dos antagonistas na inibição observada no desenvolvimento do patógeno. No entanto, com base nas **tabelas 2 e 5**, pode-se concluir que a produção de compostos orgânicos voláteis com atividade inibitória sobre o fitopatógeno representa uma considerável parcela do efeito antagônico total dos micro-organismos isolados sobre *B. oryzae*, principalmente no caso de *P. lilacinus*.

Tabela 5 – Inibição do crescimento micelial de *B. oryzae* por compostos orgânicos voláteis produzidos por *Bacillus* spp. e *P. lilacinus*.

Tratamento	Raio da colônia (cm)	PIC (%)
Controle	3,63 ± 0,1 a	-
<i>B. oryzae</i> x <i>P. lilacinus</i>	2,88 ± 0,2 b	20,6
<i>B. oryzae</i> x <i>Bacillus</i> sp.	2,93 ± 0,2 b	19,3

As medidas do último dia de avaliação (4º dia) foram consideradas para a análise estatística. Médias seguidas por uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Diversos trabalhos relataram a produção de compostos orgânicos voláteis (COVs) por importantes micro-organismos antagonistas como *Trichoderma* spp., *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp. e *Streptomyces* spp., e sua consequente influência no biocontrole de patógeno de plantas (HERRINGTON et al., 1987; LIU et al., 2008; KHALILI et al., 2012; YANG et al., 2012; ZHENG et al., 2013; HERNÁNDEZ-LEÓN et al., 2015; SHEORAN et al., 2015; CONTRERAS-CORNEJO et al., 2016; BOUKAEW et al., 2018). COVs, comparados a outros metabólitos secundários (por exemplo, enzimas, antibióticos e toxinas), são compostos pequenos com baixa massa molecular (100-500 Daltons), alta pressão de vapor, baixo ponto de ebulição e contendo uma parte lipofílica (SCHMIDT et al., 2015). A liberação desses compostos por micro-organismos serve como mecanismos de atração, comunicação e defesa em ambientes, como o solo, onde a difusão de compostos tende a ser dificultada por diversas barreiras físicas (ASARI et al., 2016).

No contexto do controle biológico, a verificação da produção de COVs com atividade inibitória sobre fitopatógenos é interessante, pois estes metabólitos podem causar seu efeito a uma maior distância em comparação aos metabólitos não-voláteis (WHEATLEY, 2008). O efeito de COVs produzidos por micro-organismos antagonistas sobre *B. oryzae* também foi avaliado por KHALILI et al. (2012), utilizando 45 isolados de *Trichoderma* spp. Em ensaio *in vitro*, a inibição do crescimento micelial do patógeno variou entre 21,8 e 75,0%, dependendo do isolado de *Trichoderma* avaliado, evidenciando a importância desses COVs no controle do fitopatógeno. Em outro estudo, Tamreihao et al. (2016) observaram os efeitos *in vitro* de COVs produzidos por *Streptomyces corchorusii* sobre o desenvolvimento de seis patógenos de arroz, dentre eles *B. oryzae*. A redução, causada pelos COVs liberados pela bactéria, no crescimento micelial de *B. oryzae*, *Fusarium oxysporum*, *Pyricularia oryzae*, *Curvularia oryzae*, *Rhizoctonia solani* e *R. oryzae* foi de, aproximadamente, 42, 40, 79, 8, 50 e 34% respectivamente.

COVs com efeito sobre fitopatógenos tem sido bastante estudados nos últimos anos na área de controle de doenças pós-colheita, principalmente com o uso de fungos do gênero *Muscodor* (REZENDE et al., 2010; GOMES et al., 2015). A aplicação desses compostos nas etapas de armazenamento e transporte de frutas, em comparação com controle químico convencional, apresenta alguns aspectos vantajosos, tais como a facilidade na aplicação, já que os COVs não precisam ser pulverizados como é o caso do fungicidas, e a minimização de resíduos de agrotóxicos nas superfícies dos vegetais (TOFFANO et al, 2017).

Em trabalho visando o controle pós-colheita da antracnose em frutos de manga, Zheng et al. (2013) testaram 206 isolados de bactérias para a produção de COVs com efeito sobre o *Colletotrichum gloeosporioides*. Dentre aqueles, quatro apresentaram a capacidade de produzir COVs com atividade inibitória *in vitro* sobre o fitopatógeno, sendo que dois desses, identificados como *Bacillus thuringiensis* e *B. pumilus*, reduziram o crescimento micelial de *C. gloeosporioides* em 80,1 e 88,9% respectivamente. Em trabalho similar, GOTOR-VILA et al. (2017) avaliaram o potencial de um isolado de *Bacillus amyloliquefaciens* em controlar três patógenos de cereja em pós-colheita, *Monilinia laxa*, *M. fructicola* e *Botrytis cinerea* através da produção de COVs. Em ensaio *in vitro*, a inibição do crescimento micelial dos patógenos pelo antagonista foi de 78,6, 68,6 e 86,8% para *M. laxa*, *M. fructicola* e *B. cinerea* respectivamente. Através da análise dos COVs produzidos por *B. amyloliquefaciens*, os autores chegaram em três com maior predominância: 1,3 pentadieno, 3-hidroxi-2-butanona e tiofeno, sendo que o último proporcionou os maiores índices de inibição, quando os COVs foram avaliados sobre os patógenos isoladamente.

A produção desses compostos também foi relatada para espécies do gênero *Paecilomyces*. Fischer et al. (1999) estudaram a produção de COVs por 13 espécies de fungos, dentre elas *Paecilomyces variotti*, frequentemente isoladas em indústrias de compostagens. Enquanto alguns compostos, como o 2-metil-1-propanol, o 2-metil-1-butanol e o 3-metil-1-butanol, foram encontrados em grandes quantidades para quase todas as espécies avaliadas, outros COVs foram produzidos apenas por determinadas espécies, caracterizando-se como marcadores específicos (ou “impressões digitais”) da presença daqueles micro-organismos no ambiente. Segundo os autores, os dois isolados de *P. variotti* estudados apresentaram uma elevada produção de terpenos, sendo que alguns dos COVs desse grupo químico foi produzida, exclusivamente, por essa espécie de fungo. Para o antagonista *P. lilacinus*, por outro lado, Djian et al. (1991) relataram a produção de ácido acético. O referido COV foi purificado e identificado a partir de filtrado de cultivo do antagonista, cultivado por 20 dias em meio líquido Czapeck Dox modificado. Em ensaio *in vitro*, esse COV apresentou efeito inibitório sobre a motilidade de diversas espécies de nematoides, especificamente sobre os parasitas de raízes de plantas. De acordo com os resultados, a motilidade dos juvenis de 2º estágio de *Meloidogyne* spp., tratados por até 48 horas com o referido COV, era recuperada após a transferência dos mesmos para água. No entanto, o tratamento com o COV por 72 horas resultou na morte dos juvenis.

Além do referido efeito sobre nematoides, há relatos na literatura do uso do ácido acético no controle de podridões de diversas frutas em pós-colheita causadas por *Penicillium italicum*, *P. expansum* e *Botrytis cinerea*. Nesses trabalhos, a aplicação desse COV apresentou uma inibição no crescimento micelial e na germinação dos esporos dos fitopatógenos, resultando na redução da severidade da doença nos frutos tratados em comparação com o controle (SHOLBERG & GAUNCE, 1995; CAMILI et al., 2010). Visto isso, é possível inferir que a redução no desenvolvimento de *B. oryzae* observada no presente estudo poderia, também, estar relacionada à produção de ácido acético por esse antagonista.

4.4. Avaliação do efeito dos filtrados de cultivo dos micro-organismos isolados sobre o desenvolvimento de *B. oryzae*

Em dois ensaios distintos, foram adicionados, na proporção de 1:10 (v/v), filtrados de cultivo dos antagonistas *Bacillus* spp. e *P. lilacinus* ao meio onde o patógeno foi cultivado e, em seguida, foram observados os efeitos sobre o desenvolvimento de *B. oryzae*. No primeiro ensaio, as placas contendo o patógeno crescendo sobre meio de cultivo, suplementado com os filtrados dos antagonistas, foram incubadas a 28 °C no escuro e, após 5 dias, foram avaliadas quanto ao efeito dos filtrados sobre o crescimento micelial de *B. oryzae* (**Figura 10**). No segundo, a fim de se avaliar a esporulação do patógeno e a termoestabilidade dos metabólitos presentes nos filtrados, foram alteradas as condições de incubação das placas e, além disso, parte dos filtrados foi autoclavada antes da adição destes ao meio. (**Figura 11**).

Figura 10 – Efeito inibitório de filtrados de cultivo dos micro-organismos isolados sobre o crescimento micelial de *B. oryzae*. Os filtrados foram adicionados ao meio BDA onde o patógeno foi cultivado na proporção de 1:10 (v/v). As fotos representam o último dia de avaliação do ensaio, 5 dias após a transferência de *B. oryzae*. Controle (A); *B. oryzae* x filtrado *P. lilacinus* (B); *B. oryzae* x filtrado *Bacillus* spp.

Figura 11 – Efeito inibitório de filtrados de cultivo dos micro-organismos isolados sobre o crescimento micelial de *B. oryzae*. Os filtrados, autoclavados ou não, foram adicionados ao meio BDA onde o patógeno foi cultivado na proporção de 1:10 (v/v). As fotos representam o último dia de avaliação do ensaio, 5 dias após a transferência de *B. oryzae*. Controle (A); *B. oryzae* x filtrado não autoclavado *P. lilacinus* (B); *B. oryzae* x filtrado autoclavado *P. lilacinus* (C); *B. oryzae* x filtrado não autoclavado *Bacillus* spp. (D); *B. oryzae* x filtrado autoclavado *Bacillus* spp. (E).

A adição de filtrado de cultivo dos micro-organismos isolados ao meio BDA onde foi cultivado *B. oryzae* reduziu significativamente o crescimento micelial do patógeno em relação ao controle (**Tabela 6**). Entre os dois filtrados, a inibição observada foi maior quando o filtrado de *Bacillus* spp. foi utilizado, indicando que os metabólitos produzidos por esse antagonista são mais eficazes ou que são produzidos em maiores quantidades em comparação com os metabólitos de *P. lilacinus*.

