**CONTROLE DE FUNGOS TRANSPORTADOS POR SEMENTES
DE TRIGO COM *Bacillus subtilis***

EDUARDO LAZZARETTI

Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. JOSÉ OTÁVIO MACHADO MENTEN

**Dissertação apresentada à Escola Superior
de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Uni-
versidade de São Paulo, para obtenção do
título de Mestre em Agronomia, Área de
Concentração: Microbiologia Agrícola.**

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

Novembro-1993

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros da
Divisão de Biblioteca e Documentação - FCLQ/USP

L432c Lazzaretti, Eduardo
Controle de fungos transportados por sementes de
trigo com *Bacillus subtilis*. Piracicaba, 1993.
102p. ilus.

Diss.(Mestre) - ESALQ
Bibliografia.

1. Bactéria para controle biológico 2. Controle
biológico 3. Fungo fitopatogênico - Controle biológico
4. Semente - Patógeno - Transporte 5. Trigo - Semente
Patógeno I. Escola Superior de Agricultura Luiz de
Queiroz, Piracicaba

CDD 633.11

**CONTROLE DE FUNGOS TRANSPORTADOS POR SEMENTES
DE TRIGO COM *Bacillus subtilis***

EDUARDO LAZZARETTI

Aprovado em: 16-12-1993

Comissão Julgadora:

Dr. Wagner Bettiol

CNPMA/EMBRAPA

Prof. Dr. Tasso Leo Krüger

ESALQ/USP

Prof Dr. José Otávio Machado Menten

ESALQ/USP

Prof. Dr. José Otávio Machado Menten
Orientador

Aos meus pais João e Thereza

OFEREÇO

À minha esposa Lucinéia e ao
meu filho Guilherme

DEDICO

AGRADECIMENTOS

-Ao Prof. Dr. José Otávio Machado Menten pela orientação, apoio e confiança;

-Ao Dr. Wagner Bettiol pela co-orientação, estímulo, apoio, confiança e amizade;

-Ao Centro Nacional de Pesquisa de Monitoramento e Avaliação de Impacto Ambiental (CNPMA) da EMBRAPA pela oportunidade oferecida;

-À FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela bolsa de estudo;

-Aos pesquisadores do CNPMA em especial à Dr^a Raquel Ghini e ao Dr. Itamar S. Melo, pela amizade e colaboração;

-À minha irmã Leda pelo estímulo;

-Aos Funcionários do CNPMA: Antonio, Valmi, Abraão e Carlos pela ajuda;

-À Maria Cecilia Mottes e Emilia Marcomini pelo apoio;

-À colega Eri Sato pela cooperação e amizade;

-A todos que direta ou indiretamente auxiliaram na elaboração deste trabalho;

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	x
RESUMO.....	xiii
SUMMARY.....	xv
1- INTRODUÇÃO.....	1
2- REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1- Patologia de Sementes.....	4
2.2- Patologia de Sementes de Trigo.....	6
2.3- Controle Biológico.....	12
2.4- Tratamento de Sementes com Agentes de Controle Biológico.....	15
2.5- Efeito de <u>Bacillus subtilis</u> no Tratamento de Patógenos Associados às Sementes.....	22
3- MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1- Obtenção dos Fungos Fitopatogênicos.....	28
3.2- Obtenção dos Isolados de <u>B. subtilis</u>	29
3.3- Seleção <u>in vitro</u> de <u>B. subtilis</u> a Patógenos Transportados por Sementes de Trigo.....	30
3.3.1- Fungos de Armazenamento.....	30
3.3.2- Fungos de Campo.....	34
3.4- Tratamento de Sementes de Trigo com <u>B. subtilis</u>	35

	Página
3.4.1- Método de Imersão.....	35
3.4.1.1- Imersão por 1,5 minutos.....	35
3.4.1.2- Imersão por 5 horas.....	37
3.4.1.3- Imersão por 5 horas em suspensões con- tendo diferentes concentrações de <u>B. subtilis</u>	38
3.4.2- Método de Contato.....	40
3.4.2.1- Tratamento de sementes por diferentes períodos de contato.....	40
3.4.2.2- Tratamento por contato com os isolados AP-03 e AP-51 de <u>B. subtilis</u>	42
3.4.3- Comparação entre os Métodos de Imersão e Contato.....	43
3.4.3.1- Tratamento de sementes com o isolado AP-03 por de <u>B. subtilis</u> por contato e por imersão.....	43
3.4.3.2- Tratamento de sementes com o isolado AP-51 de <u>B. subtilis</u> por contato e por imersão.....	45
4- RESULTADOS.....	48
4.1- Seleção <u>in vitro</u> de <u>B. subtilis</u> a patógenos transportados por sementes de trigo.....	48

	Página
4.1.1- Fungos de armazenamento.....	48
4.1.2- Fungos de Campo.....	53
4.2- Tratamento de Sementes de trigo com <u>B. subtilis</u> .	
4.2.1- Método da Imersão.....	58
4.2.1.1- Imersão por 1,5 minutos.....	58
4.2.1.2- Imersão por 5 horas.....	60
4.2.1.3- Imersão por 5 horas em suspensões con tendo diferentes concentrações de <u>B. subtilis</u>	61
4.2.2- Método de Contato.....	65
4.2.2.1- Tratamento de sementes por diferentes períodos de contato.....	65
4.2.2.2- Tratamento por contato com os isolados AP-03 e AP-51.....	68
4.2.3- Comparação entre os Métodos de Imersão e Contato.....	69
4.2.3.1- Tratamento de sementes com isolado AP 03 por contato e imersão.....	69
4.2.3.2- Tratamento de sementes com o isolado AP-51 por Contato e Imersão.....	72
5- DISCUSSÃO.....	75
5.1- Seleção <u>in vitro</u> de <u>B. subtilis</u> a Patógenos Transportados por Sementes de Trigo.....	75

	Página
5.2- Tratamento de Sementes de trigo com <u>B. subtilis</u>	78
6- CONCLUSÕES.....	83
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1- Efeito dos isolados de <u>Bacillus subtilis</u> no número de colônias de <u>Aspergillus</u> sp. e <u>Penicillium</u> sp. desenvolvidas em meio BDA a 25 ⁰ C durante 5 dias.....	50
2- Efeito dos isolados de <u>Bacillus subtilis</u> no diâmetro das colônias de <u>Aspergillus</u> sp. e <u>Penicillium</u> sp. desenvolvidas em meio BDA a 25 ⁰ C durante 5 dias.....	51
3- Emergência (%) de plântulas de trigo 10 dias após semeadura em solo natural mantidas à temperatura ambiente e em areia esterilizada mantidas a 25±2 ⁰ C, após tratamento por imersão (im.) em suspensões contendo diferentes concentrações de células de <u>B. subtilis</u> ...	63
4- Redução (%) da incidência de <u>Bipolaris sorokiniana</u> , <u>Pyricularia oryzae</u> e <u>Alternaria tenuis</u> em sementes de trigo tratadas por imersão (im.) em suspensões contendo diferentes concentrações de células de <u>B. subtilis</u>	64
5- Porcentagem de emergência de plântulas de trigo tratadas com <u>Bacillus subtilis</u> por diferentes períodos de contato.....	67

Figura

Página

6- Porcentagem de emergência de sementes de trigo aos 5 e 15 dias da semeadura, submetidas ao tratamento com <u>Bacillus subtilis</u> , AP-03, pelos métodos de contato (cont.) e imersão (im.).....	71
7- Emergência (%) de plântulas aos 8 e 15 dias após distribuição de sementes tratadas com <u>Bacillus subtilis</u> por imersão (im.) e contato (cont.) em caixas contendo solo esterilizado.....	74

LISTA DE TABELAS

Página

1- Dias após inoculação necessários para o aparecimento das primeiras colônias de <u>Aspergillus</u> sp. e <u>Penicillium</u> sp. quando inoculados sobre meio autoclavado onde havia crescido <u>Bacillus subtilis</u> por 5 dias	49
2- Tempo (dias) necessários para o surgimento das primeiras colônias de <u>Aspergillus</u> sp. e <u>Penicillium</u> sp. em meios contendo diferentes concentrações de caldo onde <u>Bacillus subtilis</u> , AP-51 foi multiplicado.....	52
3- Número de colônias de <u>Aspergillus</u> sp. e <u>Penicillium</u> sp. em meios contendo diferentes concentrações de caldo onde <u>Bacillus subtilis</u> , AP-51, foi multiplicado...	52
4- Número de conídios de <u>Aspergillus</u> sp. e <u>Penicillium</u> sp. em meios contendo diferentes concentrações de caldo onde <u>Bacillus subtilis</u> , AP-51, foi multiplicado..	53
5- Avaliação do crescimento micelial de fungos na presença de metabólitos de <u>Bacillus subtilis</u> isolado AP-03.....	54
6- Avaliação do crescimento micelial de fungos na presença de metabólitos de <u>Bacillus subtilis</u> isolado AP-12.....	55

7- Avaliação do crescimento micelial de fungos na presença de metabólitos de <u>Bacillus subtilis</u> isolado AP-51.....	56
8- Avaliação do crescimento micelial de fungos na presença de metabólitos de <u>Bacillus subtilis</u> isolado AP-114.....	57
9- Porcentagem de inibição do crescimento micelial dos difentes fungos associados à sementes de trigo na presença de metabólitos de 4 isolados de <u>B. subtilis</u>	58
10-Incidência (%) de sementes de trigo com <u>Bipolaris sorokiniana</u> e <u>Pyricularia oryzae</u> submetidas a tratamento de imersão por 1,5 min. em caldo onde <u>Bacillus subtilis</u> foi multiplicado.....	59
11-Incidência (%) de fungos em sementes de trigo tratadas com <u>Bacillus subtilis</u> , isolados AP-03 e AP-51, através de imersão.....	60
12-Incidência (inc.) e transmissão (trans.) de <u>Pyricularia oryzae</u> , <u>Bipolaris sorokiniana</u> e <u>Alternaria tenuis</u> em sementes de trigo variedade Anahuac submetidas a tratamento com <u>Bacillus subtilis</u> por imersão por 5 h.	62

13- Porcentagem de sementes portadoras de <u>Pyricularia oryzae</u> , <u>Bipolaris sorokiniana</u> e <u>Alternaria tenuis</u> após contato com <u>Bacillus subtilis</u> , isolado AP-51....	66
14- Incidência (%) de <u>Bipolaris sorokiniana</u> e <u>Alternaria tenuis</u> em sementes de trigo após tratamento com <u>Bacillus subtilis</u> , isolados AP-03 e AP-51, pelo método de contato por 16 horas.....	68
15- Incidência (%) de <u>Bipolaris sorokiniana</u> , <u>Pyricularia oryzae</u> e <u>Alternaria tenuis</u> em sementes de trigo tratadas com <u>Bacillus subtilis</u> AP-03 por contato e imersão.....	70
16- Efeito de formas de tratamento de sementes de trigo com <u>Bacillus subtilis</u> na incidência e severidade de <u>Bipolaris sorokiniana</u>	72
17- Porcentagem de sementes mortas, plantas doentes, plantas saudas e transmissão semente/plântula, em testes de tubo de ensaio contendo ágar-água, para sementes portadoras de <u>Bipolaris sorokiniana</u>	73

CONTROLE DE FUNGOS TRANSPORTADOS POR SEMENTES DE TRIGO COM *Bacillus subtilis*

Autor: EDUARDO LAZZARETTI

Orientador: PROF. DR. JOSÉ OTÁVIO MACHADO MENTEN

RESUMO

O presente trabalho objetivou verificar o efeito de *Bacillus subtilis* no controle biológico de patógenos transportados por sementes e a influência desta bactéria sobre a emergência das sementes de trigo.

Em testes *in vitro* todos os patógenos testados: *Aspergillus* sp., *Alternaria tenuis*, *Bipolaris sorokiniana*, *Fusarium graminearum*, *Penicillium* sp., *Pyricularia oryzae* e *Septoria nodorum* foram sensíveis aos metabólitos produzidos por *B. subtilis*.

Para o tratamento das sementes utilizaram-se as técnicas de imersão em suspensões de células e contato de sementes com colônias de *B. subtilis* em meio de cultura. As duas técnicas mostraram-se efetivas no controle de *B. sorokiniana*, *P. oryzae* e *A. tenuis*, sendo que em alguns tratamentos os resultados foram semelhantes aos obtidos com iprodione + thiram.

Os melhores resultados foram obtidos com imersão das sementes em suspensões contendo, aproximadamente, 6×10^8 ufc/ml por 5 horas ou mantidas em contato com a bactéria por períodos superiores a 12 horas.

A presença de B. subtilis na semente e o período de molhamento com posterior secagem não afetou fisiologicamente a semente, mantendo a emergência igual ou superior ao tratamento padrão (iprodione + thiram).

Os resultados obtidos indicam que a utilização de B. subtilis, como agente de controle biológico aplicado à semente é promissora.

BIOLOGICAL CONTROL OF FUNGI TRANSPORTED BY WHEAT SEEDS WITH *Bacillus subtilis*

Author: EDUARDO LAZZARETTI

Adviser: PROF. DR. JOSÉ OTÁVIO MACHADO MENTEN

SUMMARY

The purpose of this research was to evaluate the effects of *Bacillus subtilis* on the biological control of seed born diseases and germination of wheat seeds.

The following pathogens were affected by *B. subtilis* under *in vitro* conditions: *Aspergillus* sp., *Alternaria tenuis*, *Bipolaris sorokiniana*, *Fusarium graminearum*, *Penicillium* sp., *Pyricularia oryzae* e *Septoria nodorum*. For seed treatment dipping of the seeds in bacterial cell suspension and contact of the seeds with the bacterium growth in culture media were utilized. Both techniques were effective for evaluation of control of *B. sorokiniana*, *P. oryzae* and *A. tenuis*. The results of some treatments were similar to the obtained with iprodione + thiram.

The best results were obtained with dipping the seeds in bacterial suspension using 6×10^8 cfu/ml for 5 hours and

contact with the bacteria for 12 hours or more.

Seed emergence was not affected by the presence of B. subtilis and posterior drying. It was also similar or superior to the chemical treatment (Iprodione + thiram).

The good results obtained indicate that seed treatment with B. subtilis is feasible.

1- INTRODUÇÃO

Entre os métodos de controle de fitopatógenos, o mais conhecido e divulgado é o controle com agentes químicos. O emprego contínuo destes produtos além dos altos custos, tem como inconvenientes: o surgimento de resistência dos patógenos aos fungicidas; o desequilíbrio ecológico e os problemas de resíduo nos alimentos e no ambiente.

Alternativas visando amenizar estes problemas, vêm sendo pesquisadas e com resultados promissores no controle de vários fitopatógenos em culturas economicamente importantes. Nesta linha de pesquisa, enfoque particular está sendo dado ao controle biológico (PAPAVIZAS & HUNDSEN, 1980; LUZ, 1988; SUDO, 1989; JUNQUEIRA & GASPAROTTO, 1991).

A utilização de Bacillus subtilis (Ehrenberg) Cohn no controle biológico foi relatada, entre outros, por STAVELY et alii (1981), BAKER et alii (1983/1985), BETTIOL et alii (1988), BETTIOL & KIMATI (1990), sempre mostrando resultados satisfatórios.