Perez et al. (2017) avaliaram *in vitro* os filtrados de cultivo de dois isolados de *Bacillus* spp. contra diversos micro-organismos. O filtrado de cultivo de *B. amyloliquefaciens* apresentou efeito inibitório contra as bactérias *B. cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus haemolyticus* e *S. saprophyticus*, contra os fungos *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* e a levedura *Candida tropicalis*. O filtrado de *B. thuringiensis*, por outro lado, apresentou atividade inibitória contra dois isolados de *B. cereus* apenas. Analisando os dois antagonistas, os autores encontraram genes relacionados à produção dos antibióticos subtilina e subtilosina A no isolado *B. thuringiensis*; enquanto que em *B. amyloliquefaciens*, os genes relatados eram associados à produção dos antibióticos surfactina, subtilosina A e iturina A. Dessa forma, a diferença entre os dois isolados em

termos de inibição do crescimento dos micro-organismos testados pode ser relacionada à produção, quantitativa e qualitativa, de metabólitos secundários.

Por sua vez, a atividade inibitória do filtrado de cultivo de *P. lilacinus* já foi estudada no controle do fitopatógeno *S. sclerotiorum*. Yang et al. (2015) avaliaram o filtrado do isolado pt361 do fungo *P. lilacinus*, transformado com a bactéria *Agrobacterium tumefaciens*, nas proporções de 1, 5 e 10% (filtrado:meio; v/v). O cultivo do fitopatógeno em meio suplementado com filtrado reduziu o seu crescimento micelial em 60,3, 87,3 e 100% nas concentrações mais baixa, intermediária e mais alta respectivamente. Segundo os autores, o efeito causado pelo filtrado do antagonista foi devido, principalmente, à produção de quitinases por *P. lilacinus*.

Tabela 6 – Inibição do crescimento micelial de *B. oryzae* pelos filtrados de cultivos de *Bacillus* spp. e *P. lilacinus*.

Tratamentos	Diâmetro da colônia (cm)	PIC (%)
Controle	8,3 ± 0,1 a	-
<i>P. lilacinus</i>	5,0 ± 0,2 b	39,4
<i>Bacillus</i> spp.	2,1 ± 0,2 c	74,7

As medidas do último dia de avaliação (5º dia) foram consideradas para a análise estatística. Médias seguidas por uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A comparação entre os resultados desse ensaio e aqueles do ensaio de pareamento de culturas (**Tabelas 6 e 2**) revela que a inibição conferida pela suplementação do meio de cultura com filtrados de cultivo foi similar para *P. lilacinus*, mas consideravelmente maior para o caso de *Bacillus* spp. No caso da bactéria, essa diferença observada entre os ensaios em termos de inibição do crescimento micelial de *B. oryzae* pode estar relacionada a um maior acúmulo dos metabólitos produzidos pelo antagonista no meio onde este foi cultivado por 7 dias. Dessa forma, um maior espaço e uma maior quantidade de nutrientes (placas com 15 mL de meio de cultura no primeiro ensaio *versus* frascos Erlenmeyer com 100 mL no segundo) fornecidos ao antagonista pode ter proporcionado ao mesmo melhores condições para uma maior produção desses metabólitos. Para o antagonista *P. lilacinus*, seria interessante a condução de um ensaio envolvendo a alteração de alguns parâmetros de incubação como agitação, pH e temperatura, e o cultivo em outros meios de cultivo, os quais podem resultar em mudanças na quantidade e nos tipos de metabólitos secundários produzidos e, conseqüentemente, na atividade antimicrobiana do filtrado (BRAKHAGE, 2013).

Levando em consideração que os filtrados foram adicionados a uma pequena dose ao meio (apenas 10%), os resultados deste ensaio demonstram um grande potencial de uso dos metabólitos produzidos pelos antagonistas no controle de fitopatógenos. Somado a isso, é razoável supor que os metabólitos realmente responsáveis pelo efeito inibitório observado já estejam diluídos no próprio filtrado de cultivo, o que permite concluir que a extração e purificação desses compostos podem aumentar ainda mais a sua eficácia em termos de biocontrole.

Li et al. (2011) avaliaram o potencial antagônico de *Streptomyces globisporus* através dos métodos de pareamento de cultura e de adição de filtrados de cultivo ao meio. Pelo primeiro método, *S. globisporus* foi capaz de inibir o crescimento micelial de 12 fitopatógenos, dentre eles o fungo *Magnaporthe oryzae*. Em seguida, os autores estudaram a incorporação do filtrado de cultivo do antagonista, em diversas proporções, ao meio de cultura líquido onde *M. oryzae* foi cultivado. Como resultado da adição do filtrado nas duas maiores concentrações avaliadas (10 e 20%; v/v), foram observadas reduções de 84,6 e 90,9%, respectivamente, na produção de massa seca pelo patógeno. Em um trabalho semelhante, Boukaew & Prasertsan (2014) avaliaram a inibição *in vitro* de *Rhizoctonia solani* causada por um isolado de *Streptomyces* spp. através dos mesmos métodos. Quando o fitopatógeno e o antagonista *S. philanthi* foram cultivados simultaneamente, foi observada uma redução de 89,2% no crescimento micelial de *R. solani*. A adição do filtrado ao meio, por sua vez, também proporcionou uma inibição do crescimento do patógeno, sendo que a inibição observada foi proporcional ao aumento da relação filtrado:meio testada. Nas proporções de 9, 16,6 e 33,3% (filtrado:meio; v/v), o crescimento de *R. solani* foi inibido em 90,8, 95,5 e 100% respectivamente. Ainda de acordo com os autores, os metabólitos antifúngicos presentes no filtrado de cultivo de *S. philanthi* demonstraram ser fotoestáveis e, em sua maioria, termoestáveis, já que após o aquecimento (40, 60, 80 e 100 °C por 30 min) e a autoclavagem (121 °C por 15 min) do filtrado, houve apenas uma pequena redução do efeito inibitório sobre o patógeno.

A termoestabilidade dos metabólitos secundários produzidos pelos micro-organismos isolados também foi avaliada no presente estudo. Após a autoclavagem dos filtrados de cultivo (120 °C por 20 min), a atividade inibitória sobre *B. oryzae* foi levemente comprometida, mas não diferenciou-se estatisticamente da atividade dos filtrados que não passaram pelo tratamento térmico (**Tabela 7**). Esse resultado indica que uma pequena parte do efeito causado pelo filtrados foi devido à presença de metabólitos termolábeis. Além disso,

a transferência de discos de meio contendo micélio de *B. oryzae*, retirados da zona periférica das colônias de cada tratamento, para placas contendo meio BDA resultou no crescimento, aparentemente, normal do fitopatógeno, demonstrando que o efeito dos metabólitos produzidos pelos antagonistas é fungistático.

A análise das **tabelas 6 e 7** revela uma menor inibição do crescimento micelial de *B. oryzae* causada pelo filtrado de *P. lilacinus* no segundo ensaio conduzido. Comparando os resultados dos filtrados não autoclavados do antagonista nos dois ensaios, nota-se uma drástica queda no seu efeito inibitório sobre o fitopatógeno que, uma vez que todos os outros fatores foram mantidos inalterados, pode estar relacionada às novas condições de incubação do ensaio. Visto isso, a incidência de luz, no comprimento de onda referente ao ultravioleta próximo, sobre as placas durante o ensaio pode, possivelmente, ter influenciado a atividade dos metabólitos produzidos pelo antagonista, revelando uma fotosensibilidade dos metabólitos desse antagonista. A mudança na temperatura de incubação do ensaio 28 para 20 °C foi descartada como provável fator, já que o potencial antagônico de *P. lilacinus* foi verificado contra *S. sclerotiorum* sob a mesma temperatura (20 °C). Portanto, a fim de se confirmar as hipóteses levantadas, se faz necessária a condução de um terceiro ensaio em que a incidência de luz seja o único fator a ser avaliado.

Tabela 7 – Inibição do crescimento micelial e da esporulação de *B. oryzae* pelos filtrados de cultivos, autoclavados (A) ou não (NA), de *Bacillus* spp. e *P. lilacinus*.

Tratamentos	Diâmetro da colônia (cm)	PIC (%)	Esporos (10^4 mL^{-1})
Controle	7,9 ± 0,3 a	-	7,4 ± 4,1 a
<i>P. lilacinus</i> NA	7,2 ± 1,3 a	8,8	7,4 ± 3,7 a
<i>P. lilacinus</i> A	7,8 ± 0,3 a	0,9	7,4 ± 3,9 a
<i>Bacillus</i> spp. NA	1,3 ± 0,2 b	83,3	0,4 ± 0,3 b
<i>Bacillus</i> spp. A	1,6 ± 0,1 b	79,1	1,6 ± 0,5 b

As medidas do último dia de avaliação (5º dia) foram consideradas para a análise estatística. Médias seguidas por uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Por ser um fator muito importante para o sucesso do biocontrole de um patógeno, a termoestabilidade e a fotoestabilidade de metabólitos produzidos por antagonistas têm sido estudadas em diversos trabalhos. As condições aos quais os micro-organismos estão sujeitos vivendo no solo ou na superfície de uma folha são bem discrepantes. Alguns fatores físicos como temperatura e umidade, assim como os nutricionais tendem a ser mais estáveis no solo em comparação à filosfera, contribuindo para a significativa diferença observada entre as populações microbianas dos dois habitat (LINDOW & BRANDL, 2003). Além disso, a

radiação solar ultravioleta incidente sobre a folha também é um grande diferencial entre os dois ambientes, permitindo que apenas as comunidades microbianas tolerantes aos raios UV sobrevivam (JACOBS & SUNDIN, 2001). Considerando todos esses fatores, é imprescindível conduzir ensaios a fim de se verificar a adaptação de potenciais agentes de controle e a atividade de seus metabólitos nas condições ambientais onde o patógeno alvo causa seus maiores danos.

Yu et al. (2002) avaliaram a estabilidade do filtrado de cultivo de um isolado de *Bacillus amyloliquefaciens* com efeito inibitório sobre *Rhizoctonia solani*. Para tanto, os filtrados foram submetidos à aquecimento, mudanças de pH e exposição à luz solar e à luz UV (254 e 365 nm). Como resultado, não foram observadas perdas na atividade inibitória do filtrado após o aquecimento por 30 min a 100 °C em comparação ao tratamento controle. No entanto, a autoclavagem por 20 min a 121 °C reduziu o efeito em 40%. Quanto ao pH, a alteração desse parâmetro em valores entre 3 e 11 não afetou a atividade observada do filtrado do antagonista. Por fim, a exposição do filtrado à luz solar e UV também não reduziu a eficácia do filtrado na inibição de *R. solani* em comparação com o controle (escuro). Os autores relataram ainda que após dois meses da obtenção do filtrado (armazenado a 20 °C), esse ainda não havia perdido sua atividade, revelando uma interessante característica para um produto de biocontrole.