B. subtilis age, principalmente, através da antibiose (produção de antibióticos), mas também pode agir por

competição e indução de resistência (KATZ & DEMAINE, 1977; WEI et alii, 1991).

Uma das possíveis formas de utilização de B. subtilis é através do tratamento de sementes, sendo que GAIND & GAUR (1991); TURNER & BACKAMAN (1991); ROSSALL & McKNIGHT (1992) e LUZ (1993) obtiveram resultados satisfatórios tratando sementes de feijão, amendoim, algodão e trigo.

A utilização de B. subtilis no tratamento de sementes pode apresentar diversas vantagens: a- ser eficiente contra patógenos transportados por sementes; habitantes e invasores do solo; patógenos de armazenamento; e patógenos foliares das fases iniciais da cultura; b- pode ser aplicado na semente, ou simultaneamente à semeadura, influenciando positivamente o equilíbrio microbiológico do solo; c- o custo de aplicação é bastante reduzido, uma vez que o veículo do agente de controle biológico passa a ser a própria semente.

Neste trabalho foram utilizados, como modelo, sementes de trigo, por apresentarem inúmeros patógenos responsáveis por danos e perdas.

Assim, a presente pesquisa teve por objetivos:

a-selecionar os isolados de B. subtilis mais eficientes no controle de patógenos frequentemente transmitidos por sementes de trigo in vitro;

b-avaliar a eficiência de B. subtilis no controle de patógenos transmitidos por sementes de trigo, in vivo ;

c-comparar diversos métodos de tratamento de sementes de trigo com B. subtilis;

d-Avaliar o efeito de B. subtilis em sementes com baixa e alta incidência de patógenos.

2- REVISÃO DE LITERATURA

2.1-Patologia de Sementes

Na superfície ou internamente, as sementes podem carregar bactérias, fungos, vírus e outros organismos (RAHALKAR & NEERGARD, 1969), servindo como meio de transmissão ou transporte de patógenos e constituem-se, desta forma, em um dos principais meios de disseminação de patógenos de plantas.

MENTEN & BUENO (1987) definem como transmissão a disseminação do patógeno que proporciona uma infecção bem sucedida, dando origem a uma planta doente; e transporte como a disseminação do patógeno através da semente, podendo ou não ocasionar doenças.

MACHADO (1987), numa revisão sobre o histórico da patologia de sementes, relata que as primeiras referências à associação de patógenos com sementes data do ano de 1699. Entretanto o grande impulso da patologia de sementes só ocorreu 300 anos após, com trabalhos da Dra Lucie Doyer na Holanda, em 1919.

No Brasil, o marco fundamental da patologia de sementes é o ano de 1977, quando foi realizado o 1º "Workshop"

Latino-Americano de Patologia de Sementes (MENTEN,1991a).

Sementes são insumos básicos na moderna produção agrícola. Cerca de 90% dos alimentos são produzidos através de sementes. Todas as espécies cultivadas propagadas por sementes apresentam doenças como um fator responsável pela redução na produtividade (MENTEN,1991b).

Os patógenos associados às sementes podem interferir na produtividade, basicamente, através dos seguintes processos: a) redução da população de plantas através de morte de sementes e "damping off" de pré e pós emergência; b) debilitação das plantas por podridões radiculares, bloqueio no transporte de água e nutrientes e colonização sistêmica e c) desenvolvimento de epidemia durante o ciclo da cultura (MACHADO,1987 e MENTEN, 1991b).

A disseminação de patógenos por sementes é importante quando se observa as seguintes razões,segundo NEERGARD & SAAD (1973), SINCLAIR (1981) e MENTEN & BUENO (1987): 1- a semente, por ser um ótimo substrato nutritivo, assegura a presença de inóculo viável e virulento por mais tempo; 2- a presença do patógeno na semente favorece a infecção primária; 3- há uma distribuição homogênea do inóculo pela área semeada; 4- áreas isentas podem ser contaminadas; e 5- é bastante eficiente, independente da distância. Além dos riscos de se introduzir novos patógenos através das sementes em áreas isentas, existe a possibilidade da introdução de novas raças endêmicas na região

(NEERGARD, 1981).

A associação de patógenos às sementes podem ainda ser responsáveis pela redução da qualidade das mesmas através da diminuição do potencial de germinação, redução do vigor e ou diminuição da produção (SINCLAIR, 1981).

2.2-Patologia de Sementes de Trigo

A área cultivada com trigo no Brasil abrange cerca de 3.441.498 ha (IBGE, 1989). Embora a área seja grande, a produtividade brasileira é considerada baixa, quando comparada à média mundial.

MOTA (1982) acredita que a baixa produtividade brasileira deve-se ao fato do trigo ser cultivado em uma região ecológica que comparada às demais regiões tritícolas mundiais, pode ser considerada marginal. O clima úmido do sul do país (maior região produtora), associado a períodos de temperaturas relativamente elevadas, é muito propício às doenças, as quais constituem o principal fator limitante da produção. Essa condição, de alta umidade, favorece o ataque da cultura por vários patógenos, os quais, individualmente ou em combinação, afetam a qualidade sanitária das sementes de trigo (NASSER, 1987 e REIS et alii, 1988).

Entre os patógenos transmissíveis por sementes de trigo foram relatadas no Brasil: Bipolaris sorokiniana Pamm. King & Bakke, Septoria nodorum Berk, Fusarium graminearum Schwabe, Pyricularia oryzae Cav., Ustilago tritici (Pers) Rostr., Drechslera tritici-repentis (Died) Schoemaker, Tilletia spp., Pseudomonas syringae pv. syringae Van Hall e Xanthomonas campestris pv. undulosa (Pammel) Dowson (MEHTA, 1978; NASSER, 1987; REIS et alii, 1988 e FORCELINI, 1991a). Alternaria tenuis Ness, embora não causando doença relevante na cultura, tem sido frequentemente detectada em sementes (NASSER, 1987; REIS, 1987 e PATRICIO et alii, 1991).

Além destes, estão associados às sementes de trigo os fungos de armazenamento, Aspergillus spp. e Penicillium spp. (NASSER, 1987).

Dentre estes patógenos B. sorokiniana, S. nodorum, F. graminearum e P. oryzae são os mais importantes.

A helmintosporiose, causada pelo fungo Helminthosporium sativum (Sacc. in Sorok), sendo sinônimos B. sorokiniana Pamm. King & Bakke e Drechslera sorokiniana (Sacc) Subran & Jain, e sendo na sua forma perfeita denominada Gochliobolus sativus (Ito & Kurib) Drechsli ex Dastur, apresenta duas formas distintas: uma, denominada helmintosporiose, quando o fungo interfere no processo fotossintético atacando os órgãos verdes como folhas, bainhas, colmos, glumas, aristas e sementes em formação; e outra, conhecida como podridão comum de raízes,

quando o fungo interfere na procura e absorção de nutrientes e água, que constitui a fase da doença que ocorre em órgãos subterrâneos como raízes seminais, mesocótilos, raízes secundárias e coroa (FORCELINI, 1991ab). Levantamentos realizados para estimar os danos causados pela doença mostram que as perdas podem atingir até 30% da produção, além de infectar sementes que, dependendo das condições climáticas em que foram produzidas, podem apresentar de 10 a 100% de infecção pelo fungo (NASSER, 1987). Outro agravante é que as sementes associadas com B. sorokiniana apresentam uma elevada taxa de transmissão, que varia de 80 a 90%, sendo, desta forma, o inóculo presente nas sementes responsável pelo estabelecimento de inúmeros focos iniciais da doença a campo (FORCELINI, 1991a).

Os sintomas iniciais da doença consistem em pequenas manchas ovais (3-4mm), de coloração castanho-escura a negras, nas folhas. Tais manchas não mostram nenhuma esporulação e podem ser confundidas com manchas causadas por S. nodorum e Pyrenopeziza trichostoma. Essas manchas aumentam de tamanho e tornam-se tipicamente elípticas, com abundante esporulação. Por causa da formação de numerosos conídios castanho-escuros, as lesões aparecem quase pretas. Os esporos são facilmente removidos pela chuva ou soprados pelo vento, deixando as lesões sem esporos e cor de palha. Quando as lesões coalescem, a folha toda fica crestada e seca prematuramente. As massas negras de esporos podem ser facilmente removidas com o dedo, o que difere de Septoria. A

doença ataca principalmente folhas e glumas, mas pode atacar outras partes. O fungo penetra através das glumas e infecta as sementes as quais produzem plântulas infectadas (MEHTA,1978).

O fungo S. nodorum, forma perfeita denominada Leptosphaeria nodorum Möller, infecta as sementes de trigo, especialmente em anos em que ocorrem chuvas freqüentes no final do ciclo da cultura do trigo. A infecção, nestes casos, pode atingir 58% das sementes e, como as sementes infectadas apresentam uma alta taxa de transmissão, em torno de 80%, o risco de epidemias é bastante elevado (FORCELINI,1991a). Estudos mostraram que o ataque do fungo, logo após o espigamento, pode causar perdas de até 65%. O fungo infecta folhas, colmos, espigas e sementes. Nas folhas, os sintomas manifestam-se inicialmente como manchas irregulares de cor marrom clara a escura. Temperaturas entre 15 e 20^o C e alta umidade relativa favorecem a doença, podendo os nós atacados tornarem-se enrugados e quebradiços, e as glumas de coloração marrom escura (NASSER,1987).

Giberella zeae (Schu), cuja forma imperfeita é denominada F. graminearum, ocorre de forma generalizada em todo o mundo, principalmente em áreas temperadas e úmidas (MEHTA,1978; SARTORI,1982). Segundo relata NASSER (1987), as perdas ocasionadas por esta doença, em condições favoráveis, pode atingir 70%. Os principais sintomas desta doença são visíveis por ocasião do espigamento. Primeiro notam-se manchas aquosas sobre

as glumas. Com o passar do tempo e, especialmente com o ambiente úmido, as glumas, grãos e ráquis infectados ficam recobertos pelo micélio fúngico, cujos esporos, em massa, têm uma coloração rosada. Quando os esporos são lavados pela chuva ou carregados pelo vento, a espiga fica esbranquiçada. Os grãos ficam chochos e há grande redução na produtividade. Sementes afetadas, quando germinam, produzem plantas com apodrecimento das raízes ou morte das plântulas. Peritécios negros, em grandes quantidades, podem ser observados sobre as glumas, colmos ou bainhas das folhas, quando em condições favoráveis (CARDOSO & KIMATI,1980).

A brusone do trigo, causada por P. oryzae, foi descrita pela primeira vez no Brasil, em 1985, atacando campos de produção no Estado do Paraná (IGARASHI et alii, 1986). Um ano após a constatação, no estado do Paraná, o fungo foi detectado em regiões tritícolas do Mato Grosso do Sul e de São Paulo (IGARASHI,1988). Em 1988, PICININI & FERNANDES (1990) relataram a presença do fungo no estado do Rio Grande do Sul, mostrando a rapidez com que se dissemina, sendo o principal veículo a semente. Segundo GOULART & PAIVA (1990), a taxa de transmissão deste fungo, da semente para a parte aérea, principalmente para o coleóptilo, é, em média, 3:1, variando conforme o nível de infecção e/ou contaminação inicial. Os autores observaram ainda que, para uma taxa de transmissão da ordem de 2,1:1, que foi obtida com níveis de infecção entre 19 e 21%, pode acarretar o estabelecimento de 400.000 focos de infecção primária/ha,

considerando-se uma densidade de semeadura de 400 sementes/m². A incidência de espigas atacadas pela doença em culturas não tratadas com fungicida pode atingir 93%, em condições do estado de Mato Grosso do Sul, o que representa perdas da ordem de 40% (GOULART et alii, 1991). Os sintomas evidenciam-se na fase de espigamento, com lesões de coloração castanha ou negra na ráquis, e posterior esbranquiçamento da espiga acima do ponto de infecção. Dependendo da cultivar e, principalmente, das condições ambientes (alta temperatura e alta umidade), o patógeno pode provocar chochamento parcial ou total dos grãos. Na gluma, as lesões são elípticas com centro variando de branco a castanho claro e com margem castanho avermenhada a cinza escura. Ocasionalmente, nas folhas, estas possuem formas mais alongadas. O centro das lesões tornam-se castanho claro ou branco, marginado por castanho avermelhada com posterior frutificação. Na bainha e no pescoço, as lesões são elípticas, mantendo as mesmas características anteriores (MEHTA et alii, 1988).

Devido à importância das doenças causadas pelos patógenos descritos e sendo as sementes de trigo um dos principais meios de disseminação e transmissão, há necessidade de utilização de sementes livres desse patógenos para semeadura ou realização de tratamento das sementes.

O tratamento de sementes envolve a aplicação de diversas substâncias. Segundo TAYLOR & HARMAN (1990), devido a pequena quantidade de produtos adicionados às sementes e estes

estarem em contato direto com o sítio alvo, é um método pouco prejudicial ao ambiente quando comparado aos sistemas convencionais de tratamento de doença via aérea.

O tratamento de sementes é um dos métodos mais econômicos de controle de doenças. Este método visa eliminar os patógenos, proteger tanto a semente como as plântulas dos patógenos do solo, incrementar a produção e prevenir perdas na qualidade do produto, propiciando um bom "stand" inicial da lavoura e evitando a disseminação de microrganismos patogênicos (WALLACE & BATEMAN, 1978; HEWETT & GRIFFITHS, 1978 e SOAVE & MORAES, 1987).

O tratamento de sementes, visando o controle de patógenos a elas associados, pode ser dividido em: físico, químico, bioquímico e biológico. Entretanto devido ao assunto da dissertação, só será apresentada revisão sobre controle biológico.

2.3-Controlle Biológico

O controle químico vem dando lugar a novas alternativas, tais como o controle integrado, em que o biocontrole vem assumindo posição destacada, visando principalmente minimizar o impacto dos produtos químicos no

ecossistema e garantir a produção de alimentos menos poluídos (ROBBS, 1991).

Segundo COOK & BAKER (1983,p.60), controle biológico pode ser definido como a redução da soma de inóculo ou atividades determinantes da doença provocada por um ou mais organismos, que não o homem. As atividades determinantes de doenças envolvem crescimento, infectibilidade, virulência, agressividade e outras qualidades do patógenos, ou processos que determinam infecção, desenvolvimento de sintomas e reprodução. Em controle biológico, doença é mais do que uma interação do patógeno com o hospedeiro, é o resultado de uma interação entre o hospedeiro, o patógeno e uma variedade de não patógenos que também repousam no sítio de infecção e que apresentam potencial para limitar ou aumentar a atividade do patógeno ou a resistência do hospedeiro (COOK & BAKER,1983 e COOK,1985).

O microrganismo antagonista pode agir sobre o patógeno através de vários mecanismos, entre eles: amensalismo, competição, parasitismo e predação (BOOLSALIS,1964 ; BAKER & COOK,1974; CARDOSO, 1978/1992; DEACON,1983; BAKER,1985 e JACOBSEN & BACKMAN, 1993).

Amensalismo ou antibiose é a interação entre organismos, na qual metabólitos produzidos por um deles tem efeito danoso sobre o outro; como exemplo, pode ser citado a produção de antibióticos. Competição refere-se à luta entre duas populações de nichos semelhantes para obter um recurso

indispensável - nutriente, água, luz ou espaço - que no habitat se encontra em quantidade insuficiente para suprir a demanda biológica. Os competidores não causam prejuízos diretos um ao outro no sentido de uma célula se alimentar de outra ou pela produção de toxinas ou enzimas inibitórias; as influências adversas aparecem indiretamente pela luta por necessidades mútuas. Parasitismo ou simbiose antagônica pode ser definido como um organismo que se alimenta de células, tecidos ou fluídos de outro ser vivo, o hospedeiro, o qual comumente é prejudicado no processo. Predação é quando um organismo, o predador, se alimenta de um outro, a presa, e normalmente causa sua morte.

Um antagonista não age, necessariamente, através de uma única interação, mas pode agir através de vários mecanismos, que é uma característica importante do antagonista.

Controle biológico pode apresentar algumas vantagens como: a) é um método seguro em comparação ao controle químico, normalmente tóxicos ao ambiente e ao homem; b) o microrganismo, uma vez introduzido e adaptado ao ambiente, pode manter as taxas do patógeno inferiores às taxas prejudiciais; c) diminui problemas com resistência do patógeno a produtos químicos; d) o agente de controle biológico tem menos efeito sobre os microrganismos não alvos, diminuindo, desta forma, problemas no desequilíbrio ecológico da região e e) o agente de controle biológico pode ser associado a outras formas estratégicas de controle como o físico, químico e/ou cultural

(DEACON,1983).

A viabilização do controle biológico vai depender de fatores como a utilização de microrganismos com boas características antagônicas, métodos de multiplicação que produzam propágulos de qualidade e em quantidade suficientes e oferecer ao microrganismo agente de controle biológico, condições favoráveis ao seu desenvolvimento e competição (HARMAN,1991).

2.4-Tratamento de Sementes com Agentes de Controle Biológico

A utilização de antagonistas aplicados às sementes (microbiolização) tem sido estudado por vários autores. A utilização desta técnica tem se mostrado promissora, provavelmente porque os antagonistas são colocados num ambiente favorável ao seu desenvolvimento, a espermosfera e a rizosfera (BRUEHL,1987; WELLER,1988; PARKE,1990 e LUZ,1991).

Vários microrganismos podem ser empregados no tratamento de sementes, como fungos, bactérias, actinomicetos e vírus. Entretanto, segundo BRUEHL(1987), as bactérias e os fungos são encontrados em maior número na espermosfera, o que indica uma maior adaptabilidade destes microrganismos nesta região.

Os microrganismos aplicados às sementes, quando

apropriados, podem se desenvolver concomitantemente ao desenvolvimento da semente, colonizando as raízes durante o seu desenvolvimento, fornecendo desta forma uma proteção mais duradoura (AHMAD & BAKER, 1987).

HUBBARD et alii (1983) e HARMAN (1991) relatam que os resultados não muito satisfatórios da utilização de controle biológico se deve ao pequeno desenvolvimento dos microrganismos antagonísticos quando na presença da microflora nativa e condições ambientes pouco favoráveis. Entretanto, a aplicação de antagonistas junto às sementes podem favorecer o seu desenvolvimento, através do fornecimento de nutrientes, tornando-os mais agressivos e competitivos durante seu crescimento.

BAKER (1985) cita, ainda, que a produção de antibióticos por microrganismos no solo é limitado pela presença de substrato, principalmente carbono, e que a aplicação de microrganismos produtores de antibióticos às sementes não apresenta esta limitação, uma vez que, durante e após a germinação, exsudatos radiculares (açúcares e aminoácidos) e restos das sementes podem servir de substrato energético. ELAD & CHET (1987) afirmam ainda que a aplicação de bactérias às sementes é um método bastante atrativo, uma vez que, neste caso, a bactéria antagonista tem a oportunidade de colonizar primeiramente as raízes. Os autores observaram que as bactérias introduzidas pelo tratamento de sementes se movimentam ao longo

das raízes durante o crescimento desta.

A utilização de microrganismos, principalmente bactérias e fungos aplicados às sementes, vêm sendo estudado por diversos pesquisadores. SOYTONG & QUIMIO (1989), tratando sementes de arroz por imersão em suspensão de esporos de 3 espécies de Chaetomium, obtiveram controle dos danos causados por P. oryzae, além de observarem uma melhor emergência, altura e crescimento de raízes das plantas, resultados também obtidos com o tratamento de sementes com captan. HARMAN et alii (1989), tratando sementes de algodão, pepino, ervilha, feijão, milho e trigo com Trichoderma harzianum e semeando-as em solo infestado com Pythium ultimum, F. graminearum (trigo), Sclerotium rolfsii (pepino e feijão) e Rhizoctonia solani (pepino), obtiveram um controle das doenças tão efetivo quanto o tratamento com carboxim + thiram em trigo e thiram nas outras culturas.

Isolando bactérias da rizosfera de beterraba, LEE & OGOSHI (1986), encontraram espécies do gênero Pseudomonas fluorescente e não fluorescente e Bacillus spp. que produziam metabólitos antagônicos a Aphanomyces coenophialae, R. solani e Pythium spp., in vitro. O tratamento das sementes com os isolados promoveu uma melhor germinação, aumento no peso de raiz e da parte aérea das plântulas e reduziu o tombamento causado por Pythium spp. Os autores observaram também que as Pseudomonas fluorescentes foram mais efetivas nos parâmetros avaliados.

A utilização de bactérias fluorescentes e não

fluorescentes, no tratamento de sementes de arroz, visando o controle de Scierotium oryzae, mostrou bons resultados quando as sementes foram imersas por 12 horas em suspensões contendo 10^9 ufc/ml e mantidas a 25°C . Os resultados melhores (aumento de 70% no rendimento) foram obtidos quando, além do tratamento de sementes, as plantas recebiam pulverizações aéreas com os antagonistas. Sem as pulverizações, o acréscimo no rendimento foi de 39%, quando comparado à testemunha (GNANAMANICKAN et alii, 1988).

Menor número de lesões/planta de arroz, causadas por P. oryzae, além de redução dos danos causados por R. solani, Fusarium moniliforme e P. ultimum, foi observado por LEE et alii (1990), quando trataram sementes de arroz com bactérias do gênero Pseudomonas (P. fluorescens, P. putida e P. aureofaciens).

Bactérias do gênero Pseudomonas (P. putida e P. cepacia) e Alcaligenes sp. controlaram a incidência de tombamento, causado por Pythium aphanidermatum, entre 57% a 67%, quando sementes de pepino foram imersas em suspensões contendo 8×10^9 ufc/ml. A aplicação dos antagonistas ao solo (10^7 a 10^8 ufc/cm³) mostrou o mesmo efeito do tratamento das sementes (ELAD & GHET, 1987). Ainda visando o controle de Pythium (P. ultimum var. sporangiferum, P. ultimum var. ultimum e P. irregulare), CASAS et alii (1990) trataram sementes de grão-de-bico com 6 fungicidas (fosetyl Al, thiabendazol, captan, benaloxyl, metalaxyl e metalaxyl + thiabendazol) e cinco agentes de controle

biológico: Penicillium oxalicum (4mg conídio/g semente), Pythium oligandrum ($7,2 \times 10^4$ oosporo/g de semente), Rhizobium sp. (10^9 ufc/g de turfa), P. fluorescens biovar I e P. fluorescens biovar II (10^8 ufc/g de sementes). Os autores observaram que as melhores emergências (89 a 97% em relação à testemunha) foram obtidos com o tratamento químico, contra 42 a 52% em relação à testemunha, observados para os tratamentos com os agentes de controle biológico. A nível de campo, embora a porcentagem de emergência tenha sido inferior ao tratamento químico, P. fluorescens biovar I foi estatisticamente semelhante ao tratamento químico, quando comparou-se a produtividade em solo naturalmente infestado com o patógeno.

Sementes de soja e de ervilha, imersas por 2 horas em suspensão contendo 10^9 céls/ml de P. putida e semeadas em solo com e sem infestação com P. ultimum, foram utilizadas por PAULITZ (1991). O autor observou que para soja, que é menos sensível ao patógeno, a porcentagem de emergência das plântulas em solo com o patógeno foi igual ao observado em solo sem o fungo, o que não ocorreu com ervilha, que é mais susceptível ao fungo patogênico. Para ervilha, a emergência em solo sem o patógeno foi de 93%, enquanto que em solo infestado a emergência foi de 30%. PARKE (1990), também trabalhando com ervilhas visando ao controle de danos causados por Pythium (P. ultimum e P. sylvaticum) através do tratamento de sementes por imersão das mesmas em suspensões obtidas através da raspagem do crescimento

bacteriano sobre o meio de cultura em placas de Petri, com Pseudomonas cepacia sob várias temperaturas (16, 20, 24 e 28°C), observou que a bactéria controlava em 44% a incidência da doença, o que foi tão efetivo quanto o tratamento com metalaxyl (6,25mg/100sementes), em todas as temperaturas testadas.

Rhizobactérias promotoras de crescimento (P. putida, P. aureofaciens, P. fluorescens e Serratia plymuthica) reduziram o diâmetro de lesões causadas por Colletotrichum orbiculare, quando sementes de pepino foram tratadas através de imersão. Os autores atribuíram o controle da doença à indução de resistência da planta pelas rizobactérias promotoras de crescimento, uma vez que não foi observado antagonismo ou competição diretamente sobre o patógeno (WEI et alii, 1991).

Tratamento de sementes de trigo com agentes de controle biológico também têm mostrado resultados bastante promissores no controle de diversos patógenos. A redução da incidência de Tombamento, causado por P. ultimum em trigo, foi conseguida por ADETUYI (1989), quando tratou as sementes com suspensões de bactérias Gram negativas, móveis, oxidase positivas e produtoras de antibiótico, isoladas de sementes de arroz. O tratamento das sementes propiciou um aumento na emergência e no peso de matéria seca das plântulas. As mesmas bactérias, não identificadas pelo autor, mostraram-se antagônica à P. oryzae, L. nodorum, Penicillium italicum e Stemphylium botryosum, em testes in vitro sob BDA.

Microorganismos produtores de antibióticos (15 bactérias e 54 actinomicetos) foram seleccionados por KEMPF & WOLF (1989) da rizosfera e do rizopiano de gramíneas. Dos microorganismos seleccionados, 22% reduziram em mais de 40% a incidência de Fusarium culmorum quando foram utilizados em tratamento de sementes de trigo através da imersão por 15 minutos em suspensões de células quantificadas por absorbância (bactérias $A_{660}=0,15$ e actinomicetos $A_{660}=0,3$). Com o isolado seleccionado mais promissor, que posteriormente foi identificado como sendo Erwinia herbicola, os autores procederam outros testes e observaram que o antagonista inibia a incidência de Puccinia recondita f. sp. tritici em 76% quando suspensões da bactéria ($A_{660}=1,0$) foram pulverizadas sobre as folhas 2 horas antes da inoculação com o patógeno. Os autores concluíram que os mecanismos envolvidos na supressão das doenças foram diferentes. Com a utilização de mutantes do antagonista, que não produziam o antibiótico, foi possível concluir que o mecanismo envolvido na supressão de P. recondita tritici foi devido à produção de antibiótico (herbicolina) pelo antagonista, uma vez que a pulverização com o mutante foi ineficaz e a utilização de filtrado do meio de cultura, onde crescia a bactéria, promoveu o mesmo controle observado para células vivas. O mesmo não foi observado na inibição de F. culmorum, onde o filtrado não mostrou efeito enquanto que o isolado selvagem inibiu em 54% e o mutante em 38%.

A microbiolização de sementes de trigo com bactérias de gênero Pseudomonas, visando o controle de Gaeumannomyces graminis var. tritici, foi testada, com sucesso, por BULL et al (1991), que demonstraram que a inibição do fungo pela bactéria foi devido à produção de uma substância antagônica, do grupo das fenazinas, e que a quantidade de bactérias aplicada às sementes estava diretamente relacionada com a intensidade da doença até um limite de, aproximadamente, 10^9 cél/semente, a partir do qual, algumas vezes, pode apresentar fitotoxicidade.

A inibição de patógenos por bactérias do gênero Pseudomonas não é só atribuída à produção de antibióticos. WELLER & COOK (1986) e BECKER & COOK (1988), em estudos visando o controle de Pythium spp. através da microbiolização de sementes de trigo com P. fluorescens, através da imersão das mesmas em suspensões celulares, observaram um controle do patógeno semelhante a utilização de metalaxyl. Os autores atribuíram a inibição a produção de sideróforos pela bactéria.

2.5-Efeito de Bacillus subtilis no Controle de Patógenos Associados a Sementes

O gênero Bacillus é formado por bactérias em forma de bastonete, móvel, com formação de endosporo altamente

resistente ao calor. Segundo BUCHANAN & GIBBONS (1975); NORRIS et alii (1981) e SCORTHICHINI et alii (1989), B. subtilis caracteriza-se por apresentar catalase (+), reação de Voges-Proskauer (+), crescimento em ágar anaeróbico(-), redução de NO_3 a NO_2 (+), hidrólise de amido (+), produção de ácido a partir de glicose, arabinose e manose (+), crescimento em NaCl a 7% (+), crescimento a 45°C (+) e a 60°C (-), hidrólise de caseína (+), posição central do esporo, germinação equatorial e formação de cadeias.

Dos 167 antibióticos produzidos pelo gênero Bacillus, 66 são elaborados por isolados de B. subtilis. Estes antibióticos, principalmente polipeptídeos, podem apresentar ação contra bactérias Gram positivas e negativas e fungos (KATZ & DEMAINE, 1977).

Mesmo sendo antagônico a diversos patógenos associados às sementes de soja, a presença de B. subtilis em sementes pode afetar negativamente a cultura da soja em áreas com alta temperatura e umidade, demonstrando que a utilização do antagonista deve ser empregada com cautela em determinadas culturas (SCORTHICHINI et alii, 1989). A aplicação de B. subtilis em sementes de soja, através de imersão em suspensões de células e posterior aplicação de turfa, reduziu a incidência de Phomopsis sp. em condições de casa de vegetação. A nível de campo, a redução do patógeno foi atribuída à diminuição do "stand", que propiciou condições adversas ao patógeno (CUBETA et alii, 1985).

A diminuição da emergência, propiciada pelo tratamento com B. subtilis, pode estar associada à idade e concentração da bactéria e ao método de aplicação nas sementes. A utilização de turfa, como veículo de Pseudomonas spp. e B. subtilis em tratamento de trigo visando o controle de Gaeumannomyces, mostrou-se prejudicial, aumentando os danos causados pela doença, imobilizando Mn, além de reduzir o vigor e o rendimento de grãos (HUBER et alii, 1989; ZASPEL, 1992).