Possivelmente, devido ao fato de não serem termoestáveis, os metabólitos presentes nos filtrados de *P. lilacinus* e inseridos no meio BDA onde *B. oryzae* foi cultivado também não apresentaram efeito sobre a esporulação do fitopatógeno (**Tabela 7**). Por outro lado, o filtrado de *Bacillus* spp. mostrou-se capaz de reduzir significativamente a esporulação de *B. oryzae* em comparação com o tratamento controle. A inibição da produção de esporos do patógeno causada pelos filtrados autoclavados e não autoclavados desse antagonista foi de 78 e 94,3% respectivamente, revelando mais uma vez a presença e ação de metabólitos termolábeis. Apesar da diferença observada nos resultados entre os filtrados de *Bacillus* spp., não houve diferença estatística entre os tratamentos autoclavado e não autoclavado.

Na literatura, diversos trabalhos já relataram o uso de filtrados de cultivo de antagonistas no controle *in vitro* e *in vivo* de fitopatógenos. Entretanto, os estudos de biocontrole realizados nesse sentido não abordam o efeito desses filtrados sobre a esporulação dos fitopatógenos, limitando-se a verificar o efeito dos filtrados sobre a germinação dos esporos e formação de apressórios (YOSHIDA et al., 2001; KAVITHA et al., 2005; LIU et

al., 2007; LI et al., 2011; YU et al., 2013; JEONG et al., 2017). Buscando estudar o biocontrole de *Colletotrichum dematium*, agente causal da antracnose em amoreiras, Yoshida et al. (2001) avaliaram a atividade inibitória do filtrado de cultivo de um isolado de *Bacillus amyloliquefaciens* sobre o fitopatógeno. Além do crescimento micelial de *C. dematium*, o filtrado do antagonista também inibiu a germinação de seus esporos. De acordo com os resultados, a mistura em partes iguais da suspensão de esporos com o filtrado (aplicado em várias diluições) resultou na inibição completa da germinação até mesmo quando o filtrado foi diluído 16 vezes. Em um outro trabalho, o filtrado de cultivo de *Streptomyces globisporus* também teve seu efeito avaliado sobre a germinação de esporos (LI et al., 2011). A adição do filtrado do antagonista em suspensões de esporos de *M. oryzae* nas proporções de 1, 2, 5, 10 e 20% (v/v) resultou na inibição da germinação dos mesmos em 10, 63,9, 84,7, 88,4 e 98,1% respectivamente. Em análises histológicas do processo de infecção de *M. oryzae* em folhas de arroz, os autores relataram que quando as plantas foram tratadas com o filtrado 12 horas antes da inoculação com o fitopatógeno, a germinação dos esporos foi inibida em 95% até 48 horas após a inoculação, indicando um interessante efeito protetor do filtrado.

No presente estudo, os filtrados de *Bacillus* spp. e *P. lilacinus* também foram avaliados quanto à eficácia de inibição da germinação de esporos de *B. oryzae* (**Tabela 8**). Após o tratamento com filtrado de *Bacillus* spp na concentração final de 50%, a germinação dos esporos do patógeno foi completamente inibida. Por outro lado, não foi possível notar um efeito do filtrado de *P. lilacinus* sobre os esporos do fitopatógeno em comparação com os tratamentos controle. Após as 6 horas de incubação, todos os esporos tratados com água ou meio BD (tratamentos controle) haviam germinado, indicando que o efeito causado pelo filtrado de *Bacillus* spp. pode ser associado, exclusivamente, aos metabólitos secundários produzidos pelo antagonista e não aos compostos constituintes do meio de cultivo. Ao final desse ensaio, não foi possível notar a formação de apressórios pelos esporos germinados em nenhum dos tratamentos.

Tabela 8 – Inibição da germinação de esporos de *B. oryzae* pelos filtrados de cultivos de *Bacillus* spp. e *P. lilacinus*.

Tratamentos	Germinação de esporos (%)
Controle - água	100 a
Controle - meio BD	100 a
Filtrado <i>P. lilacinus</i>	100 a
Filtrado <i>Bacillus</i> spp.	0 b

A contagem dos esporos germinados após 6 h foi considerada para a análise estatística. Médias seguidas por uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

B. oryzae, durante o processo infeccioso, produz esporos sobre as lesões formadas na superfície das folhas de arroz, os quais são disseminados para outras plantas através da ação de vento e chuva, gerando novas infecções (OU, 1985; BEDENDO & PRABHU, 2016). Sendo assim, por se tratar de uma doença policíclica, o efeito do filtrado de *Bacillus* spp. na redução do número de esporos formados e, também, na inibição da germinação dos esporos podem ser de grande importância no atraso do desenvolvimento dessa epidemia no campo e, conseqüentemente, na redução dos danos sobre a cultura. Além disso, a inibição da germinação dos esporos de *B. oryzae* em pelo menos 6 horas somada à redução do seu crescimento micelial, conforme verificado no presente estudo, pode aumentar as chances de resistência da planta frente ao ataque do fitopatógeno por garantir a essa um maior tempo para a expressão de seus mecanismos físicos e bioquímicos de defesa.

Um desses mecanismos físicos de defesa de plantas de arroz foi relatado por Ishihara et al. (2011). Sob ataque de *B. oryzae*, plantas de arroz acumulam em suas folhas serotonina, dentre outros compostos derivados do triptofano, a fim de barrar o avanço do patógeno em seu tecido. Buscando verificar a eficácia do acúmulo de serotonina, cuja formação é catalisada pela enzima triptofano-decarboxilase, os autores trataram plântulas de arroz inoculadas com *B. oryzae* com um inibidor da referida enzima. Como resultado, o tratamento das plântulas com o inibidor suprimiu o acúmulo na folha dos metabólitos derivados do triptofano, que caracterizam-se por apresentar a coloração parda no tecido doente, acarretando em uma maior severidade em comparação com o controle. A aplicação de triptamina, um intermediário do triptofano na formação dos metabólitos secundários, nas plântulas tratadas reduziu a severidade dos sintomas observados, indicando a participação daqueles metabólitos, inclusive a serotonina, no processo de defesa da planta.

4.5. Controle da mancha parda em folhas de arroz pelos micro-organismos isolados

A fim de contornar possíveis problemas com a estabilidade dos metabólitos produzidos por *P. lilacinus* nas condições climáticas reais em que ocorre a mancha parda em campo, como a incidência da luz solar principalmente, foram utilizadas suspensões de células ou esporos de *Bacillus* spp. e *P. lilacinus* no ensaio *in vivo* de biocontrole. Dessa forma, considerando a sobrevivência dos antagonistas no tecido da planta, seria garantida uma produção constante dos metabólitos secundários com efeito sobre o fitopatógeno, bem como a ocorrência de competição por espaço e nutrientes com o fitopatógeno. Além disso, a escolha pela aplicação do organismo vivo, ao invés de preparações mais refinadas, é mais atrativa no sentido de facilitar a produção e comercialização do mesmo como um possível agente de biocontrole. Visto isso, é importante ressaltar ainda que, de acordo legislação nacional vigente (INC nº 3/2006), são considerados agentes de controle os micro-organismos vivos de ocorrência natural, assim com aqueles resultantes de técnicas que impliquem na introdução natural de material genético, com exceção dos organismos modificados geneticamente através de técnicas de engenharia genética. Portanto, conforme a referida instrução normativa, não se encaixam na definição de agentes microbiológicos de controle os produtos e metabólitos dos micro-organismos (PESTANA, 2016).

No presente estudo, os antagonistas *Bacillus* spp. e *P. lilacinus*, aplicados na forma de suspensão de células ou esporos, não foram capazes de controlar a mancha parda em folhas de arroz (**Figura 12** e **Tabela 9**). Por outro lado, não foi observado nenhum efeito negativo, como clorose ou necrose, sobre as folhas que receberam apenas os antagonistas, indicando que esses micro-organismos podem ser usados sem nenhum prejuízo à cultura. Após 48h do tratamento das folhas com os antagonistas e com o fitopatógeno, já foi possível observar a presença de pequenas lesões ovais e de coloração marrom, características da doença. A incidência da doença foi observada em 100% das folhas inoculadas com o fitopatógeno, indicando que mesmo na presença dos antagonistas *B. oryzae* foi capaz de infectar o tecido hospedeiro. Quanto à severidade, não houve diferença estatística entre as folhas que receberam suspensões de células ou esporos e o tratamento controle (água) em termos de porcentagem de área lesionada. Apesar disso, as folhas tratadas com *P. lilacinus* apresentaram, em média, níveis levemente maiores de severidade quando comparadas aos outros dois tratamentos (água e *Bacillus* spp.). As folhas daquele tratamento apresentaram lesões aparentemente maiores, resultado da coalescência de lesões menores conforme o

avanco da colonização do patógeno no interior do tecido hospedeiro (OU, 1985). Essa observação tem respaldo no menor número médio de lesões por cm² contabilizados nas folhas tratadas com o referido antagonista. Apesar dessa observação, também não houve diferença estatística entre os três tratamentos em termos de quantidade de lesões.

Figura 12 – Severidade da mancha parda em segmentos de folhas de arroz tratadas com suspensão de células de *Bacillus* spp. e de esporos de *P. lilacinus*. As fotos representam a avaliação do ensaio, realizada 48 horas após a inoculação de *B. oryzae*. Controle (A); Suspensão de células de *Bacillus* spp. (B); Suspensão de esporos de *P. lilacinus* (C).

Tabela 9 – Efeito de suspensões de células e esporos de *Bacillus* spp. e *P. lilacinus* sobre a incidência, severidade e número de lesões por centímetro quadrado em segmentos de folhas de arroz inoculadas com *B. oryzae*.

Tratamento	Incidência (%)	Severidade (%)	Nº de lesões cm ⁻²
Controle	100	2,5 ± 1,0 a	17,6 ± 12,6 a
<i>Bacillus</i> sp.	100	2,2 ± 2,0 a	17,6 ± 11,8 a
<i>P. lilacinus</i>	100	3,2 ± 1,0 a	13,1 ± 3,8 a

Os parâmetro avaliados após 48h foram considerados para a análise estatística. Médias seguidas por uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Poucos relatos na literatura são encontrados acerca do biocontrole da mancha parda do arroz. Esse dado justifica em parte a ausência de produtos biológicos registrados atualmente no mercado para o controle dessa doença (AGROFIT, 2017). Apesar disso, resultados interessantes em termos de controle da doença *in vivo* foram observados em estudos com o uso de alguns antagonistas, principalmente os do gênero *Trichoderma*.