A imersão de sementes de café, previamente desinfestadas com hipoclorito de sódio por 5 minutos, em meio de cultura (BD) onde foi multiplicado B. subtilis por 7 dias a $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$ promoveu uma redução de danos causados por R. solani maior ou semelhante, estatisticamente, ao tratamento químico com carboxin a 0,05% e aumentou a porcentagem de germinação, a nível de campo e de casa de vegetação, em solo infestado artificialmente com o patógeno, quando comparado à testemunha (VENKATASUBBAIAH, 1985).

Redução de danos causados por R. solani, além de melhora na germinação e emergência de plântulas de amendoim, foi conseguido por TURNER & BACKAMAN (1991) quando trataram sementes com B. subtilis, utilizando o produto comercial denominado Quantum-4000 (660mg/kg semente), pó que contém $1,13 \times 10^8$ esporos/mg. Os autores observaram ainda que o tratamento com a bactéria melhorava a nodulação das raízes por Rhizobium spp. Este efeito foi observado em outras leguminosas por LI & ALEXANDER

(1988); GAIND & GAUR (1991) e ROSSALL & McKNIGHT (1992).

JINDAL & THIND (1990), em trabalhos visando quantificar a população microbiana e seleccionar microrganismos antagônicos à Xanthomonas campestris pv. vignicola em sementes de grão-de-bico, seleccionaram B. subtilis que, quando aplicados às sementes, diminuíram a severidade da doença causada pelo patógeno em aproximadamente 50%.

Efeitos surpreendentes foram obtidos por LUZ (1993) quando tratou sementes de trigo através da imersão por 3 minutos em suspensões contendo 10^8 ufc/ml de B. subtilis e 24 horas após semeou em solo naturalmente infectado com G. graminis var. tritici, obtendo uma redução de 98% do mal-do-pé e um aumento no rendimento de grãos da ordem de 105%, quando comparados à testemunha, obtendo, desta forma, efeito comparável ou melhor que o propiciado pelo tratamento com iprodione + thiram.

A ação de B. subtilis não parece ser influenciada pelo tipo de solo ao qual é aplicado e nem ter sua ação restrita a cultura da qual foi isolado. Neste aspecto, MERRIMAN et alii (1974) trataram sementes de trigo, aveia, cevada e cenoura com B. subtilis isolado de planta ornamental e semearam em localidades diferentes e com tipos de solos distintos e obtiveram para as quatro culturas rendimentos na produção maiores que os tratamentos testemunhas. ALVES et alii (1990), em trabalhos in vitro, visando a inibição de crescimento micelial de P. oryzae

de trigo e arroz, observaram que os isolados de Bacillus sp. de arroz foram bastante eficientes tanto para os fungos isolados de arroz como os isolados de trigo. BETTIOL (1988), verificou que isolados de B. subtilis originários de sementes e folhas de arroz, de sementes de feijão, de folhas de Eucalyptus ou de contaminação no laboratório foram antagonistas à P. oryzae. Mesmo o produto comercial, denominado Quantum-4000, o qual é utilizado desde 1983 no tratamento de sementes de amendoim contra vários patógenos, é produzido com um isolado de B. subtilis denominado A-13, obtidos de micélio de S. rolfsii (WELLER, 1988).

Estudos conduzidos por REEDY & RAHE (1989), com sementes de cebola sob diferentes condições de pH, temperatura e umidade do solo, visando acompanhar o desenvolvimento da bactéria nas raízes da planta, observaram que ocorria uma rápida queda na população de 10^6 ufc/semente para 10^3 ufc/planta nos primeiros 14 dias e chegava as 10 ufc/planta 14 semanas após a semeadura, independentemente das características dos solos. Segundo os autores, o efeito benéfico observado nas plantas microbiolizadas quanto ao desenvolvimento (peso de matéria seca de raiz e parte aérea e altura de plantas) não é proporcional à população microbiana na rizosfera.

Outra característica que mostra o amplo espectro de ação de B. subtilis e a sua adaptabilidade às condições adversas, é a aplicação da bactéria em pulverizações aéreas, visando o controle de ferrugem do feijoeiro (BAKER et alii, 1985;

BETTIOL et alii, 1992). Nestes casos a aplicação não deve-se restringir a uma única aplicação durante o ciclo da cultura, mas várias aplicações, como demonstrou BAKER et alii (1985), que aplicando suspensões contendo células vivas e mortas, 3 vezes por semana, conseguiu redução de 50% com as células vivas e igualou-se ao fungicida (mancozeb) com células mortas, quando avaliou-se a porcentagem de área coberta pelo patógeno.

O efeito benéfico de B. subtilis, quando aplicado junto às sementes ou ao solo, não é exclusivamente devido ao antagonismo proporcionado aos patógenos. A bactéria influi positivamente na germinação, desenvolvimento e rendimento da cultura devido, também, à produção de substâncias promotoras de crescimento e melhoria na nutrição das plantas, através da solubilização de fósforo, como foi demonstrado por GAINO & GAUR (1991).

A rapidez com que se desenvolve em meio de cultura e na natureza, a produção de endosporo altamente resistente às condições adversas, o crescimento em ampla faixa de temperatura, a adaptação a várias condições ambientes, a produção de inúmeros antibióticos e a termoestabilidade dos metabólitos produzidos, fazem de B. subtilis um agente de controle biológico altamente promissor.

3-MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Obtenção dos Fungos Fitopatogênicos

Isolados de Septoria nodorum e Fusarium graminearum, obtidos de sementes de trigo, foram fornecidos pelo Dr. Eriel Melo Reis, do Centro Nacional de Pesquisa do Trigo (CNPTrigo) da EMBRAPA de Passo Fundo-RS.

Aspergillus sp., Bipolaris sorokiniana, Penicillium sp., Pyricularia oryzae e Alternaria tenuis foram isolados de sementes de trigo. Para o isolamento, as sementes foram colocadas sobre 3 folhas de papel de filtro, previamente umedecidas em água destilada esterilizada. Logo após, foram incubadas a $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, por 7 dias, sob regime de fotoperíodo de 12 horas de luz, 12 horas de escuro. Sob microscópio estereoscópico, os fungos desenvolvidos sobre as sementes foram transferidos para BDA (200g de batata, 18g de dextrose, 18g de ágar e 1000ml de água destilada) e incubados para crescimento. Quando necessário, foram feitas repicagens para obtenção de culturas puras dos fungos.

Uma vez obtidos os isolados dos fungos, estes foram

preservados pelo método de Castellani, descrito por FIGUEIREDO (1967), e em tubos de ensaio com meio BDA inclinado.

3.2- Obtenção dos isolados de B. subtilis.

Treze isolados de B. subtilis, denominados AP-3, AP-12, AP-42, AP-48, AP-49, AP-51, AP-85, AP-91, AP-94, AP-105, AP-114, AP-115 e AP-137, foram fornecidos pelo Dr. Wagner Bettiol, do Centro Nacional de Pesquisa de Monitoramento e Avaliação de Impacto Ambiental (GNPMA) da EMBRAPA, Jaguariúna-SP. Estes isolados, que estavam preservados em solo esterilizado, foram recuperados e transferidos para tubos de ensaio e placas de Petri com BDA. A manutenção desses isolados foi pelo método de Castellani e também em tubos (replicagem periódicas), para posterior utilização.

3.3- Seleção in vitro de B. subtilis a Patógenos Transportados por Sementes de Trigo

3.3.1- Fungos de Armazenamento

A seleção de isolados de B. subtilis mais promissores no controle de fungos associados à sementes de trigo iniciou-se por testes com fungos de armazenamento dos gêneros Penicillium e Aspergillus.

A utilização da técnica de cultura pareada (patógeno x antagonista), descrita por TOLEDO & CARDOSO (1975), CHAKRABORTY & BHOWMIK (1985), BETTIOL (1988), ALVES et alii (1990) e MICHEREFF et alii (1993), para esses fungos não se mostrou viável, devido a abundância de conídios produzidos. A técnica mostrou-se inviável no momento em que os conídios dos fungos tomavam toda a superfície da placa de Petri, devido à simples manipulação das mesmas, impossibilitando medir o diâmetro da colônia do patógeno, do antagonista e o halo de inibição formado, devido ao agrupamento das várias colônias formadas. Na tentativa de solucionar este problema, foram utilizados metabólitos produzidos por B. subtilis (BAKER et alii, 1985 e BETTIOL, 1988), técnica que se mostrou bastante satisfatória.

Foram realizados 3 ensaios, testando-se 4 isolados no primeiro e segundo e 5 isolados no terceiro. No primeiro

ensaio, em frascos Erlenmeyers de 250 ml contendo 100 ml de batata-dextrose (BD) foi adicionado 1 disco de 0,7 cm de diâmetro de BDA onde crescia B. subtilis. A incubação foi sob agitação constante (150rpm), a $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 7 dias (BAKER et alii, 1985), quando foi adicionado 2 g de ágar, autoclavado a 121°C por 20 min e vertido em placas de Petri.

Nas placas, com o meio solidificado, foi adicionado, com auxílio de uma micropipeta, 100 microlitros de uma suspensão contendo $3,2 \times 10^4$ conídios/ml de Aspergillus e $9,9 \times 10^3$ conídios/ml de Penicillium e espalhados sobre o meio com auxílio de uma alça de Drigalsky previamente flambada.

Foram feitas 5 repetições por tratamento e as avaliações foram diárias, anotando-se o dia após replicagem que surgiam as primeiras colônias.

Nos ensaios seguintes utilizou-se o mesmo procedimento, mudando-se somente a concentração de inóculo e a metodologia de avaliação. As suspensões utilizadas continham $4,55 \times 10^6$ conídios/ml e $3,7 \times 10^4$ conídios/ml de Penicillium e $3,2 \times 10^4$ conídios/ml e $1,5 \times 10^4$ conídios/ml de Aspergillus no segundo e terceiro ensaios, respectivamente, e a avaliação foi através da determinação da concentração de inóculo que foi feita adicionando-se, a tubos de ensaio contendo água esterilizada, 3 discos de 0,4mm de diâmetro de meio de cultura com crescimento do fungo. Os tubos foram levados ao ultra-som marca Micro-Som modelo c/rel., por 1 minuto e, posteriormente, a agitador mecânico

modelo Vortex K-550-G para obter-se maior homogeneização das amostras. Alíquotas foram retiradas dos tubos e colocadas em hemocitômetro (Câmara de Neubauer) para proceder a contagem sob microscópio ótico comum.

Para avaliação, foram considerados o tempo necessário para crescimento e a aparência morfológica das colônias de Penicillium e Aspergillus.

Os isolados selecionados (AP-03, AP-12, AP-51 e AP-114) foram, novamente, testados contra os fungos de armazenamento, tentando-se quantificar a inibição proporcionada pelos metabólitos da bactéria.

Com auxílio de uma micropipeta foi transferido para as placas de Petri contendo meio solidificado, conforme descrito anteriormente, 0,2 ml de uma suspensão contendo 22,8 conídios/ml de Penicillium sp. e 90 conídios/ml de Aspergillus sp. A suspensão foi espalhada sobre o meio com auxílio de uma alça de Drigalsky e a incubação foi a $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$, por 9 dias.

Passado o período de incubação, as colônias formadas foram avaliadas quanto ao número e ao diâmetro. Como testemunha, utilizou-se placas contendo BDA. Foram feitas 5 repetições por tratamento. Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente e as médias comparadas pelo teste de Tukey.

Para verificar a quantidade mínima de caldo necessário para ocorrer inibição dos fungos, foi feito um ensaio com diferentes diluições do isolado AP- 51, o qual, junto com

AP-03, se mostou mais promissor. Tomando-se porções do caldo (BD + B. subtilis) com 7 dias de incubação, foram feitas diluições (100, 75, 50, 25, 10, 5 e 0 %) aonde 100% foi caldo puro onde B. subtilis foi multiplicado e zero(0) foi batata-dextrose (BD). Aos 200ml feitos para cada diluição, adicionou-se 4 g de ágar, posteriormente autoclavados (121⁰C por 20 min) e vertidos em placas de Petri. Nas placas, com meio solidificado, foi adicionado, com auxílio de uma micropipeta, 200 microlitros de uma suspensão contendo $7,12 \times 10^3$ e $2,75 \times 10^3$ conídios/ml de Penicillium sp. e Aspergillus sp., respectivamente. O inóculo foi espalhado sobre o meio com auxílio de uma alça de Drigalsky previamente flambada. A incubação foi a 23 ± 2^0 C. Foram feitas 5 repetições para cada fungo nas 7 concentrações. As avaliações foram diárias, anotando-se o tempo (em dias), após inoculação, necessário para o aparecimento das primeiras colônias. Após 8 dias da repicagem as colônias foram contadas e procedeu-se a contagem do número de conídios em hemocitômetro .

Para proceder a contagem de conídios foram adicionados 10 ml de água destilada esterilizada por placa, sendo as colônias raspadas e homogeneizados e, em seguida, retirada uma alíquota de 1 ml, a qual foi transferida para tubos de ensaio contendo 9 ml de água esterilizada. Os tubos foram agitados mecanicamente por 30 segundos e, em seguida, procedeu-se a contagem em hemocitômetro.

3.3.2- Fungos de Campo

Objetivando-se selecionar 1 ou 2 isolados mais promissores, os 4 isolados de B. subtilis AP- 03, AP- 12, AP- 51 e AP- 114, os quais mostraram-se melhores nos ensaios com Aspergillus sp. e Penicillium sp., foram testados contra os fungos associados às sementes. Os fungos testados foram: B. sorokiniana, F. graminearum, S. nodorum, P. oryzae e A. tenuis.

Após crescimento de B. subtilis em BD e posterior autoclavagem, conforme descrito no item 3.3.1, foram colocados no centro das placas, com o meio solidificado, discos de 0,7 cm de diâmetro dos patógenos em pleno desenvolvimento. Placas contendo BDA foram utilizadas como testemunhas. Após a replicagem a incubação foi a $23 \pm 2^{\circ}$ C.

O crescimento micelial dos fungos foi medido diariamente e as avaliações foram feitas por períodos nunca inferiores a 30 dias.

Quando o crescimento micelial dos fungos, nas placas testemunhas, tomava toda a superfície, a porcentagem de inibição foi determinada utilizando-se a fórmula:

$$I \% = \frac{\text{diâm. test.} - \text{diâm. trat.}}{\text{diâm. test.}} \times 100 \quad \text{onde:}$$

1% = porcentagem de inibição

diâm. trat. = diâmetro do fungo na placa do tratamento

diâm. test. = diâmetro do fungo na placa testemunha

Os valores utilizados na fórmula foram subtraídos de 0,7 (diâmetro do disco inicial). Os dois melhores isolados determinados pela porcentagem de inibição média mais alta (AP-03 e AP-51) foram utilizados nos trabalhos subseqüentes.

3.4- Tratamento de Sementes de Trigo com B. subtilis.

3.4.1- Método de Imersão

3.4.1.1- Imersão por 1,5 minutos

Visando testar a eficiência dos isolados AP-03 e AP- 51 no tratamento de sementes de trigo, amostras de sementes, variedade Anahuac, sabidamente portadoras de P. oryzae e B. sorokiniana, fornecidas pelo Laboratório de Patologia de Sementes da ESALQ/USP, foram utilizadas.