Ludwig et al. (2009) estudaram diversos antagonistas buscando controlar duas doenças de arroz, dentre elas a mancha parda, através da microbiolização de sementes. Esse tratamento foi realizado imediatamente antes da semeadura e consistiu da imersão das sementes, por 30 min a 10 °C sob agitação, em suspensão de células de isolados de

Pseudomonas synxatha (DFs 185), *P. fluorescens* (DFs 223), *Bacillus subtilis* (DFs 422), três isolados de *Bacillus* spp. (DFs 416, 418 e 419), *Stenotrophomonas maltophilia* (DFs 471) e um outro isolado ainda não identificado (DFs 306). Em um primeiro ensaio, realizado em casa de vegetação, os isolados DFs 185, DFs 223 e DFs 306 destacaram-se entre todos os outros, proporcionando uma redução na severidade da mancha parda de 80, 86 e 70% respectivamente. Estes isolados foram, então, selecionados e avaliados no segundo ensaio também em casa de vegetação, mas em vasos maiores. Neste último ensaio, o isolado 306 reduziu em 74% a severidade da mancha parda em comparação com o controle, além de apresentar uma área abaixo da curva de progresso da doença menor do que o tratamento com o fungicida Carboxin+Thiran.

Outro trabalho relatando o biocontrole da mancha parda foi conduzido por Abdel-Fattah et al. (2007) através da aplicação do antagonista *T. harzianum*. Nesse estudo, plântulas de arroz, naturalmente infectadas por *B. oryzae*, foram pulverizadas com suspensões de esporos de *T. harzianum* (10^4 , 10^6 ou 10^8 esporos mL^{-1}) em intervalos de 15 dias, sendo que a primeira pulverização foi feita quando as plantas atingiram 60 dias de idade. As avaliações foram realizadas 7, 14 e 21 dias após a primeira pulverização e levaram em conta a incidência e a severidade da doença no campo. De acordo com os resultados, a partir da segunda avaliação já foi possível notar uma menor incidência da doença nas plantas tratadas com *T. harzianum* em qualquer concentração. Em termos de severidade, as suspensões de esporos nas concentrações de 10^6 e 10^8 apresentaram os melhores resultados em comparação com o controle no último de avaliação. No estudo, a aplicação do antagonista na maior concentração (10^8 esporos mL^{-1}) resultou nos menores índices de incidência e severidade de mancha parda nas plantas, além de reduzir a incidência do fitopatógeno nos grãos colhidos, proporcionando resultados similares ao tratamento com o fungicida Hinosan em todos os ensaios.

Em outro trabalho com fungos do gênero *Trichoderma*, Khalili et al. (2005) avaliaram diversos isolados no biocontrole da mancha parda em arroz através dos métodos de pulverização foliar e do tratamento de sementes. Tendo como base os melhores resultados de redução da severidade da doença *in vitro*, onze isolados foram selecionados para ensaios em casa de vegetação. No primeiro ensaio, a microbiolização de sementes, previamente infectadas com *B. oryzae*, com suspensão de esporos de *Trichoderma* spp. (10^8 esporos mL^{-1}) resultou na redução da severidade da doença independente do isolado utilizado. Através da pulverização foliar com a mesma suspensão de esporos do antagonista, 24 horas antes da inoculação com o patógeno, os autores também observaram menores índices de severidade

nas plantas tratadas em comparação com o controle. No ensaio com o tratamento de sementes, a porcentagem de controle da doença ficou entre 20,8 e 61,2%, enquanto que no de pulverização foliar essa porcentagem variou entre 32,2 e 59,6%. Em ambos os ensaios *in vivo*, o uso da suspensão de esporos do isolado de *T. harzianum* 20 foi o que resultou nas maiores reduções de severidade observadas. Um resultado interessante desse estudo é que dos três isolados que apresentaram os maiores índices de controle da mancha parda *in vitro*, apenas um manteve-se entre os melhores nos ensaios *in vivo*.

Essa observação de diferenças entre os resultados apresentados *in vitro* e aqueles proporcionados em situação de campo é frequente em trabalhos envolvendo o controle biológico de doenças (FRAVEL, 1988; FRAVEL, 2005; KARIMI et al., 2016). Conforme mencionado anteriormente, as condições às quais os micro-organismos são expostos são bem discrepantes dependendo de onde estes são aplicados (LINDOW & BRANDL, 2003). Por isso, as diferenças em temperatura, umidade, pH, radiação solar além da menor disponibilidade de nutrientes e da competição com micro-organismos mais adaptados à filosfera podem reduzir as chances de antagonistas isolados de solo, como é o caso do presente estudo, sobreviverem e, conseqüentemente, atuarem no biocontrole (KARIMI et al., 2016). Ainda segundo estes autores, esse problema pode ser solucionado pela condução de ensaios, além daqueles de antagonismos convencionais, que verifiquem a capacidade dos potenciais antagonistas resistirem a estresses ambientais, como os citados anteriormente. Uma outra abordagem que vem sendo feita em alguns estudos refere-se ao uso de materiais como por exemplo o amido que, quando misturados ao antagonista, garantem à esses uma proteção contra fatores ambientais, resultando também na maior sobrevivência desses no tecido hospedeiro ao longo do tempo (PARAFATI et al., 2016. MARÍN et al., 2016).

No presente estudo, não foi avaliada a sobrevivência dos antagonistas nas folhas de arroz após 48h. No entanto e considerando os argumentos citados, a sobrevivência de *Bacillus* spp. e *P. lilacinus* nas folhas, aplicados na forma de suspensões de esporos em água, pode ser considerada como uma das possíveis causas da diferença entre os ensaios *in vitro* e *in vivo* desse trabalho. Visto isso, outros ensaios visando garantir essa sobrevivência devem ser conduzidos a fim de se conseguir avaliar o potencial desses isolados como agentes de biocontrole da mancha parda em plantas de arroz.

5. CONCLUSÕES

Os micro-organismos isolados de solo e identificados como *Bacillus amyloliquefaciens* ou *B. methylotrophicus* e *Paecilomyces lilacinus* inibiram, *in vitro*, o crescimento micelial de *Bipolaris oryzae*, *Magnaporthe oryzae*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Phytophthora infestans*. Com base nesses resultados, outros estudos com esses antagonistas podem ser conduzidos visando o controle *in vivo* de *M. oryzae*, *S. sclerotiorum* e *P. infestans*;

O efeito antagônico de *Bacillus* spp. e *P. lilacinus* sobre *B. oryzae* foi devido a metabólitos dissolvidos no meio e, também, à produção de compostos orgânicos voláteis;

Os filtrados de cultivo dos dois isolados reduziram o crescimento micelial do fitopatógeno. No entanto, apenas o filtrado de *Bacillus* spp., nas condições avaliadas, foi capaz de inibir a esporulação e a germinação dos esporos de *B. oryzae*;

O filtrado de cultivo de *Bacillus* spp. demonstrou ser termo e fotoestável; enquanto que o filtrado de *P. lilacinus* perdeu sua atividade quando exposto à luz ultravioleta;

Os tratamentos de folhas de arroz, inoculadas com *B. oryzae*, com suspensões de células ou de esporos dos antagonistas não reduziram a incidência e a severidade da mancha parda;

Os resultados deste estudo permitem concluir que o isolado de *Bacillus* spp. apresentou-se, nas condições avaliadas, como um melhor agente de biocontrole em comparação com *P. lilacinus*.

REFERÊNCIAS

- ABCBio – Associação Brasileira das Empresas de Controle Biológico. **Mercado de defensivo biológico pode crescer até 20% ao ano no Brasil**. 2016. Disponível em: <<http://www.abcbio.org.br/conteudo/publicacao/categoria/abcbio-na-midia/>>. Acesso em: 1 outubro 2017.
- ABDEL-FATTAH, G.M.; SHABANA, Y.M.; ISMAIL, A.E.; RASHAD, Y.M. *Trichoderma harzianum*: A biocontrol agent against *Bipolaris oryzae*. **Mycopathologia**, v. 164, n. 2, p. 81-89, 2007.
- ABREU, A.G.; OLIVEIRA, J.P. Botânica e desenvolvimento fenológico da planta. In: BORÉM, A.; RANGEL, P.H.N. (Ed). **Arroz – do plantio à colheita**. Viçosa: UFV, 2015. p. 27-42.
- ACHATZ, B. **Untersuchungen zum Einfluss des Wurzelendophyten *Piriformospora indica* auf das Wachstum von *Hordeum vulgare*, die Resistenz gegen *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* und die Genexpression in den Blättern**. 2006. 195 p. Tese de doutorado – Marburg University, Marburg, Alemanha, 2006.
- ADAMS, D. J. Fungal cell wall chitinases and glucanases. **Microbiology**, v. 150, n. 7, p. 2029-2035, 2004.
- AGROFIT – **Sistema de agrotóxicos fitossanitários**. 2017. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 10 agosto 2017.
- AIT-KAKI, A.; KACEM-CHAOUCHE, N.; ONGENA, M.; KARA-ALI, M.; DEHIMAT, L.; KAHLAT, K.; THONART, P. *In vitro* and *in vivo* characterization of plant growth promoting *Bacillus* strains isolated from extreme environments of Eastern Algeria. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, p. 1735-1746, 2014.
- ALABOUVETTE, C.; STEINBERG, C. The soil as a reservoir for antagonists to plant diseases. In: EILENBERG, J.; HOKKANEN, H.M.T. (Ed.). **An Ecological and Societal Approach to Biological Control**. Dordrecht: Springer, 2006, p. 123-144.
- ANASTASIADIS, I.A.; GIANNAKOU, I.O.; PROPHETOU-ATHANASIADOU, D.A.; GOWEN, S.R. The combined effect of the application of a biocontrol agent *Paecilomyces lilacinus*, with various practices for the control of root-knot nematodes. **Crop Protection**, v. 27, n. 3–5, p. 352-361, 2008.
- ALUKO, M.O. Crop losses caused by the brown leaf spot disease of rice in Nigeria. **Plant Disease Reporter**, v. 59, p. 609-613.
- ASARI, S.; MATZÉN, S.; PETERSEN, M.A.; BEJAI, S.; MEIJER, J. Multiple effects of *Bacillus amyloliquefaciens* volatile compounds: Plant growth promotion and growth inhibition of phytopathogens. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 92, n. 6, p. 1-11, 2016.

AVUPATI, R.N.S.S.; KHAN, M.S.; JOHNSON, S.; SHIVASHANKARA; YOGI, M.K. Diversity and functional annotation of chitinolytic *Bacillus* and associated chitinases from north western Indian Himalayas. **Applied Soil Ecology**, v. 119, p. 46-55, 2017.