Os isolados AP-03 e AP- 51 foram multiplicados em

BD, sob agitação constante, a $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 7 e 15 dias. Após esse período, 300 sementes de trigo foram imersas, por 1,5 minutos, nos caldos, com e sem autoclavagem por 20 min a 121°C . Como testemunha, as sementes foram imersas, por 1,5 minutos, em água e o tratamento padrão utilizado foi iprodione + thiram (50+150g/100kg de sementes) (COMPÊNDIO, 1987; REIS, 1987; FORGELINI & REIS, 1988; GOULART et alii, 1990 e LOPES & BUENO, 1990). Após imersão, as sementes foram deixadas sobre papel de filtro por 4 horas, em condições ambientes, para secagem. Transcorrido esse período, procedeu-se o teste de sanidade de sementes em papel de filtro + congelamento, segundo metodologia descrita por LUGCA FILHO (1987). Em placas de Petri plásticas, contendo 3 folhas de papel de filtro previamente umedecidas em água destilada, foram distribuídas 25 sementes/ placa. A incubação foi a $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$, por 1 dia, sob regime luminoso de 12 horas de luz por 12 horas de escuro. No segundo dia de incubação, as placas foram transferidas para um "freezer" com temperatura de -18°C , onde permaneceram por 24 horas, retornando, em seguida, às condições iniciais de incubação por mais 5 dias.

As avaliações foram realizadas com auxílio de um microscópio estereoscópico, examinando-se todas as sementes para detectar presença de B. sorokiniana e P. oryzae. Nos casos de dúvidas na identificação do patógeno foram feitas lâminas e estas observadas ao microscópio óptico comum para confirmação do resultado.

Foram comparados 10 tratamentos, cada um representado por 3 repetições de 100 sementes por parcela experimental. O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado. Para análise estatística os dados foram transformados em $\text{arc. sen.}\sqrt{(x + 0,50)/100}$ e as médias comparadas pelo teste de Tukey.

3.4.1.2- Imersão por 5 horas

Em 6 frascos de 1000ml de capacidade contendo 500ml de meio de cultura GPL (glucose 10g; peptona 10g; extrato de levedura 5g; NaCl 3g; KH_2PO_4 1g; MgSO_4 0,5g; água 1000ml; pH 6,0) foram adicionados 5 discos de 0,7 cm de diâmetro de meio BDA onde crescia B. subtilis AP-03 por 24 horas. Os frascos permaneceram sob agitação constante a 200 rpm por 7 dias a $27 \pm 2^\circ\text{C}$. Após o período de multiplicação, o meio (3 litros) foi centrifugado em centrífuga de fluxo contínuo, modelo Sharples, a 24.000 rpm e vazão de 60 ml/min. As células obtidas desta forma foram acondicionadas em frasco de vidro e utilizadas em seguida. A suspensão de células foi conseguida adicionando-se 3 g da massa de células em 15 ml de água esterilizada. Após agitação em agitador mecânico por 5 min. foram adicionadas a este volume 200 sementes de trigo que permaneceram imersas por cinco horas.

Para o tratamento de sementes de trigo com o isolado AP-51 de B. subtilis foi utilizado o mesmo procedimento descrito para o isolado AP-03.

Como testemunha, sementes foram imersas em água esterilizada pelos mesmos períodos; e como padrão, foi realizado o tratamento com iprodione + thiram (50+150g/100kg sem.).

Após o tratamento, todas as sementes, da variedade Anahuc, ficaram secando por 48 horas sobre papel de filtro. Após a secagem, procedeu-se o teste de sanidade em papel de filtro com congelamento, conforme descrito no item 3.4.1.1.

Foram comparados 4 tratamentos, cada um representado por 4 repetições de 50 sementes por parcela experimental. Para análise estatística os dados foram transformados em $\text{arc. sen. } \sqrt{(x + 0,50)/100}$, e as médias comparadas pelo teste Duncan.

3.4.1.3- Imersão por 5 horas em Suspensões Contendo Diferentes Concentrações de B. subtilis.

Com as células do isolado AP-03, obtidas conforme descrito no item 3.4.1.2, procederam-se diluições a 5, 10 e 20%. Para tanto, em tubos de ensaio contendo 19, 18 e 16 ml de água

esterilizada foram adicionados 1, 2 e 4g de células da bactéria, respectivamente, e agitados vigorosamente para ressuspensão das células, obtendo-se, desta forma, as diluições desejadas.

As sementes (16g/tratamento), da variedade Anahuc, foram imersas nas diluições que apresentavam, respectivamente, $1,65 \times 10^7$, $1,86 \times 10^8$ e $6,15 \times 10^8$ ufc/ml, por 5 horas e, em seguida, secas ao ar, à temperatura ambiente, sobre papel de filtro por 48 horas. Como tratamento padrão foi utilizado iprodione + thiram (50+150g/100kg sementes). Como tratamento testemunha, a mesma quantidade de sementes foi imersa em água esterilizada pelo mesmo período e, como testemunha absoluta, foram utilizadas sementes sem tratamento.

As sementes tratadas permaneceram sobre papel de filtro à temperatura ambiente e após, 48 horas, uma parte das sementes (200 sementes/tratamento), foram semeadas em caixas plásticas contendo areia lavada esterilizada e mantidas à $23 \pm 2^\circ\text{C}$; outras foram semeadas em vasos contendo solo natural e mantidas à temperatura ambiente; e em uma terceira parte procedeu-se o teste de sanidade de sementes, em papel de filtro com congelamento.

Aos 10 dias após semeadura, foram avaliadas a porcentagem de emergência das plântulas em areia e no solo.

Após 15 dias, as plântulas crescidas em areia, sob temperatura controlada, foram cuidadosamente arrancadas, lavadas em água corrente e examinadas para verificar sintomas e sinais de doenças. Fragmentos da área lesionada (raiz, coroa, coleóptilo e

ou folhas) foram acondicionados em câmara úmida para esporulação e posterior identificação do fungo patogênico.

Com os resultados obtidos nas avaliações da incidência de fungos nas sementes e a porcentagem de plântulas com doença, foi possível determinar a taxa transmissão (TT) utilizando a fórmula (segundo NEEGARD, 1981; GOULART & PAIVA, 1990 e FORCELINI, 1991b):

$$TT (\%) = \frac{\text{plântulas com sintomas}}{\text{incidência nas sementes}} \times 100$$

Foram comparados 6 tratamentos, cada um representado por 6 repetições de 50 sementes por parcela experimental. Os resultados foram analisados estatisticamente e as médias comparadas pelo teste de Duncan.

3.4.2- Método de contato

3.4.2.1- Tratamento de Sementes por Diferentes Períodos de Contato

O contato de sementes com colônias em meio de cultura para inoculação artificial de patógenos (TANAKA et alii 1989, ROLIM et alii 1990 e VALARINI & MENTEN 1991) sugeriu que a

mesma metodologia poderia ser utilizada para tratamento de sementes com antagonistas, no caso específico células de B. subtilis.

Em placas de Petri contendo batata-dextrose-ágar (BDA) foi adicionado 0,5 ml de uma suspensão contendo aproximadamente 10^5 céls./ml de B. subtilis, isolado AP-51. O inóculo foi espalhado sobre o meio com auxílio de uma alça de Drigalsky previamente flambada. As placas foram mantidas entre 22 a 24°C, por 24 horas, quando 50 sementes sabidamente contaminadas com P. oryzae, B. sorokiniana e A. tenuis foram distribuídas sobre o meio e agitadas manualmente por 3 minutos. As sementes permaneceram em contato com a bactéria por 1, 3, 6, 12 e 24 horas, em temperatura ambiente. O tratamento químico com iprodione + thiram (50+150g/100kg semente) foi utilizado como padrão. Como testemunha foram utilizadas sementes distribuídas sobre meio BDA sem a bactéria por 0, 1, 3, 6, 12 e 24 horas.

As sementes tratadas permaneceram sobre papel de filtro, à temperatura ambiente. Após 48 horas, metade das sementes foram semeadas em caixas plásticas contendo solo desinfestado em coletor solar (GHINI & BETTIOL 1991), para averiguar o efeito de B. subtilis na emergência das plântulas e, com a outra metade, procedeu-se o teste de sanidade de sementes, em papel de filtro + congelamento.

Foram comparados 12 tratamentos, cada um representado por 3 repetições de 100 sementes por parcela

experimental. O procedimento estatístico foi o mesmo utilizado no item 3.4.1.1.

3.4.2.2- Tratamento por Contato com os Isolados AP-03 e AP-51 de B. subtilis.

Com o objetivo de averiguar qual dos isolados se sobressaíam no tratamento de sementes com alta incidência de B. sorokiniana foi executado o presente ensaio. Neste ensaio, foram utilizadas sementes de trigo 'IAPAR-6' (Tapejara), com alta incidência de B. sorokiniana e A. tenuis.

A metodologia utilizada foi a mesma descrita no item 3.4.2.1, ficando as sementes em contato por 16 horas em temperatura ambiente. Como testemunha, amostras contendo 50 sementes foram distribuídas sobre o meio de cultura sem a bactéria, agitadas e incubadas por igual período. O tratamento químico com iprodione + thiram (50+150g/100kg sementes) foi utilizado como padrão.

Após os tratamentos todas as sementes ficaram secando sobre papel de filtro a temperatura ambiente por 36 horas, quando foi realizado o teste de sanidade em papel de filtro com congelamento. Foram comparados 4 tratamentos, cada um representado por 4 repetições de 50 sementes por parcela

experimental. O procedimento estatístico utilizado foi o mesmo descrito no item 3.3.1.

3.4.3- Comparação entre os Métodos de Imersão e Contato

3.4.3.1- Tratamento de Sementes com o Isolado AP-03 de B. subtilis por Contato e por Imersão.

Sementes da variedade Anahuac foram tratadas por contato conforme descrito no item 3.4.2.1. Como testemunha foram utilizadas sementes distribuídas sobre meio BDA sem a bactéria pelo mesmo período de tempo. A suspensão de células foi conseguida adicionando-se 1g da massa de células, obtida conforme descrito no item 3.4.1.2, em 15 ml de água esterilizada. Após intensa agitação em agitador mecânico, o conteúdo foi vertido sobre 200 sementes permanecendo as mesmas submersas por 4 horas. O mesmo volume de água esterilizada foi colocado sobre outras 200 sementes para servir como testemunha. Como padrão iprodione + thiram (50+150g/100kg sementes) foi utilizado.

Após os tratamentos, todas as sementes ficaram secando ao ar por 48 horas sobre papel de filtro, quando procedeu-se, com 200 sementes de cada tratamento, o teste de

papel de filtro + congelamento.

A metade restante das sementes foi semeada em caixas plásticas contendo solo natural e acondicionada em sala com temperatura entre 25 a 26⁰C, onde permaneceram por 15 dias. Foram feitas 2 avaliações de emergência uma aos 5 dias e outra aos 15 dias após semeadura.

Amostras de sementes submetidas aos tratamentos por imersão e contato em B. subtilis foram avaliadas quanto ao número de ufc/semente. Para tanto, em tubos contendo 10 ml de água esterilizada foram adicionadas 2 sementes de trigo partidas no sentido longitudinal para facilitar a saída das bactérias. Os tubos foram submetidos a ultra-som por 3 min. e agitados, posteriormente, em agitador mecânico por 2 min. Foram realizadas diluições sucessivas até 10⁻⁵. Destas diluições foram plaqueados 0,1 ml em placas contendo BDA e uniformizados com auxílio de uma alça de Drygalsky. As placas foram acondicionadas em sala de incubação a 23±2⁰C, por 48 horas, quando procedeu-se a contagem do número de colônias.

Foram comparados 5 tratamentos cada um representado por 4 repetições. O procedimento estatístico foi o mesmo descrito no item 3.3.1.

3.4.3.2- Tratamento de Sementes com o Isolado AP-51 de B. subtilis por Contato e por Imersão.

Foram testados, neste ensaio, sementes de trigo 'IAPAR-6' (Tapejara), que apresentavam alta incidência de B. sorokiniana, para observar o efeito de B. subtilis nestas condições.

Neste experimento, foram avaliados a incidência e severidade de B. sorokiniana nas sementes; a porcentagem de sementes mortas, plântulas doentes e plântulas sadias e emergência, além da transmissão do patógeno da semente à parte aérea.

As sementes permaneceram em contato com a bactéria, conforme descrito no item 3.4.2.1, por 24 horas em temperatura ambiente. Como testemunha, amostras contendo 50 sementes foram distribuídas sobre o meio de cultura sem a bactéria, agitadas e incubadas por igual período. O tratamento químico com Iprodione + thiram (50+150g/100kg sementes) foi utilizado como padrão.

Para tratamento por imersão, nas placas de Petri contendo BDA onde crescia B. subtilis por 24 horas foram adicionados 10 ml de água destilada esterilizada e a superfície raspada até que as células se desprendessem do meio de cultura. O conteúdo da primeira placa foi transferido para uma segunda placa e procedia-se da mesma maneira, em seguida o

conteúdo foi adicionado numa terceira placa e após a retirada das colônias o volume foi transferido para um Becker. Foram utilizadas 9 placas, fornecendo um volume suficiente para cobrir todas as sementes utilizadas durante o período do tratamento (5 horas). A suspensão de células foi da ordem de 10^9 céls./ml. Como testemunha as sementes foram submersas em água destilada por igual período e sob as mesmas condições de temperatura.

Após os tratamentos, as sementes ficaram secando à temperatura ambiente por 5 horas sobre papel de filtro.

A sanidade das sementes quantificadas através da incidência e severidade dos patógenos foi avaliada pelo método do papel de filtro com congelamento, sendo utilizadas 200 sementes por tratamento (4 repetições de 50 sementes).

Sete dias após, as sementes foram avaliadas individualmente com auxílio de um microscópio estereoscópico, determinando-se o número de sementes portadoras de B. sorokiniana e a severidade do patógeno, segundo a seguinte escala de notas: 0 - ausência de patógeno; 1 - 1 a 10%; 2 - 11 a 25%; 3 - 26 a 50%; 4 - 51 a 75% e 5 - 76 a 100% da semente coberta pelo fungo.

A emergência foi avaliada distribuindo-se as sementes de trigo, que permaneceram por 48 horas após os tratamentos sobre papel de filtro, em caixas plásticas contendo solo esterilizado. As caixas permaneceram em casa de vegetação por 15 dias. Foram utilizadas 100 sementes por tratamento e as avaliações do número de plântulas emergidas foram feitas aos 8 e

15 dias.

Para determinação da transmissão foi utilizado o método do tubo de ensaio com meio de cultura. Em tubos de vidro de 18cm de comprimento, contendo 5 ml de ágar-água previamente esterilizados, foi adicionada uma semente por tubo, em condições assépticas. Os tubos foram envoltos por um filme plástico para evitar perda de umidade e colocados a $21 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, sob regime luminoso de 12 horas de luz/12 horas de escuro, por 15 dias. Após o período de incubação foram avaliados o número de sementes mortas, o número de plântulas com sintomas e o número de plântulas saudas. A taxa de transmissão foi obtida através de fórmula descrita no item 3.4.1.3.

O procedimento estatístico utilizado para análise dos resultados foi descrito no item 3.3.1.