AZAMBUJA, I.H.V.; VERNETTI Jr., F.J.; MAGALHÃES Jr., A.M. Aspectos socioeconômicos da produção de arroz. In: GOMES, A.S.; MAGALHÃES Jr., A.M. (Ed.). **Arroz irrigado no sul do Brasil**. Brasília: EMBRAPA, 2004, p. 23-44.

BARNWAL, M.K.; KOTASTHANE, A.; MAGCULIA, N.; MUKHERJEE, P.K.; SAVARY, S.; SHARMA, A.K.; SINGH, U.S.; SPARKS, A.H.; VARIAR, M.; ZAIDI, N. A review on crop losses, epidemiology and disease management of rice brown spot to identify research priorities and knowledge gaps. **European Journal of Plant Pathology**, v. 136, p. 443-457, 2013.

BEDENDO, I.P.; PRABHU, A.S. Doenças do arroz. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A (Ed.). **Manual de Fitopatologia: Doenças da plantas cultivadas**. 5 ed. Ouro Fino: Ceres, 2016. v. 2, p. 87-100.

BEDENDO, I.P.; MASSOLA Jr, N.S.; AMORIM, L. Controles cultural, físico e biológico de plantas. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. (Ed.). **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. 4 ed. São Paulo: Ceres, 2011. v. 1, p. 367-388.

BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B.; PINTO, Z.V.; PAULA Jr., T.J.; CORRÊA, E.B.; MOURA, A.B.; LUCON, C.M.M.; COSTA, J.C.B.; BEZERRA, J.L. **Produtos comerciais à base de agentes de biocontrole de doenças de plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA, 2012, 155 p. (Documentos, 88).

BETTIOL, W.; GHINI, R; MARIANO, R.R.L.; MICHEREFF, S.M.; MATTOS, L.P.V.; ALVARADO, I.C.M.; PINTO, Z.V. Supressividade a fitopatógenos habitantes de solo. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. **Biocontrole de doenças de plantas: Uso e perspectivas**. Jaguariúna: EMBRAPA, 2009, p. 187-208.

BETTIOL, W. Conversão de sistemas de produção. In: Poltronieri, L.S. & Ishida, A.K.N. (Ed.).

Métodos Alternativos de Controle de Insetos-Praga, Doenças e Plantas Daninhas: Panorama atual e perspectivas. Belém: Embrapa, 2008, p. 289-308.

BETTIOL, W.; GHINI, R. Controle biológico. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. 3 ed. São Paulo: Ceres, 1995. v. 1, p. 717-728.

BONANTS, P. J. M.; FITTERS, P. F. L.; THIJS, H.; DEN BELDER, E.; WAALWIJK, C.; HENFLING, J. W. D. M. A basic serine protease from *Paecilomyces lilacinus* with biological activity against *Meloidogyne hapla* eggs. **Microbiology**, v. 141, n. 4, p. 775–784, 1995.

BOOTH, C. **Methods in Microbiology**. New York: Academic Press, 1971. v. 4, 795 p.

BOUKAEW, S.; PETLAMUL, W.; BUNKRONGCHEAP, R.; CHOOKAEW, T.; KABBUA, T.; THIPPATED, A.; PRASERTSAN, P. Fumigant activity of volatile compounds of *Streptomyces philanthi* RM-1-138 and pure chemicals (acetophenone and phenylethyl alcohol) against anthracnose pathogen in postharvest chili fruit. **Crop Protection**, v. 103, p. 1-8, 2018.

BOUKAEW, S.; PRASERTSAN, P. Suppression of rice sheath blight disease using a heat stable culture filtrate from *Streptomyces philanthi* RM-1-138. **Crop Protection**, v. 61, p. 1-10, 2014.

BRAKHAGE, A.A. Regulation of fungal secondary metabolism. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 21-32, 2013.

BULL, C.T.; STACK, J.P.; SMILANICK, J.L. *Pseudomonas syringae* strains ESC-10 and ESC-11 survive in wounds on citrus and control green and blue molds of citrus. **Biological Control**, v. 8, p. 81-88, 1997.

CAMILI, E.C., BENATO, E.A., PASCHOLATI, S.F.; CIA, P. Vaporização de ácido acético para o controle pós-colheita de *Botrytis cinerea* em uva 'itália'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.32, p. 436-443, 2010.

CANTERI, M.G.; ALTHAUS, R.A.; VIRGENS FILHO, J.S.; GIGLIOTI, E.A.; GODOY, C.V. SASM - Agri: Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scoft - Knott, Tukey e Duncan. **Revista Brasileira de Agrocomputação**, v.1, n.2, p. 18-24, 2001.

CARTWRIGHT, D.K.; BENSON, D.M. Biological control of *Rhizoctonia* stem rot of poinsettia in polyfoam rooting cubes with *Pseudomonas cepacia* and *Paecilomyces lilacinus*. **Biological Control**, v. 5, p. 237-244, 1995

CAYROL, J.; DJIAN, C.; PIJAROWSKI, L. Study of the nematocidal properties of the culture filtrate of the nematophagous fungus *Paecilomyces lilacinus*. **Revue Nématologique**, v. 12, p. 331-336, 1989.

CELMER, A.; MADALOSSO, M.G.; DEBORTOLI, M.P.; NAVARINI, L.; BALARDIN, R.S. Controle químico de doenças foliares na cultura do arroz irrigado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 6, p. 901-904, 2007.

CHANG, T.T. The origin, evolution, cultivation, dissemination, and diversification of Asian and African rices. **Euphytica**, v. 25, p. 425-441, 1976.

CHANG, T.T.; BARDENAS, E.A. **The morphology and varietal characteristics of the rice plant**. Los Baños: IRRI, 1965. 40 p. (IRRI Technical Bulletin, 4).

CHEN, S.Y.; DICKSON, D.W. Fungal penetration of the cyst wall of *Heterodera glycines*. **Phytopathology**, v. 86, p. 319-327, 1996.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos: Décimo segundo levantamento da safra 2016/17**. 2017. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/>>. Acesso em: 15 outubro 2017.

CONTRERAS-CORNEJO, H.A.; MACÍAS-RODRÍGUEZ, L.; DEL-VAL, E.; LARSEN, J. Ecological functions of *Trichoderma* spp. and their secondary metabolites in the rhizosphere: interactions with plants. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 92, n. 4, p. 1-17, 2016.

COOK, R.J.; BAKER, K.F. **The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens**. St. Paul, USA: APS Press, 1983, 539 p.

DALLAGNOL, L.J.; NAVARINI, L.; BALARDIN, R.S.; GOSENHEIMER, A.; MAFFINI, A.A. Dano das doenças foliares na cultura do arroz irrigado e eficiência de controle dos fungicidas. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 12, n. 3, p. 313-318, 2006.

DEGENKOLB, T.; VILCINSKAS, A. Metabolites from nematophagous fungi and nematicidal natural products from fungi as an alternative for biological control. Part I: metabolites from nematophagous ascomycetes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 9, p. 3799-3812, 2016.

DICKINSON, J.M.; HANSON, J.R.; HITCHCOCK, P.B.; CLAYDON, N. Structure and biosynthesis of harzianopyridone, an antifungal metabolite of *Trichoderma harzianum*. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1**, v.1, p. 1885-1887, 1989.

DJIAN, C.; PIJAROWSKI, L.; PONCHET, M.; ARPIN, N.; FAVRE-BONVIN, J. Acetic acid: A selective nematicidal metabolite from culture filtrates of *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson and *Trichoderma longibrachiatum* Rifai. **Nematologica**, v. 37, p. 101-112, 1991.

DRUZHININA, I.S.; SEIDL-SEIBOTH, V.; HERRERA-ESTRELLA, A.; HORWITZ, B.A.; KENERLEY, C.M.; MONTE, E.; MUKHERJEE, P.K.; ZEILINGER, S.; GRIGORIEV, I.V.; KUBICEK, C.P. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, p. 749-759, 2011.

DUIJFF, B.J.; RECOBERT, G.; BAKKER, P.A.H.M.; LOPER, J.E.; LEMANCEAU, P. Microbial antagonism at the root level is involved in the suppression of *Fusarium* wilt by the combination of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47 and *Pseudomonas putida* WCS358. **Phytopathology**, v. 89, p. 1073-1079, 1999.

DUNLOP, R.W.; SIMON, A; SIVASITHAMPARAM, K; GHISALBERTI, E.L. An antibiotic from *Trichoderma koningii* active against soilborne plant pathogens. **Journal of Natural Products**, v. 52, p. 67-74, 1989.

EVIDENTE, A.; CABRAS, A; MADDAU, L.; SERRA, S.; ANDOLFI, A.; MOTTA, A. Viridepyronone, a new antifungal 6-substituted 2H-pyran-2-one produced by *Trichoderma viride*. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 51, p. 6957-6960, 2003.

FAKHRO A.; ANDRADE-LINARES, D.R.; VON BARGEN S.; BANDTE, M; BUTTNER, C.; GROSCHE, R.; SCHWARZ, D.; FRANKEN, P. Impact of *Piriformospora indica* on tomato growth and on interaction with fungal and viral pathogens. **Mycorrhiza**, v. 20, p. 191-200, 2009.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. **FAOSTAT**. 2014. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#home>>. Acesso em: 15 outubro 2017.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Statiscal Yearbook: World food and agriculture**. 2013. Disponível em: <<http://www.fao.org/economic/ess/ess-publications/ess-yearbook/en/#.Wf3z99WnHIU>>. Acesso em: 15 outubro 2017.

FISCHER, G.; SCHWALBE, R.; MÖLLER, M.; OSTROWSKI, R.; DOTT, W. Species-specific production of microbial volatile organic compounds (MVOC) by airborne fungi from a compost facility. **Chemosphere**, v. 39, n. 5, p. 795-810, 1999.

FRAVEL, D.R. Commercialization and implementation of biocontrol. **Annual Review of Phytopathology**, v. 43, p. 337-359, 2005.

FRAVEL, D.R. Role of antibiosis in the bicontrol of plant disases. **Annual Review of Phytopathology**, v. 26, p. 75-91, 1988.

FULLER, D.Q.; QIN, L.; ZHENG, Y.; ZHAO, Z.; CHEN, X, HOSOYA, L.A.; SUN, G.P. The domestication process and domestication rate in rice: Spikelet bases from the lower Yangtze. **Science**, v. 323, p. 1607-1610, 2009.

GARRIS, A.J.; TAI, T.H.; COBURN, J.; KRESOVICH, S.; MCCOUCH, S. Genetic structure and diversity in *Oryza sativa* L. **Genetics**, v. 169, p. 1631-1638, 2005.

GOMES, A.A.A.; QUEIROZ, M.V.; PEREIRA, O.L. Mycofumigation for the biological control of post-harvest diseases in fruits and vegetables: A review. **Austin Journal of Biotechnology & Bioengineering**, v. 2, n. 4, p. 1-8, 2015.

GOTOR-VILA, A.; TEIXIDÓ, N.; DI FRANCESCO, A.; USALL, J.; UGOLINI, L.; TORRES, R.; MARI, M. Antifungal effect of volatile organic compounds produced by *Bacillus amyloliquefaciens* CPA-8 against fruit pathogen decays of cherry. **Food Microbiology**, v. 64, p. 219-225, 2017.

GROTH, D.E.; RUSH, M.C.; LINDBERG, G.D. Foliar fungicides for control of rice disease in the United States. In: GRAYSON, B.T.; GREEN, M.G.; COPPING, L.G. (Ed.). **Pest management in rice**, 1990, p. 31-52.

GURAV, R.; TANG, J.; JADHAV, J. Novel chitinase producer *Bacillus pumilus* RST25 isolated from the shellfish processing industry revealed antifungal potential against phytopathogens. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 125, p. 228-234, 2017.

HARMAN, G.E.; HOWELL, C.R.; VITERBO, A.; CHET, I; LORITO, M. *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, p. 43-56, 2004.

HASHEM, M.; ABO-ELYOUSR, K.A. Management of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* on tomato with combinations of different biocontrol organisms. **Crop Protection**, v. 30, n. 3, p. 285-292, 2011.

HERNÁNDEZ-LEÓN, R.; ROJAS-SOLÍS, D.; CONTRERAS-PÉREZ, M.; OROZCO-MOSQUEDA, M.C.; MACÍAS-RODRÍGUEZ, L.I.; REYES-DE LA CRUZ, H.; VALENCIA-CANTERO, E.; SANTOYO, G. Characterization of the antifungal and plant growth-promoting effects of diffusible and volatile organic compounds produced by *Pseudomonas fluorescens* strains. **Biological Control**, v. 81, p. 83-92, 2015.

HERRINGTON, P.R.; CRAIG, J.T.; SHERIDAN, J. Methyl vinyl ketone: A volatile fungistatic inhibitor from *Streptomyces griseoruber*. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 19, n. 5, p. 509-512, 1987.

HOLINSWORTH, B.; MARTIN, J.D. Siderophore production by marine-derived fungi. **Biometals**, v. 22, n. 4, p. 625-632, 2009.

INOUE-NAGATA, A.K.; LOPES, C.A.; REIS, A.; PEREIRA R.B.; QUEZADO-DUVAL, A.M.; PINHEIRO, J.B.; LIMA, M.F. Doenças do tomateiro. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A; CAMARGO, L.E.A (Ed.). **Manual de Fitopatologia: Doenças da plantas cultivadas**. 5 ed. Ouro Fino: Ceres, 2016. v. 2, p. 697-732.

ISHIHARA, A.; NAKAO, T.; MASHIMO, Y.; MURAI, M.; ICHIMARU, N.; TANAKA, C.; NAKAJIMA, H.; WAKASA, K.; MIYAGAWA, H. Probing the role of tryptophan-derived secondary metabolism in defense responses against *Bipolaris oryzae* infection in rice leaves by a suicide substrate of tryptophan decarboxylase. **Phytochemistry**, v. 72, p. 7-13, 2011.

JACOBS, J.L.; SUNDIN, G.W. Effect of solar UV-B radiation on a phyllosphere bacterial community. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 12, p. 5488-5496, 2001.

JATALA, P. Biological control of plant-parasitic nematodes. **Annual Review of Phytopathology**, v. 24, p. 453-489, 1986.

JEONG, M.H.; LEE, Y.S.; CHO, J.Y.; AHN, Y.S.; MOON, J.H.; HYUN, H.N.; CHA, G.S.; KIM, K.Y. Isolation and characterization of metabolites from *Bacillus licheniformis* MH48 with antifungal activity against plant pathogens. **Microbial Pathogenesis**, v. 110, p. 645-653, 2017.

KARIMI, E.; SAFAIE, N.; SHAMS-BAKSH, M.; MAHMOUDI, B. *Bacillus amyloliquefaciens* SB14 from rhizosphere alleviates *Rhizoctonia* damping-off disease on sugar beet. **Microbiological Research**, v. 192, p. 221-230, 2016.

KARLOVSKY, P. **Soil Biology: Secondary metabolites in soils ecology**. Berlin: Springer, 2008, v. 14, 293 p.

KAVITHA, S.; SENTHILKUMAR, S.; GNANAMANICKAM, S.; INAYATHULLAH, M.; JAYAKUMAR, R. Isolation and partial characterization of antifungal protein from *Bacillus polymyxa* strain VLB16. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 10, p. 3236-3243, 2005.

KHALILI, E.; SADRAVI, M.; NAEIMI, S.; KHOSRAVI, V. Biological control of rice brown spot with native isolates of three *Trichoderma* species. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 1, p. 297-305, 2012.

KHAN, A.; SINGH, P.; SRIVASTAVA, A. Synthesis, nature and utility of universal iron chelator – Siderophore: A review. **Microbiological Research**, p. 1-9, 2017.

KHAN, A.; WILLIAMS, K. L.; NEVALAINEN, H. K. M. Control of plant-parasitic nematodes by *Paecilomyces lilacinus* and *Monacrosporium lysipagum* in pot trials. **BioControl**, v. 51, n. 5, p. 643-658, 2006.

KHAN, A.; WILLIAMS, K. L.; NEVALAINEN, H. K. M. Effects of *Paecilomyces lilacinus* protease and chitinase on the eggshell structures and hatching of *Meloidogyne javanica* juveniles. **Biological Control**, v. 31, n. 3, p. 346-352, 2004.

KHAN, A.; WILLIAMS, K.; MOLLOY, M. P.; NEVALAINEN, H. Purification and characterization of a serine protease and chitinases from *Paecilomyces lilacinus* and detection of chitinase activity on 2D gels. **Protein Expression and Purification**, v. 32, p. 210-220, 2003a.

KHAN, A.; WILLIAMS, K.; NEVALAINEN, H. Testing the nematophagous biological control strain *Paecilomyces lilacinus* 251 for paecilotoxin production. **FEMS Microbiology Letters**, v. 227, p. 107-111, 2003b.

KHUSH, G.S. Origin, dispersal, cultivation and variation of rice. **Plant Molecular Biology**, Belgium, v. 35, p25-34, 1997.

KIEWNICK, S.; SIKORA, R.A. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* by *Paecilomyces lilacinus* strain 251. **Biological Control**, v. 38, n. 2, p. 179-187, 2006.

KOVACH, M.J.; SWEENEY, M.T.; MCCOUCH S.R. New insights into the history of rice domestication. **Trends in Genetics**, v. 23, p. 579-587, 2007.

LI, X.; ZHANG, Y.; WEI, Z.; GUAN, Z.; CAI, Y.; LIAO, X. Antifungal activity of isolated *Bacillus amyloliquefaciens* SYBC H47 for the biocontrol of peach gummosis. **PLoS ONE**, v. 11, n. 9, p. 1-22, 2016.

LI, Q.; JIANG, Y.; NING, P.; ZHENG, L.; HUANG, J.; LI, G.; JIANG, D.; HSIANG, T. Suppression of *Magnaporthe oryzae* by culture filtrates of *Streptomyces globisporus* JK-1. **Biological Control**, v. 58, n. 2, p. 139-148, 2011.

LINDOW, S. E.; BRANDL, M. T. Microbiology of the phyllosphere. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 4, p. 1875-1883, 2003.

LIU, W.; MU, W.; ZHU, B.; DU, Y.; LIU, F. Antagonistic activities of volatiles from four strains of *Bacillus* spp. and *Paenibacillus* spp. against soil-borne plant pathogens. **Agricultural Sciences in China**, v. 7, n. 9, p. 1104-1114, 2008.

LIU, X.; WANG, J.; GOU, P.; MAO, C.; ZHU, Z. R.; LI, H. *In vitro* inhibition of postharvest pathogens of fruit and control of gray mold of strawberry and green mold of citrus by aureobasidin A. **International Journal of Food Microbiology**, 2007, v. 119, p. 223-229, 2007.

LORENÇONI, R. **Caracterização fisiológica de diferentes genótipos de arroz de terras altas**. 2013. 131 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

LORENTZ, R.H.; ÁRTICO, S.; DA SILVEIRA, A.B.; EINSFELD, A.; CORÇÃO, G. Evaluation of antimicrobial activity in *Paenibacillus* spp. strains isolated from natural environment. **Letters in Applied Microbiology**, v. 43, n. 5, p. 541-547, 2006.

LUANGSA-ARD, J.; HOUBRAKEN, J.; VAN DOORN, T.; HONG, S. B.; BORMAN, A. M.; HYWEL-JONES, N. L.; SAMSON, R. A. *Purpureocillium*, a new genus for the medically important *Paecilomyces lilacinus*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 321, n. 2, p. 141-149, 2011.

LUDWIG, J.; MOURA, A.B. Controle biológico de *Bipolaris oryzae* no arroz irrigado. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. **Biocontrole de doenças de plantas: Uso e perspectivas**. Jaguariúna: EMBRAPA, 2009, p. 317-330.

MAGALHÃES Jr., A.M.; TERRES, A.L.; FAGUNDES, P.R.; FRANCO, D.F.; ANDRES, A. Aspectos genéticos, morfológicos e de desenvolvimento de plantas de arroz irrigado. In: GOMES, A.S.; MAGALHÃES Jr., A.M. (Ed.). **Arroz irrigado no sul do Brasil**. Brasília: EMBRAPA, 2004, p. 143-160.

MALAVOLTA, V.M.A.; SOLIGO, E.A.; DIAS, D.D.; AZZINI, L.E.; BASTOS, C.R. Incidência de fungos e quantificação de danos em sementes de genótipos de arroz. **Summa Phytopathologica**, v. 33, n. 3, p. 280-286, 2007.

MALAVOLTA, V.M.A.; PARISI, J.J.D.; TAKADA, H.M.; MARTINS, M.C. Efeito de diferentes níveis de incidência de *Bipolaris oryzae* em sementes de arroz sobre aspectos fisiológicos, transmissão do patógeno às plântulas e produção. **Summa Phytopathologica**, v. 28, n. 4, p. 337-341, 2002.