4.RESULTADOS

4.1- Seleção in vitro de Bacillus subtilis a Patógenos Transportados por Sementes de Trigo.

4.1.1- Fungos de Armazenamento

Dos 13 isolados testados, os denominados AP-03, AP-12, AP-51 e AP-114 mostraram-se mais eficiente em retardar o crescimento das primeiras colônias dos fungos (Tabela 1). Quando avallado o efeito desse quatro isolados sobre o número e o diâmentro das colônias de Aspergillus e Penicillium, respectivamente, observa-se que embora o número de colônias não defira da testemunha (Figura 1), o diâmentro das mesmas foram menores que o da testemunha (Figura 2), sendo os isolados AP-03 e AP-51 os mais promissores.

Em relação ao efeito do caldo onde B. subtilis foi multiplicado na inibição de Aspergillus e Penicillium verificou-se que os melhores resultados foram conseguidos com as maiores concentrações de metabólitos, tanto para o tempo em dias até o surgimento das primeiras colônias quanto para o número de

confídios dos fungos, principalmente para Penicillium (Tabelas 2, 3 e 4).

Tabela 1- Dias após inoculação necessários para o aparecimento das primeiras colônias de Penicillium sp. e Aspergillus sp. quando inoculados sobre meio autoclavado onde havia crescido Bacillus subtilis por 5 dias.

Isolado de <u>B. subtilis</u>	<u>Penicillium</u> sp.	<u>Aspergillus</u> sp.
Testemunha	2*	2
AP- 03	5	4
AP- 12	5	3
AP- 42	4	3
AP- 48	4	3
AP- 49	3	2
AP- 51	5	4
AP- 85	3	3
AP- 91	4	3
AP- 94	3	3
AP- 105	3	3
AP- 114	5	4
AP- 115	3	2
AP- 137	4	3

* média de 5 repetições

medias nao diferiram entre si (Tukey 5%)

Figura 1- Efeito dos isolados de *Bacillus subtilis* no número de colônias de *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. desenvolvidas em meio BDA a 25° C durante 5 dias.

médias seguidas pelas mesmas letras não diferiram entre si (Tukey 5%)

Figura 2 - Efeito dos isolados de Bacillus subtilis no diâmetro das colônias de Aspergillus sp. e Penicillium sp. desenvolvidas em meio BDA a 25⁰ C durante 5 dias.

Tabela 2 - Tempo (dias) necessário para o surgimento das primeiras colônias de Aspergillus sp. e Penicillium sp. em meios contendo diferentes concentrações de caldo onde Bacillus subtilis AP-51 foi multiplicado.

concentração do caldo	<u>Aspergillus</u> sp.	<u>Penicillium</u> sp.
100%	4 *	5 *
75%	3	4
50%	2	2
25%	2	2
10%	2	2
5%	2	2
0%	2	2

* média de 5 repetições

Tabela 3 - Número de colônias de Aspergillus sp. e Penicillium sp em meios contendo diferentes concentrações de caldo onde Bacillus subtilis AP-51 foi multiplicado.

concentração do caldo	<u>Aspergillus</u> sp.	<u>Penicillium</u> sp.
100%	216,25* a**	915,50 * a
75%	210,00 a	996,50 a
50%	242,50 a	940,50 a
25%	242,50 a	1070,50 a
10%	237,00 a	937,25 a
5%	248,50 a	1117,50 a
0%	224,25 a	1045,75 a

* média de 5 repetições. Dados obtidos 8 dias após replicagem

**médias seguidas da mesma letra não diferiram entre si (Tukey 5%)

Tabela 4- Número de conídios de Aspergillus sp. e Penicillium sp produzidos em meios contendo diferentes concentrações de caldo onde Bacillus subtilis, AP-51, foi multiplicado.

concentração do caldo	<u>Aspergillus</u> sp.		<u>Penicillium</u> sp.	
100%	11,57*	a **	1,84 *	a
75%	40,50	ab	3,50	a
50%	39,67	ab	4,72	a b
25%	48,87	ab	7,58	b c
10%	38,02	ab	10,13	c d
5%	85,00	b	12,05	d
0%	52,62	ab	15,31	d

* média de 5 repetições x 10^6 . Dados obtidos 8 dias após replicagem

** médias dentro da coluna seguidas da mesma letra não diferiram entre si (Tukey 5%).

4.1.2- Fungos de Campo

Os metabólitos de B. subtilis permaneceram ativos, inibindo o crescimento micelial por, no mínimo, 30 dias, sendo que para B. sorokiniana e P. oryzae a inibição do crescimento micelial foi total para os quatro isolados (Tabela 5 a 9). Verifica-se que os isolados AP-03 e AP-51 de maneira geral foram mais efetivos que AP-12 e AP-114 (Tabela 9).

TABELA 5 - Avaliação do crescimento micelial de fungos na presença de metabólitos de *Bacillus subtilis* isolado Ap - 03

	diâmetro da colônia [±] (cm) após dias de incubação																			
Tratamentos	1	2	3	4	5	7	8	11	12	13	14	15	16	17	18	21	23	25	42	
<u>Bipolaris sorokiniana</u>																				
presença metabólito	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
ausência metabólito	0,1	1,1	2,1	2,7	5,7	7,4	8,0	8,3												
<u>Alternaria tenuis</u>																				
presença metabólito	0,0	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,4	0,8	1,0	1,2	1,3	1,4	1,6	1,6	1,7	1,8	2,0	2,2	2,4	
ausência metabólito	0,1	0,9	1,7	2,8	3,7	2,8	3,7	5,1	5,9	7,7	7,9	8,3								
<u>Sectoria nodorum</u>																				
presença metabólito	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2	0,3	0,3	0,4	0,4	0,5	0,5	0,6	0,7	0,7	0,7	
ausência metabólito	0,0	0,3	0,6	1,0	1,6	2,5	2,9	4,7	5,6	6,2	6,8	7,4	7,9	8,2	8,3					
<u>Fusarium graminearum</u>																				
presença metabólito	0,0	0,4	0,6	0,6	0,7	0,7	0,7	0,9	1,2	1,4	1,6	1,6	1,7	1,9	2,1	2,7	3,0	3,1	4,8	
ausência metabólito	0,4	1,5	3,3	5,1	6,9	8,0	8,2	8,3												
<u>Puricularia pruzae</u>																				
presença metabólito	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
ausência metabólito	0,0	0,5	1,1	1,7	2,7	3,9	4,5	6,9	7,5	7,8	7,9	7,9	8,3							

* média de 5 repetições

TABELA 6 - Avaliação do crescimento micelial de fungos na presença de metabólitos de Bacillus subtilis isolado Ap - 12

tratamentos	diâmetro da colônia* (cm) após dias de incubação										
	1	2	3	4	7	8	9	11	14	15	30
<u>Ripolaris sorokiniana</u>											
presença metabólito	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,3	0,3	0,3
ausência metabólito	0,4	2,7	4,1	5,4	8,3						
<u>Alternaria tenuis</u>											
presença metabólito	0,0	0,3	0,4	0,6	0,8	0,8	1,3	1,3	1,3	1,5	2,4
ausência metabólito	0,4	1,8	3,1	3,9	6,8	7,4	7,8	8,3			
<u>Septoria nodorum</u>											
presença metabólito	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,2	0,3	0,3	0,4	0,4	0,4
ausência metabólito	0,1	0,3	1,2	1,7	3,5	4,1	4,9	6,2	8,3		
<u>Fusarium graminearum</u>											
presença metabólito	0,4	0,9	1,0	1,4	3,5	4,0	4,7	5,7	5,7	7,8	8,2
ausência metabólito	0,9	3,1	5,7	7,4	8,3						
<u>Pyricularia oryzae</u>											
presença metabólito	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
ausência metabólito	0,0	1,1	1,8	2,5	5,4	6,4	7,2	8,3			

* média de 5 repetições

TABELA-7 Avaliação do crescimento micelial de fungos na presença de metabólitos de *Bacillus subtilis*
isolado Ap - 51

Tratamentos	diâmetro da colônia* (cm) após dias de incubação															
	1	2	3	4	7	8	9	10	11	14	15	16	17	22	25	30
<i>Bipolaris sorokiniana</i>																
presença metabólito	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
ausência metabólito	0,5	1,6	3,0	4,4	7,2	7,5	7,5	7,6	8,0	8,2	8,3					
<i>Alternaria tenuis</i>																
presença metabólito	0,0	0,0	0,0	0,3	0,7	0,9	0,9	0,9	1,0	1,0	1,0	1,0	1,1	1,1	1,1	1,1
ausência metabólito	0,3	1,0	2,0	3,0	5,2	6,1	6,7	7,4	7,7	8,1	8,3					
<i>Septoria nodorum</i>																
presença metabólito	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,2	0,3	0,4
ausência metabólito	0,0	0,0	0,6	1,0	2,1	2,6	3,1	3,3	3,8	5,2	5,7	5,8	6,4	7,5	8,3	
<i>Fusarium graminearum</i>																
presença metabólito	0,0	0,0	0,0	0,3	0,5	0,8	1,0	1,2	1,2	1,3	1,6	1,6	1,7	3,8	2,1	2,8
ausência metabólito	0,6	1,4	3,0	5,1	8,3											
<i>Puricularia oryzae</i>																
presença metabólito	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
ausência metabólito	0,1	0,8	1,6	2,4	4,4	5,4	6,1	6,9	7,3	8,1	8,2	8,3				

* média de 5 repetições

TABELA 8 - Avaliação do crescimento micelial de fungos na presença de metabólitos de Bacillus subtilis isolado Ap - 114

tratamentos	diâmetro da colônia ^x (cm) após dias de incubação										
	1	2	3	4	7	8	9	11	14	15	30
<u>Bipolaris sorokiniana</u>											
presença metabólito	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
ausência metabólito	0,4	2,7	4,1	5,4	8,3						
<u>Alternaria tenuis</u>											
presença metabólito	0,0	0,1	0,3	0,4	0,6	0,7	1,0	1,2	1,5	1,8	3,0
ausência metabólito	0,4	1,8	3,1	3,9	6,8	7,4	7,8	8,3			
<u>Septoria nodorum</u>											
presença metabólito	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,5	0,7	1,3	1,3
ausência metabólito	0,1	0,3	1,2	1,7	3,5	4,1	4,9	6,2	8,3		
<u>Fusarium graminearum</u>											
presença metabólito	0,3	0,6	0,7	0,8	1,1	1,4	1,9	2,0	3,0	3,0	6,2
ausência metabólito	0,9	3,1	5,7	7,4	8,3						
<u>Pyricularia oryzae</u>											
presença metabólito	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
ausência metabólito	0,0	1,1	1,8	2,5	5,4	6,4	7,2	8,3			

* média de 5 repetições

Tabela 9- Porcentagem de inibição do crescimento micelial dos diferentes fungos associados a sementes de trigo na presença de 4 isolados de Bacillus subtilis.

Fungos	isolados de <u>Bacillus subtilis</u>			
	AP-03	AP-12	AP-51	AP-114
<u>Bipolaris sorokiniana</u>	100,00*	100,00	100,00	100,00
<u>Alternaria tenuis</u>	83,13	84,34	87,95	85,54
<u>Septoria nodorum</u>	93,97	95,18	93,38	91,57
<u>Fusarium graminearum</u>	89,15	57,83	93,97	85,54
<u>Pyricularia oryzae</u>	100,00	100,00	100,00	100,00
média de inibição	93,25	87,47	95,06	92,53

* média de 5 repetições

4.2- Tratamento de Sementes de Trigo com B. subtilis

4.2.1- Método de Imersão

4.2.1.1- Imersão por 1,5 minutos

A imersão de sementes de trigo por 1,5 minutos no caldo autoclavado e sem autoclavagem, onde B. subtilis foi multiplicado por 7 e 15 dias, não foi suficiente para reduzir a incidência de P. oryzae nas sementes em nenhum tratamento. Entretanto, para B. sorokiniana, os isolados AP-03 e AP-51 com 7

dias de crescimento sem e com autoclavagem, e AP-51, com 15 dias de crescimento sem autoclavagem, mostraram uma redução significativa da incidência do fungo nas sementes embora inferior a eficiência propiciada pelo tratamento químico (Tabela 10).

Tabela 10 - Incidência (%) de sementes de trigo com Bipolaris sorokiniana e Pyricularia oryzae submetidas a tratamentos de imersão por 1,5 min. em caldo onde Bacillus subtilis foi multiplicado.

Tratamento	<u>P. oryzae</u>	<u>B. sorokiniana</u>
1. Imersão em água	19,00 ^{a**}	11,33 ^{a**}
2. Iprodione + thiram (50+150g/100kg semente)	1,00 b	0,00 c
3. Caldo onde <u>B. subtilis</u> (AP-03) foi multiplicado por 7 dias	22,23 a	4,00 b
4. Caldo onde <u>B. subtilis</u> (AP-03) foi multiplicado por 7 dias e autoclavado	20,00 a	5,00 b
5. Caldo onde <u>B. subtilis</u> (AP-03) foi multiplicado por 15 dias	23,00 a	4,66 b
6. Caldo onde <u>B. subtilis</u> (AP-03) foi multiplicado por 15 dias e autoclavado	20,30 a	6,00 ab
7. Caldo onde <u>B. subtilis</u> (AP-51) foi multiplicado por 7 dias	16,33 a	4,33 b
8. Caldo onde <u>B. subtilis</u> (AP-51) foi multiplicado por 7 dias e autoclavado	15,33 a	4,33 b
9. Caldo onde <u>B. subtilis</u> (AP-51) foi multiplicado por 15 dias	18,60 a	5,66 ab
10. Caldo onde <u>B. subtilis</u> (AP-51) foi multiplicado por 15 dias e autoclavado	17,30 a	6,64 ab

* média de 3 repetições

** médias seguidas da mesma letra na coluna não diferiram entre si (TUKEY 5%).

4.2.1.2- Imersão por 5 horas

A imersão de sementes por 5 horas em suspensões de células de B. subtilis AP-03 e AP-51 promoveu um controle na incidência de P. oryzae semelhante ao tratamento fungicida com iprodione+thiram, o mesmo acontecendo com A. tenuis na presença do isolado AP-03. A incidência de B. sorokiniana na presença da bactéria também diferiu da testemunha para os 2 isolados, mas não do tratamento químico (Tabela 11).

Tabela 11- Incidência (%) de fungos em sementes de trigo tratadas com Bacillus subtilis, isolados AP-03 e AP-51, através de imersão.

tratamento	<u>Bipolaris</u> <u>sorokiniana</u>	<u>Pyricularia</u> <u>oryzae</u>	<u>Alternaria</u> <u>tenuis</u>
imersão em água por 5 horas	11,0* a**	18,0 a	12,5 a
imersão em suspensão de <u>B. subtilis</u> AP-51 por 5 horas	6,5 b	3,0 b	11,5 a
imersão em suspensão de <u>B. subtilis</u> AP-03 por 5 horas	5,5 b	2,0 b	7,0 b
iprodione + thiram (50+150g/100kg de sem.)	0,5 c	1,0 b	4,0 b

*-média de 4 repetições

**-médias seguidas das mesmas letras, nas colunas, não diferiram entre si (Duncan 5%).

4.2.1.3- Imersão por 5 horas em Suspensões Contendo Diferentes Concentrações de B. subtilis

A incidência dos patógenos nas sementes foi inversamente proporcional a concentração de células, sendo a concentração de 20% ($8,15 \times 10^8$ ufc/ml que forneceu $1,48 \times 10^8$ ufc/sementes) melhor para os 3 fungos testados, principalmente para B. sorokiniana e A. tenuis que apresentaram incidências semelhantes à do tratamento químico. Para A. tenuis, a simples imersão em água reduziu a incidência em 40%, quando comparado à testemunha absoluta (Tabela 12).

A inibição, calculada em relação à testemunha absoluta (Figura 4), ilustra a influência da quantidade de células de B. subtilis aplicadas às sementes, mostrando uma inibição crescente de acordo com o aumento na concentração de células na suspensão.

O tratamento com B. subtilis e o molhamento com posterior secagem, não afetou a emergência das sementes em solo natural à temperatura ambiente, que variou de 10°C a 27°C , nem em areia esterilizada sob temperatura controlada ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$), como mostra a Figura 3.

Tabela 12- Incidência (inc.) e transmissão (trans.) de Puricularia oryzae, Bipolaris sorokiniana e Alternaria tenuis em sementes de trigo variedade "Anahuc" submetidas a tratamento com Bacillus subtilis por imersão por 5 horas.

Tratamentos	<u>P. oryzae</u>		<u>B. sorokiniana</u>		<u>A. Tenuis</u>	
	inc.	trans. (%)	inc.	trans. (%)	inc.	trans.
testemunha absoluta	22,0 ^{*a***}	68,1 ^{**}	12,3 a	44,7	36,3 a	8,2
imersão em água	21,0 a	73,8	13,3 a	37,6	22,0 b	20,4
imersão em suspensão de céls. de <u>B. subtilis</u> a 5%	17,0 ab	14,7	6,6 ab	98,5	18,6 b	0,0
imersão em suspensão de céls. de <u>B. subtilis</u> a 10%	12,0 bc	66,6	8,0 ab	18,7	12,0 c	0,0
imersão em suspensão de céls. de <u>B. subtilis</u> a 20%	11,0 c	31,8	3,6 b	83,3	11,3 c	0,0
iprodione + thiram (50+150g/100kg sementes)	2,0 d	25,0	3,6 b	0,0	9,6 c	0,0

* média de 300 sementes

** média de 200 sementes

*** médias seguidas das mesmas letras nas colunas não diferiram entre si (Duncan 5%).

médias não diferiram entre si (tukey 5%)

Figura 3- Emergência (%) de plântulas de trigo 10 dias após semeadura em solo natural mantidos à temperatura ambiente e em areia esterilizada mantidas a $25 \pm 2^{\circ} \text{C}$, após tratamento por imersão (lm.) em suspensões contendo diferentes concentrações de células de Bacillus subtilis.

Figura 4- Redução (%) da incidência de *Bipolaris sorokiniana*, *Pyricularia oryzae* e *Alternaria tenuis* em sementes de trigo tratadas por imersão (im.) em suspensões contendo diferentes concentrações de células de *Bacillus subtilis*.

4.2.2 - Método de Contato

4.2.2.1- Tratamento de Sementes por Diferentes Períodos de Contato

O contato com o meio de cultura por diferentes períodos (0 a 24 horas), com e sem a bactéria, não afetou a emergência das plântulas (Figura 5).

Todos os períodos de contato com a bactéria promoveram uma redução significativa na incidência de B. sorokiniana em relação às respectivas testemunhas (Tabela 13), mas não se igualaram ao fungicida, o qual erradicou o patógeno.

Para P.oryzae os melhores resultados, quanto a diminuição da incidência foram, respectivamente, contato por 6, 12 e 24 horas, que se apresentaram estatisticamente semelhante ao tratamento fungicida. O contato por 12 e 24 horas também se igualaram ao fungicida para A.tenuis.

Tabela 13- Porcentagem de sementes portadoras de Pyricularia oryzae, Bipolaris sorokiniana e Alternaria tenuis após contato com Bacillus subtilis (AP-51).

tratamentos (tempo contato)	<u>Pyricularia</u> <u>oryzae</u>	<u>Bipolaris</u> <u>sorokiniana</u>	<u>Alternaria</u> <u>tenuis</u>
0 horas BDA	39,50* a**	42,00 a	31,00 a
1 hora BDA	43,50 a	45,00 a	19,50 abc
3 horas BDA	43,50 a	42,00 a	24,00 ab
6 horas BDA	46,50 a	47,50 a	23,50 ab
12 horas BDA	38,50 ab	54,00 a	25,50 ab
24 horas BDA	34,00 abc	45,00 a	15,50 bc
1 hora <u>B.subtilis</u>	32,50 abcd	10,00 b	12,00 bcd
3 horas <u>B.subtilis</u>	23,50 abcd	19,50 b	13,00 bcd
6 horas <u>B.subtilis</u>	18,00 bcde	16,00 b	9,00 cd
12 horas <u>B.subtilis</u>	12,00 de	13,50 b	6,50 de
24 horas <u>B.subtilis</u>	14,00 cde	9,00 b	7,00 de
thiram + Iprodione	4,50 e	0,00 c	1,00 e

* média de 3 repetições

** médias, nas colunas seguidas da mesma letra não diferiram estatisticamente entre si (Tukey 5%)

médias não diferiram entre si (Tukey 5%)

Figura 5- Porcentagem de emergência de sementes de trigo tratadas com *Bacillus subtilis* por diferentes períodos de contato.

4.2.2.2- Tratamento por Contato com os Isolados AP-03 e AP-51

Sementes com alta incidência de B. sorokiniana não responderam ao tratamento biológico, como pode ser observado na Tabela 14, onde se verifica que nenhum dos isolados testados diferiu estatisticamente da testemunha, permanecendo a incidência bastante elevada.

Tabela 14- Incidência (%) de Bipolaris sorokiniana e Alternaria tenuis em sementes de trigo após tratamento com Bacillus subtilis, isolados AP-03 e AP-51, pelo método do contato por 16 horas

tratamento	<u>B. sorokiniana</u>	<u>A. tenuis</u>
Contato BDA	98,00* a**	47,00 a
Contato <u>B. subtilis</u> isolado AP-03	93,00 ab	35,00 a
Contato <u>B. subtilis</u> isolado AP-51	95,00 a	34,00 a
iprodione + thiram (50+150g/100kg sementes)	36,00 c	4,00 b

*- média de 4 repetições

** - médias, seguidas da mesma letra, nas colunas, não diferiram entre si (Tukey 5%).

4.2.3- Comparação entre os Métodos de Imersão e Contato

4.2.3.1- Tratamento de Sementes com Isolado AP-03 por Contato e Imersão

O tratamento por contato, apesar do grande período de permanência das sementes no meio de cultura com e sem a bactéria e posterior secagem, não influenciou a emergência das mesmas, avaliadas aos 5 e 15 dias (Figura 6).

Quanto a incidência, o tratamento por contato, que forneceu $1,6 \times 10^7$ ufc/sem., embora estatisticamente semelhante ao fungicida para P. oryzae e B. sorokiniana, não diferenciou da imersão em água ou em suspensões de células, que apresentavam $5,3 \times 10^4$ ufc/sem.. Para A. tenuis, o contato com o meio de cultura estimulou o desenvolvimento do fungo sobre as sementes (Tabela 15).

Tabela 15- Incidência (%) de Bipolaris sorokiniana, Pyricularia oryzae e Alternaria tenuis em sementes de trigo tratadas com Bacillus subtilis AP-3 por contato e imersão.

tratamento	<u>B.sorokiniana</u>	<u>P. oryzae</u>	<u>A. tenuis</u>
contato com meio de cultura sem a bacteria por 16 horas	25,0* a**	25,0 a	52,0 a
contato com <u>B. subtilis</u> AP-03 por 16 horas	7,0 bc	8,0 bc	28,0 b
imersão em água por 5 horas	10,0 b	16,0 ab	25,0 b
imersão em suspensão de células de <u>B. subtilis</u> AP-03 por 5 horas	8,0 b	14,0 ab	19,0 bc
Iprodione + thiram (50+150g/100kg sem.)	1,0 c	1,0 c	10,0 c

*-media de 4 repetições

** médias seguidas das mesmas letras, nas colunas, não diferem entre si (Tukey 5%)

médias não diferiram entre si (Tukey 5%)

Figura 6- Porcentagem de emergência de sementes de trigo, aos 5 e 15 dias da semeadura, submetidas ao tratamento com Bacillus subtilis, AP-03, pelos métodos de contato (cont.) e imersão (im.).

4.2.3.2- Tratamento de Sementes com o Isolado AP-51 por Contato e Imersão

A incidência de B. sorokiniana não foi influenciada pela forma de tratamento (imersão ou contato), mantendo-se sempre elevada, semelhante à testemunha (Tabela 16). Na Tabela 17, observa-se que os tratamentos com B. subtilis apresentaram as menores porcentagens de transmissão, enquanto o tratamento químico apresentou 100%. Quanto a emergência, não houve diferença entre os tratamentos aos 15 dias após semeadura (Tabela 7).

Tabela 16- Efeito de formas de tratamento de sementes de trigo com Bacillus subtilis na incidência e severidade de Bipolaris sorokiniana.

tratamentos	incidência (%)	severidade
Contato <u>Bacillus subtilis</u> por 24 horas	96,5* a**	2,74*** ab
Contato meio de cultura por 24 horas	98,5 a	3,05 a
Imersão <u>B. subtilis</u> por 5 horas	96,0 a	2,70 ab
Imersão em água por 5 horas	98,5 a	2,58 b
Ipridione+thiran (50+150g/100kg sem.)	30,0 b	0,34 c

* média de 4 repetições

** médias seguidas da mesma letra nas colunas não diferiram entre si (Tukey 5%)

*** escala de severidade 0 - ausência do patógeno

1 - 1 a 10% da sem. coberta pelo fungo

2 - 11 a 25%

3 - 26 a 50%

4 - 51 a 75%

5 - 76 a 100%

Tabela 17- Porcentagem de sementes mortas, plântulas doentes, plântulas sadias e transmissão semente/plântula em teste de tubo de ensaio contendo ágar-água, para sementes portadoras de Bipolaris sorokiniana.

tratamentos	sementes mortas (%)	plântulas doentes (%)	plântulas sadias (%)	Transmissão (%)
contato BDA	23,75* ^a **	56,25 a	20,0 b	57
contato <u>B. subtilis</u>	33,75 a	33,75 a	32,5 ab	35
imersão água	25,00 a	50,00 a	25,0 ab	51
imersão <u>B. subtilis</u>	28,75 a	43,75 a	27,5 ab	46
iprodione + thiram	20,00 a	32,50 a	47,5 a	100

* média de 4 repetições

** médias seguidas da mesma letra não diferiram entre si (Tukey 5%)

médias não diferiram entre si (Tukey 5%)

Figura 7 - Emergência (%) de plântulas aos 8 e 15 dias após distribuição das sementes tratadas com Bacillus subtilis por imersão (im.) e contato (cont.) em caixas plásticas contendo solo esterilizado.

5-DISCUSSÃO

5.1-Seleção in vitro de B. subtilis a Patógenos Transportados por Sementes de Trigo.

Foi possível selecionar quatro isolados de B. subtilis (AP-03, AP-12, AP-51, AP-114), que retardaram o crescimento das colônias de Penicillium e Aspergillus por 3 e 2 dias respectivamente. Esse isolados ainda alteraram as características morfológicas, como tamanho e coloração das colônias, quando comparados às testemunhas. As colônias, embora atípicas, apresentavam-se em número semelhante ao tratamento testemunha (Figura 1) não sendo influenciados pela concentração dos metabólitos no meio de cultura (Tabela 3). Entretanto, o diâmetro das colônias foram menores principalmente, na presença dos isolados AP-3 e AP-51 (Figura 2). LAZZARETTI et alii (1992) verificaram que esses mesmos isolados de B. subtilis foram os mais efetivos na inibição do crescimento de diversos fungos transportados por sementes de feijão e presentes no solo.

Além do menor crescimento micelial, os metabólitos inibiram a capacidade de esporulação dos fungos, principalmente de Penicillium (Tabela 4). A eficiência dos metabólitos de B.

subtilis foi diretamente proporcional a sua concentração no meio de cultura. Este fato poderia ser atribuído a outros fatores, como alteração do pH e/ou exaustão dos nutrientes do meio. Entretanto, os valores de pH, antes e após o crescimento da bactéria, e antes ou após a autoclavagem, não foram alterados em mais de 0,1 unidades; ensaios de diluição (dados não apresentados) de BD em água destilada mostraram que as colônias dos fungos surgiam no mesmo período e com as mesmas características da testemunha (embora um pouco mais claras), em meios contendo somente 1% de BD, sugerindo que a inibição não foi nutricional, como já observado por BETTIOL (1988) para P. oryzae. Inibição e/ou controle de fungos do gênero Penicillium também foram obtidos por SINGH & DEVERALL (1984).

Os metabólitos de B. subtilis, inibiram ou retardaram o crescimento micelial de B. sorokiniana, P. oryzae, A. tenuis, S. nodorum e F. graminearum por, no mínimo, 30 dias (Tabelas 5 a 8). Para B. sorokiniana e P. oryzae a inibição foi de 100% para os quatro isolados testados (Tabela 9), mostrando a alta sensibilidade destes fungos aos metabólitos desses isolados de B. subtilis. Esses resultados estão dentro do esperado pois BETTIOL & KIMATI (1990) e NUNES et alii (1989), seleccionaram esses isolados de B. subtilis, quanto à capacidade de inibirem P. oryzae e Helminthosporium oryzae, respectivamente.

O crescimento micelial, embora pequeno, de A. tenuis e S. nodorum na presença dos isolados testados, pode ser

atribuído a menor sensibilidade destes patógenos aos metabólitos de B.subtilis produzidos por estes isolados nas condições testadas. F. graminearum foi o menos sensível aos metabólitos, iniciando o crescimento logo nos primeiros dias de incubação para todos os isolados de B.subtilis. Estes resultados sugerem que, embora em testes de cultura pareada ocorra a formação de halo de inibição (dados não publicados), os metabólitos autoclavados não são efetivos, ou o fungo é influenciado, positivamente, por nutrientes celulares. Este efeito foi observado por GRANT et alii (1991), quando relataram que alguns fungos, entre eles espécies do gênero Fusarium, podiam utilizar componentes celulares de bactérias mortas pelo calor como fonte suplementar de C, N e P entre outros compostos, e que este processo, denominado citólise, no caso de F. oxysporum, se restringe ao ataque somente de células mortas pelo calor.