MANIMEGALAI, V.; AMBIKAPATHY, V.; PANNEERSELVAM, A. Biological control of paddy brown spot caused by *Bipolaris Oryzae* (Breda de Haan). **European Journal of Experimental Biology**, v. 1, n. 4, p. 24-28, 2011.

MARÍN, A.; CHÁFER, M.; ATARÉS, L.; CHIRALT, A.; TORRES, R.; USALL, J.; TEIXIDÓ, N. Effect of different coating-forming agents on the efficacy of the biocontrol agent *Candida sake* CPA-1 for control of *Botrytis cinerea* on grapes. **Biological Control**, v. 96, p. 108–119, 2016.

MARTIN, J.P. Use of acid, rose bengal, and streptomycin in the plate method for estimating soil fungi. **Soil Science**, v. 69, p. 215-323, 1950.

MATTOS, M. L. T.; MARTINS, J. F. S.; NUNES, C. D. M.; MOURA NETO, F. P.; MAGALHÃES JÚNIOR, A.; PETRINI, J. A.; SANTOS, I. B. **Monitoramento de agrotóxicos em áreas piloto da produção integrada de arroz irrigado na planície costeira externa e fronteira oeste do Rio Grande do Sul**. Pelotas: Embrapa, 2011. 4 p. (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 197).

MELO, I.S. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Ed.). **Controle biológico**. Jaguariúna: EMBRAPA, 1998. v. 1, p. 17-68.

MENDES, R. Solos supressivos e o controle de doenças de plantas. In: HALFELD-VIEIRA, B.A.; MARINHO-PRADO, J.S.; NECHET, K.L.; MORANDI, M.A.B.; BETTIOL, W (Ed.). **Defensivos agrícolas naturais: usos e perspectivas**. Brasília: EMBRAPA, 2016, p. 65-80.

MEW, T.W.; GONZALES, P. **A handbook of rice seedborne fungi**. Los Baños: IRRI, and Enfield: Science Publishers, 2002, 83 p.

MOHANTY, S.; WASSMANN, R.; NELSON, A.; MOYA, P.; JAGADISH, SVK. Rice and climate change: significance for food security and vulnerability. **IRRI Discussion Paper Series**, n. 49. Los Baños: International Rice Research Institute, 2013, 14p.

MORANDI, M.A.B.; BETTIOL, W. Controle Biológico de doenças de plantas no Brasil. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. **Biocontrole de doenças de plantas: Uso e perspectivas**. Jaguariúna: EMBRAPA, 2009, p. 7-14.

MUKERJI, K.G.; MANOHARACHARY, C.; CHAMOLA, B.P. **Techniques in mycorrhizal studies**. Dordrecht: Springer, 2002. 554 p.

NASCIMENTO, C. E. S. **Comportamento invasor da algarobeira *Prosopis juliflora* (Sw) DC. nas planícies aluviais da Caatinga**. 2008. 115 p. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2008.

NCBI – **National Center for Biotechnology Information**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 14 Junho 2017.

NINGTHOUJAM, D.S.; SANASAM, S.; TAMREIHAO, K.; NIMAICHAND, S. Antagonistic activities of local actinomycete isolates against rice fungal pathogens. **African Journal of Microbiology Research**, v. 3, n. 11, p. 737-742, 2009.

NUNES, C.D.M.; RIBEIRO, A.S.; TERRES, A.L.S. Principais doenças em arroz irrigado e seu controle. In: GOMES, A.S.; MAGALHÃES Jr., A.M. (Ed.). **Arroz irrigado no sul do Brasil**. Brasília: EMBRAPA, 2004, p. 579-622.

OTTONI, G.; OLIVEIRA, W.F.; SILVA, A.L.; ALBERNAZ, K.C.; SILVA, E.G.; CARDOSO, E.; GUICHERIT, E. Eficiência de fungicidas no controle de mancha-parda (*Bipolaris oryzae*) em arroz (*Oryza sativa*). **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.30, p.59-62, 2000.

O'BRIEN, P.A. Biological control of plant diseases. **Australasian Plant Pathology**, v. 46, p. 293-304, 2017.

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

PADMANABHAN, S.Y. The great Bengal famine. **Annual Review of Phytopathology**, v. 11, p. 11-24, 1973.

PARA – Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos. **Relatório das análises de amostras monitoradas no período de 2013 a 2015**. Brasília: ANVISA, 2016, 246 p.

PARAFATI, L.; VITALE, A.; RESTUCCIA, C.; CIRVILLERI, G. The effect of locust bean gum (LBG)-based edible coatings carrying biocontrol yeasts against *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* causal agents of postharvest decay of mandarin fruit. **Food Microbiology**, v. 58, p. 87–94, 2016.

PASCHOLATI, S.F.; DALIO, R.J.D.; CARDOSO FILHO, J.A.; BRAND, S.C.; PINTO, L. R.; OSSWALD, W. *Piriformospora indica* - indutor de resistência em plantas contra patógenos. In: RODRIGUES, F.A.; FORTUNATO, A.A. (Ed.). **Indução de resistência em plantas a patógenos** - Anais da IV Reunião Brasileira Sobre Indução de Resistência em Plantas a Patógenos. Viçosa: Departamento de Fitopatologia - UFV, 2012. p. 79-112.

PEDRAZOLLI, D.S.; HERRMANN, G.R. Análise do mercado de defensivos agrícolas naturais. In: HALFELD-VIEIRA, B.A.; MARINHO-PRADO, J.S.; NECHET, K.L.; MORANDI, M.A.B.; BETTIOL, W (Ed.). Defensivos agrícolas naturais: usos e perspectivas. Brasília: EMBRAPA, 2016, p. 65-80.

PEREZ, K.J.; VIANA, J.S.; LOPES, F.C.; PEREIRA, J.Q.; DOS SANTOS, D.M.; OLIVEIRA, J.S.; VELHO, R.V.; CRISPIM, S.M.; NICOLI, J.R.; BRANDELLI, A.; NARDI, R.M.D. *Bacillus* spp. isolated from puba as a source of biosurfactants and antimicrobial lipopeptides. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1-14, 2017.

PESTANA, C.B. Estudos de laboratório exigidos para o registros de produtos microbiológicos. In: HALFELD-VIEIRA, B.A.; MARINHO-PRADO, J.S.; NECHET, K.L.; MORANDI, M.A.B.; BETTIOL, W (Ed.). Defensivos agrícolas naturais: usos e perspectivas. Brasília: EMBRAPA, 2016, p. 30-51.

PINHEIRO, B.S. Características morfofisiológicas da planta relacionadas à produtividade. In: VIEIRA, N.R.A.; SANTOS, A.B.; SANT'ANA, E.P. (Ed.). **A cultura do arroz no Brasil**. Santo Antônio de Goiás: EMBRAPA, 1999, p. 117-148.

PINTO, A.R.C.; TRABAGLIA, D.P.; LACERDA, D.B.C.L.; SERRA, F.R.; SOUSA, M.C.A.J. Arroz: Tecnologia e alimentação. In: OLIVEIRA NETO, A.A. (Ed.). **A cultura do arroz**. Brasília: CONAB, 2015, p. 13-23.

PRABHU, A.S.; FILIPPI, M.C.; RIBEIRO, A.S. Doenças e seu controle. In: VIEIRA, N.R.A.; SANTOS, A.B.; SANT'ANA, E.P. (Ed.). **A cultura do arroz no Brasil**. Santo Antônio de Goiás: EMBRAPA, 1999, p. 263-308.

PRABHU, A.S.; BEDENDO, I.P.; FILIPPI, M.C. **Principais doenças do arroz no Brasil**. 3 ed. Goiânia: EMBRAPA, 1995, 43 p.

PRABHU, A.S.; SANTOS, A.B. Four fungicides for control of grain infection *Helminthosporium oryzae*. **International Rice Research Newsletter**, v. 13, p.19-20, 1988.

PRABHU, A.S.; LOPES, A.M.; ZIMMERMANN, F.J.P. Infecção da folha e do grão de arroz por *Helminthosporium oryzae* e seus efeitos sobre os componentes de produção. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 15, p. 183-189, 1980.

RAMÍREZ, C.A.; KLOEPPER, J.W. Plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 depends on inoculum rate and P-related soil properties. **Biology and Fertility of Soils**, v. 46, n. 8, p. 835-844, 2010.

REDDY, P.P. Principles of biomanagement. In: REDDY, P.P. (Ed.). **Handbook of Biological Control in Horticultural Crops**. Houston, USA: Studium Press, 2011. v. 2, p. 3-74.

REINO, J.L.; GUERRERO, R.F.; HERNÁNDEZ-GALÁN, R.; COLLADO, I.G. Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. **Phytochemistry Reviews**, v. 7, p. 89-123, 2008.

REZENDE, D.C.; RODRIGUES, F.Á.; CARRÉ-MISSIO, V.; SCHURT, D.A.; KAWAMURA, I.K.; KORNDÖRFER, G.H. Effect of root and foliar applications of silicon on brown spot development in rice. *Australasian Plant Pathology*, v. 38, p. 67-73, 2009.

REZENDE, D.C.; FIALHO, M.B.; SARRIA, G.A.; BLUMER, S.; TOFFANO, L. PASCHOLATI. Compostos orgânicos voláteis fúngicos no controle de fitopatógenos. In: LUZ, W.C. RAPP – Revisão anual de patologia de plantas. Brasília: Revisão Anual de Patologia de Plantas, 2010. v. 18, p. 276-302.

ROSALES, A.M.; VANTOMME, R.; SWINGS, J.; DE LEY, J.; MEW, T.W. Identification of some bacteria from paddy antagonistic to several rice fungal pathogens. **Journal of Phytopathology**, v. 138, n. 3, p. 189-208, 1993.

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

SCHEUERMANN, K.K. Manejo de doenças. In: BORÉM, A.; RANGEL, P.H.N. (Ed). **Arroz – do plantio à colheita**. Viçosa: UFV, 2015. p. 199-219.

SCHMALENBERGER, A.; SCHWIEGER, F.; TEBBE, C.C. Effect of primers hybridizing to different evolutionarily conserved regions of the small-subunit rRNA gene in PCR-based microbial community analyses and genetic profiling. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 3557-3563, 2001.

SCHMIDT, R.; CORDOVEZ, V.; DE BOER, W.; RAAIJMAKERS, J.; GARBEVA, P. Volatile affairs in microbial interactions. **The ISME Journal**, v. 9, n. 11, p. 2329-2335, 2015.

SCORZA Jr., R. P.; NÉVOLA, F. A. ; AYELO, V. S.; **ACHA: Avaliação da contaminação hídrica por agrotóxico**. Dourados: EMBRAPA, 2010, 32p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 58).

SHAHOLLARI, B.; VARMA, A.; OELMÜLLER, R. Expression of a receptor kinase in *Arabidopsis* roots is stimulated by the basidiomycete *Piriformospora indica* and the protein accumulates in Triton X-100 insoluble plasma membrane microdomains. **Journal of Plant Physiology**, v. 162, n. 8, p. 945-958, 2005.

SHARMA, A.; SHARMA, S.; DALELA, M. Nematicidal activity of *Paecilomyces lilacinus* 6029 cultured on Karanja cake medium. **Microbial Pathogenesis**, v. 75, p. 16-20, 2014.

SHEORAN, N.; VALIYA NADAKKAKATH, A.; MUNJAL, V.; KUNDU, A.; SUBAHARAN, K.; VENUGOPAL, V.; RAJAMMA, S.; EAPEN, S. J.; KUMAR, A. Genetic analysis of plant endophytic *Pseudomonas putida* BP25 and chemo-profiling of its antimicrobial volatile organic compounds. **Microbiological Research**, v. 173, p. 66-78, 2015

SHOLBERG, P.L.; GAUNCE, A.P. Fumigation of stonefruit with acetic acid to control postharvest decay. **HortScience**, v. 30, n. 6, p. 1275-1275, 1995.

SIDDIQUI, Z.A.; MAHMOOD, I. Biological control of plant parasitic nematodes by fungi : a review. **Bioresource Technology**, v. 58, p. 229-239, 1996.

SILVA, D. R. O.; AVILA, L. A.; AGOSTINETTO, D.; BUNDT, A. D. C.; PRIMEL, E. G.; CALDAS, S. S. Ocorrência de agrotóxicos em águas subterrâneas de áreas adjacentes a lavouras de arroz irrigado. **Química Nova**, São Paulo, v. 34, n. 5, p. 748-752, 2011.

SILVA, D. R. O.; AVILA, L. A.; AGOSTINETTO, D.; MAGRO, T. D.; OLIVEIRA, E.; ZANELLA, R.; NOLDIN J. A. Monitoramento de agrotóxicos em águas superficiais de regiões orizícolas no sul do Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n. 9, p. 2283-2389, 2009.

SOSBAI – Sociedade Sul-Brasileira de Arroz Irrigado. **Arroz irrigado: Recomendações técnicas da pesquisa para o sul do Brasil**. 2014. Disponível em: <http://www.irga.rs.gov.br/upload/20141205095320recomendacoes_tecnicas_sosbai_2014.pdf>. Acesso em: 1 outubro 2017.

SOUZA, V.H.M.; ROMA-ALMEIDA, R.C.C.; MELO, T.A.; REZENDE, D.C.; INOMOTO, M.M.; PASCHOLATI, S.F. Fitonematoides: Controle biológico e indução de resistência. In: DALIO, R.J.D. RAPP – Revisão anual de patologia de plantas. Brasília: Revisão Anual de Patologia de Plantas, 2015. v. 23, p. 242-292.

SOUZA Jr, I.T.; SCHAFER, J.T.; CORRÊA, B.O.; FUNCK, G.D.; MOURA, A B. Expansion of the biocontrol spectrum of foliar diseases in rice with combinations of rhizobacteria. **Revista Ciência Agronômica**, v. 48, n. 3, p. 513-522, 2017.

SPADARO, D.; GULLINO, M.L. Improving the efficacy of biocontrol agents against soilborne pathogens. **Crop Protection**, v. 24, n. 7, p. 601-613, 2005.

SUÁREZ-ESTRELLA, F.; ARCOS-NIEVAS, M.A.; LÓPEZ, M.J.; VARGAS-GARCÍA, M.C.; MORENO, J. Biological control of plant pathogens by microorganisms isolated from agro-industrial composts. **Biological Control**, v. 67, p. 509-515, 2013.

TAMREIHAO, K.; NINGTHOUJAM, D. S.; NIMAICHAND, S.; SINGH, E. S.; REENA, P.; SINGH, S. H.; NONGTHOMBA, U. Biocontrol and plant growth promoting activities of a *Streptomyces corchorusii* strain UCR3-16 and preparation of powder formulation for application as biofertilizer agents for rice plant. **Microbiological Research**, v. 192, p. 260-270, 2016.

TEWARI, J.C.; PASIECZNIK, N.M.; HARSH, L.N.; HARRIS, P.J.C. ***Prosopis* species in the arid and semiarid zones of India**. Jodhpur: The *Prosopis* Society of India and the Henry Doubleday Research Association, 1993. 128 p.

TOFFANO, L.; FIALHO, M.B.; PASCHOLATI, S.F. Potential of fumigation of orange fruits with volatile organic compounds produced by *Saccharomyces cerevisiae* to control citrus black spot disease at postharvest. **Biological Control**, v. 108, p. 77-82, 2017.

TOJU, H.; TANABE, A.S.; YAMAMOTO, S.; SATO, H. High-coverage ITS primers for the DNA-based identification of Ascomycetes and Basidiomycetes in environmental samples. **PLoS ONE**, v. 7, e40863, 2012.

VALE, F.X.R.; FERNANDES FILHO, E.I.; LIBERATO, J.R. QUANT – A software for plant disease severity assessment. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT PATHOLOGY, 8, 2003, Christchurch, New Zealand. **Anais...** Christchurch, New Zealand. 2003, p. 105.

VARMA, A.; SINGH, A.; SUDHA; SAHAY, N.S., SHARMA, J.; ROY, A.; KUMARI, M.; RANA, D.; THAKRAN, S.; DEKA, D.; BHARTI, K.; HUREK, T.; BLECHERT, O.; REXER, K.H.; KOST, G.; HAHN, A.; MAIER, W.; WALTER, M.; STRACK, D.; KRANNER, I. *Piriformospora indica*: an axenically culturable mycorrhiza-like endosymbiotic fungus. In: HOCK, B. (Ed.). **The Mycota IX, Fungal Associations**. Berlin-Heidelberg: Springer Verlag, 2001, p.125-150.

VARMA, A.; VERMA, S.; SUDHA N.; BUTEHORN, B.; FRANKEN, P. *Piriformospora indica*, a cultivable plant-growth-promoting root endophyte. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 2741-2744, 1999.

VERMA, S.; VARMA, A.; REXER, K.; HASSEL, A.; KOST, G.; SARBHOY, A.; BISEN, P.; BÜTEHORN, B.; FRANKEN, P. *Piriformospora indica*, gen. et sp. nov., a new root-colonizing fungus. **Mycologia**, v. 90, n. 5, p. 896–903, 1998.

VAUGHAN, D.A.; MORISHIMA, H.; KADOWAKI, K. Diversity in the *Oryza* genus. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 6, p. 139-146, 2003.

VINALE, F.; MARRA, R.; SCALA, F.; GHISALBERTI, E.L.; LORITO, M.; SIVASITHAMPARAM, K. Major secondary metabolites produced by two commercial *Trichoderma* strains active against different phytopathogens. **Letters in Applied Microbiology**, v. 43, p. 143-148, 2006.

WANDER, A.E. A cultura. In: BORÉM, A.; RANGEL, P.H.N. (Ed). **Arroz – do plantio à colheita**. Viçosa: UFV, 2015. p. 9-26.

WANDER, A.E.; SILVA, O.F. Sustentabilidade econômica da cultura do arroz no Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ECONOMIA, ADMINISTRAÇÃO E SOCIOLOGIA RURAL, 51, 2013, Belém. **Anais...** Belém: SOBER, 2013, 14 p.

WEBSTER, R.K.; GUNNELL, P.S. **Compendium of rice diseases**. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1992, 62 p.

WHEATLEY, R.E. The role of soil microbial volatile products in community functional interactions. In: KARLOVSKY, P. **Soil Biology**: Secondary metabolites in soils ecology. Berlin: Springer, 2008. v. 14, p. 269-288.

WHITE, T.J., BRUNS, T., LEE, S. and TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.; GELFAND, D.; SNINSKY, J.; WHITE, T. (Ed.). **PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications**. Orlando: Academic Press, 1990. p. 315-322.

WICKLOW, D.T.; WILSON, D.M. *Paecilomyces lilacinus*, a colonist of *Aspergillus flavus* sclerotia buried in soil in Illinois and Georgia. **Mycologia**, v. 82, n. 3, p. 393-395, 1990.

WU, L.; WU, H. J.; QIAO, J.; GAO, X.; BORRIS, R. Novel routes for improving biocontrol activity of *Bacillus* based bioinoculants. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1-13, 2015.

YANG, F.; ABDELNABBY, H.; XIAO, Y. A mutant of the nematophagous fungus *Paecilomyces lilacinus* (Thom) is a novel biocontrol agent for *Sclerotinia sclerotiorum*. **Microbial Pathogenesis**, v. 89, p. 169-176, 2015.

YANG, Z.; YU, Z.; LEI, L.; XIA, Z.; SHAO, L.; ZHANG, K.; LI, G. Nematicidal effect of volatiles produced by *Trichoderma* sp. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 15, n. 4, p. 647-650, 2012.

YOKOYAMA, L.P.; RUCATTI, E.G.; KLUTHCOUSKI, J. Economia da produção: Conjuntura, mercados e custos. In: VIEIRA, N.R.A.; SANTOS, A.B.; SANT'ANA, E.P. (Ed.). **A cultura do arroz no Brasil**. Santo Antônio de Goiás: EMBRAPA, 1999, p. 37-58.

YOSHIDA, S.; HIRADATE, S.; TSUKAMOTO, T.; HATAKEDA, K.; SHIRATA, A. Antimicrobial activity of culture filtrate of *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2 isolated from mulberry leaves. **Phytopathology**, v. 91, p. 181-187, 2001.

YU, Q.; LIU, Z.; LIN, D.; ZHANG, W.; SUN, Q.; ZHU, J.; LIN, M. Characterization and evaluation of *Staphylococcus* sp. strain LZ16 for the biological control of rice blast caused by *Magnaporthe oryzae*. **Biological Control**, v. 65, n. 3, p. 338-347, 2013.

YU, G. Y.; SINCLAIR, J. B.; HARTMAN, G. L.; BERTAGNOLLI, B. L. Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 34, n. 7, p. 955-963, 2002.

ZHENG, M.; SHI, J.; SHI, J.; WANG, Q.; LI, Y. Antimicrobial effects of volatiles produced by two antagonistic *Bacillus* strains on the anthracnose pathogen in postharvest mangos. **Biological Control**, v. 65, n. 2, p. 200-206, 2013.