O desenvolvimento dos fungos, na presença de metabólitos produzidos pela bactéria, pode ser atribuído a diversos fatores como: 1- a quantidade de metabólitos produzidas não foi suficiente para inibir o crescimento micelial; 2- os fungos que apresentaram crescimento são menos sensíveis aos metabólitos produzidos; 3- pode ocorrer uma adaptação (resistência) do fungo aos metabólitos; 4- os metabólitos podem ser degradados por enzimas dos fungos (GRANT et alii, 1986); 5- os metabólitos podem se degradar e/ou volatilizar, perdendo suas características antagônicas; e 6- os metabólitos produzidos podem

ser constituídos por substâncias químicas diferentes, sendo que cada uma apresenta características distintas quanto à termoestabilidade, degradação, volatilização entre outros. Como cada fungo pode apresentar sensibilidade a diferentes compostos químicos produzidos pelas bactérias, pode-se atribuir a algumas destas hipóteses a inibição em diferentes graus observadas.

5.2-Tratamento de Sementes de Trigo com B. subtilis

Em todos os ensaios onde foram comparados os isolados AP-03 e AP-51 se mostraram semelhantes, não sendo possível definir qual o melhor isolado para o tratamento de sementes.

A imersão das sementes por curtos períodos de tempo (1,5 min.) em caldo onde B. subtilis foi multiplicado, autoclavado ou não, não foi eficiente no controle de P. oryzae. Entretanto, para B. sorokiniana, os resultados foram bastante satisfatórios, inibindo a incidência em até 64,7%. A eficiência ou fator responsável pela inibição de B. sorokiniana, não está relacionado com o período de incubação do caldo ou com a presença da célula viva da bactéria, pois a incubação por 7 dias, como já

havia sido observado por BAKER et alii (1985), foi melhor que a incubação por 15 dias, o que sugere ser o período de 7 dias o pico da produção de metabólitos. Também não houve diferenças entre os tratamentos com células vivas ou mortas pelo calor, sugerindo que o efeito inibitório foi proporcionado por substâncias termoestáveis.

Como não foi possível detectar diferença entre os tratamentos utilizando-se células vivas ou mortas, a utilização de células vivas foi preferida, fazendo-se das sementes um veículo do agente de controle biológico, possibilitando seu desenvolvimento no ambiente, como foi sugerido por AHAMAD & BAKER (1987).

Com o aumento do período de imersão para 5 horas, conseguiu-se um bom controle de P. oryzae e A. tenuis, além de B. sorokiniana, o que era esperado (Tabela 11). Os melhores resultados foram obtidos quando imergiam-se sementes nas suspensões mais concentradas, sugerindo que a quantidade de células presentes na semente têm grande influência no controle dos patógenos, provavelmente devido à maior produção de antibióticos. Efeito semelhante foi observado por PUSEY & WILSON (1984), quando trataram frutos de ameixa, nectarina, pêssigo e damasco com diferentes concentrações de células de B. subtilis, obtendo os melhores resultados no controle de Monilinia fructicola com as concentrações mais elevadas da bactéria. O mesmo ocorreu nos tratamentos por contato das sementes com

colônias de B. subtilis, onde observou-se que quanto maior o período de contato, maior a eficiência na inibição dos fungos presentes nas sementes (Tabela 13).

O contato com a bactéria por períodos de 12 horas ou mais promoveu um controle de P. oryzae e A. tenuis semelhante ao tratamento fungicida. Para B. sorokiniana, embora ocorram diferenças significativas em relação à testemunha, com 1 hora de contato, a melhor inibição (78,6%) foi obtida quando as sementes permaneciam por 12 horas em contato com as células de B. subtilis. Os melhores resultados obtidos nos tratamentos por contato podem ser atribuídos ao grande número de células aderidas ou absorvidas pela sementes, devido à menor quantidade de água livre presente no meio. A penetração das células da bactéria nas sementes pode ser observada quando, após os tratamentos, as sementes foram desinfestadas superficialmente com hipoclorito de sódio (3:1) por 2 minutos e plaqueadas em meio BDA. A bactéria só aparece no meio de cultura quando as sementes foram partidas ao meio ou por ocasião da germinação, o que comprova a presença interna da bactéria na semente.

O contato de sementes com agentes de controle biológico mostrou-se tão eficiente quanto a inoculação de patógenos, demonstrada por TANAKA et alii (1989); ROLIN et alii (1990) e VALARINI & MENTEN (1991), podendo ser recomendado. Entretanto, a utilização desta técnica, embora de fácil execução a nível experimental, é superada pelo tratamento por imersão,

comercialmente mais apropriado, mesmo necessitando de grande quantidade de células para obter-se um bom controle.

Para sementes com alta incidência de B. sorokiniana, nenhum dos isolados, em nenhuma das formas de tratamento, se mostrou eficiente. Mesmo o tratamento químico, que aplicado em sementes com menor incidência mostra-se muito eficiente, não foi promissor. Estes resultados sustentam a afirmação segundo a qual o tratamento de sementes deva ser executado em lotes com baixos níveis de infecção para ser mais eficiente (FORCELINI, 1991a). No caso de trigo, a incidência máxima de B. sorokiniana permitida em sementes certificadas e fiscalizadas é de 40%, segundo a proposta de níveis de tolerância de patógenos para o programa de certificação de sementes no Brasil (ABRATES/COPASEM, 1991). A alta incidência, mesmo restrita à uma pequena área das sementes e a elevada taxa de transmissão observada após o tratamento químico (Tabelas 16 e 17), pode ser atribuída à localização interna, no endosperma, do patógeno (FORCELINI, 1991a), não sendo atingidos pelos fungicidas de ação protetora (REIS, 1987 ; FORCELINI, 1991a), muito embora o fungicida iprodione apresente uma certa ação sistêmica (FORCELINI, 1991a). Por outro lado, o tratamento biológico, embora sem efeito sobre a incidência e a severidade, propiciou as menores taxas de transmissão, nas condições do ensaio (Tabelas 16 e 17).

A emergência das sementes, tratadas com B. subtilis, em solo ou areia não foi prejudicada pelos isolados

testados nem pela forma de tratamento. O aumento na emergência, observada em sementes de trigo (MERRIMAN et alii, 1974 e ZASPEL, 1992) ou amendoim (TURNER & BACKMAN, 1991), tratadas com B. subtilis, não foi observado no presente trabalho, devido, provavelmente, à elevada porcentagem de emergência das sementes utilizadas.

Os resultados obtidos mostram que a utilização de B. subtilis no tratamento de sementes é viável, podendo ser melhorado através da utilização em controle integrado. A viabilidade econômica pode ser melhorada com a produção de formulações adequadas de células da bactéria. Segundo TURNER & BACKMAN (1991), a produção de B. subtilis em formulações como pó seco, pó molhável ou suspensão concentrada, em quantidades necessárias para o uso agrícola, é relativamente fácil devido a formação de endosporo pelas bactérias.

6- CONCLUSÕES

Na forma e nas condições em que foram realizados os ensaios, pode-se concluir:

-foi possível seleccionar, in vitro, os isolados AP-03, AP-12, AP-51 e AP-114 de B. subtilis dentre os 13 comparados, quanto à eficiência na inibição de fungos frequentemente presentes nas sementes de trigo;

-o tratamento de sementes de trigo com B. subtilis se mostrou viável em tratamento por imersão e por contato, em sementes com incidência inferior a 40% de B. sorokiniana;

-B. subtilis aplicado às sementes de trigo, não afeta a emergência das plântulas;

-não foi observada diferença estatística entre os métodos de aplicação de B. subtilis em sementes de trigo, por contato e por imersão.

6-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADETUYI, F.C. In vitro inhibition of some fungal pathogens by bacterial isolates from rice seed coat. Zeitschrift fur Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz, 96(5):486-493, 1989. Apud Review of Plant Pathology, 69(7):434, 1990. (resumo)
- AHMAD, J.S. & BAKER, R. Rhizosphere competence of Trichoderma harzianum. Phytopathology, 77(2):182-189, 1987.
- ALVES, M.L.B.; TANAKA, M.A.S.; MENTEN, J.O.M.; NUNES, M.E.T. Inibição do crescimento micelial de Pyricularia oryzae de trigo e arroz por Bacillus spp. Fitopatologia Brasileira, 15(1): 18-31, 1990.
- BAKER, C.J. & COOK, R.J. Biological control of plant pathogen. San Francisco, W.H. Freeman, 1974. 433p.
- BAKER, C.J.; STAVELY, J.R.; THOMAS, C.A.; SASER, M.; MACFALL, J.S. Inhibitory effect of Bacillus subtilis on Uromyces phaseoli and development of rust pustules on bean leaves. Phytopathology, 73 (8):1148-1152, 1983.
- BAKER, C.J.; STAVELY, J.R. & MOCK, N. Biocontrol of bean rust by Bacillus subtilis under field conditions. Plant Disease, 69(9): 770-772, 1985.

- BAKER, R. Biological control of plant pathogens: definitions.
In: HOY, M.A. & HERZOG, D.C., eds. Biological control in agricultural IPM systems. New York, Academic Press, 1985.
p.25-39.
- BECKER, J.O. & COOK, R.J. Role of siderophores in suppression of
Pythium species and production of increased growth response
of wheat by fluorescent pseudomonads. Phytopathology, 78(6):
778-782, 1988.
- BETTIOL, W. Seleção de microrganismos antagônicos a
Pyricularia oryzae CAV. para o controle da Brusone do arroz
(Oryza sativa L.). Piracicaba, 1988. 140p. (Doutorado- Escola
Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP)
- BETTIOL, W.; AUER, C.G.; CAMARGO, L.E.A.; KIMATI, H. Controle da
mancha foliar de Eucalyptus grandis e E. urophylla induzida
por Cylindrocladium scoparium com Bacillus sp. Summa
Phytopathologica, 14(3/4): 210-218, 1988.
- BETTIOL, W.; BRANDÃO, M.S.B.; SAITO, M.L. Controle da ferrugem do
feijoeiro com extratos e células formuladas de Bacillus
subtilis. Summa Phytopathologica, 18(2): 153-159, 1992.
- BETTIOL, W. & KIMATI, H. Efeito de Bacillus subtilis sobre
Pyricularia oryzae agente causal da brusone do arroz.
Pesquisa Agropecuária Brasileira, 25(8):1165-1174, 1990.

- BOOSALIS, M.G. Hyperparasitism. Annual Review of Phytopathology, 2: 363-376, 1964.
- BRUEHL, G.W. Soilborne plant pathogens. New York, 1987. 368 p.
- BUCHANAN, R.E. & GIBBONS, N.G. Bergey's manual of determinative bacteriology. 8ed. Baltimore, The Williams & Wilkins, 1975. 1268p.
- BULL, C.T.; WELLER, D.M.; THOMASHOW, L.S. Relationship between root colonization and suppression of Gaeumannomyces graminis var. tritici by Pseudomonas fluorescens strain 2-79. Phytopathology, 81(9): 954-959, 1991.
- CARDOSO, E.J.B.N. Relações ecológicas entre microrganismos. In: GALLI, F. coord. Manual de fitopatologia, 2 ed., São Paulo, Ceres, 1978. v.1, p.26-51.
- CARDOSO, E.J.B.N. Ecologia microbiana do solo. In: CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P. coord., Microbiologia do solo, Campinas, SBGS, 1992. p.33-41.
- CARDOSO, E.J.B.N. & KIMATI, H. Doenças do trigo (Triticum spp). In: GALLI, F. coord. Manual de fitopatologia. São Paulo, Ceres, 1980. v.2, p.553-573.

- CASAS,A.T.; KAISER,W,J.; INGRAM,D.M. Control of Pythium seed rot and preemergence damping-off chickepea in the U.S. pacific northwest and Spain. Plant Disease, 74(8): 563-569, 1990.

- CHAKRABORTY,S. & BHOWMIK,T.P. Chemical and biological control of sunflower collar rot caused by Sclerotium rolfsii Sacc. Pesticides, 19(2):31-33, 1985.

- COMPÊNDIO de defensivos agrícolas: guia prático de produtos fitossanitários para uso agrícola. 2 ed. São Paulo, Andrei Editora, 1987. 492p.

- COOK,R.J. Biological control of plant pathogens: Theory to application. Phytopathology. 75(1): 25-29, 1985.

- COOK,R.J. & BAKER,K.F. The nature and practice of biological control of plant pathogens. St. Paul, The Americam Phytopathological Society, 1983. 539p.

- CUBETA,M.A.; HARTMAN,G.L.; SINCLAIR,J.B. Interation between Bacillus subtilis and fungi associated with soybean seeds. Plant Disease, 69(6): 506-509,1985.

- DEACON,J.W. Microbial control of plant pests and diseases. Amsterdam, Van Nostrand Reinhold, 1983. 88p.

- ELAD,Y. & CHET,I. Possible role of competitions for nutrients in biocontrol of Pythium damping-off by bacteria. Phytopathology, 77(2): 190-195, 1987.

- FIGUEIREDO,M.B. Estudos sobre a aplicação de métodos de Castellani para a conservação de fungos patogênicos em plantas. O Biológico, 33: 9-13, 1987.

- FORCELINI,C.A. Tratamento de sementes de trigo no Brasil. In: MENTEN,J.O.M. ed. Patógenos em sementes: detecção, danos e controle químico. Piracicaba, ESALQ/FEALQ, 1991a. p.247-64

- FORCELINI,C.A. Importância epidemiológica de fungos do gênero Helminthosporium em sementes de trigo e cevada. In: MENTEN,J.O.M. ed. Patógenos em sementes: detecção, danos e controle químico. Piracicaba, ESALQ/FEALQ, 1991b. p.179-90

- FORCELINI,C.A. Incidência transmissão e controle de Bipolaris sorokiniana em sementes de trigo. Piracicaba, 1992. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP)

- FORCELINI,C.A. & REIS,E.M. Controle de Helminthosporium sativum,Septoria nodorum, Fusarium graminearum e Erysiphe graminis f. sp. tritici pelo tratamento de sementes de trigo com fungicidas. Fitopatologia brasileira, 13(1): 28-31, 1988.

- GAIND, S. & GAUR, A.C. Thermotolerant phosphate solubilizing microorganisms and their interaction with mungbean. Plant and Soil, 133: 141-149, 1991.
- GHINI, R. & BETTIOL, W. Coletor solar para desinfestação de substrato. Summa Phytopathologica, 17(3/4):281-286, 1991.
- GNANAMANICKAM, S.S.; CANDOLE, B.L.; ROSALES, A.M.; MEW, T.W. Bacterization of rice for biological control of fungal pathogens. Philippine Phytopathology, 24(1-2): 60-61, 1988. (resumo).
- GOULART, A.C.P.; MESQUITA, A.N.; PAIVA, F.A. Eficiência do tratamento químico de sementes de trigo no controle de Pyricularia oryzae e Cochliobolus sativus (Helminthosporium sativum). Fitopatologia Brasileira, 15(4): 302-305, 1990.
- GOULART, A.C.P. & PAIVA, F.A. Transmissão de Pyricularia oryzae através de sementes de trigo (Triticum aestivum). Fitopatologia Brasileira, 15(4): 359-362, 1990.
- GOULART, A.C.P.; PAIVA, F.A.; MESQUITA, A.N. Perdas em trigo (Triticum aestivum) causadas por Pyricularia oryzae CAV. In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE TRIGO, 16, Dourados, 1991. Resumos. Dourados, EMBRAPA-UEPAE Dourados, 1991. p.112.

- GRANT,W.D.; RHODES,L.L; PROSSER,B.A.; ASHER,R.A. Production of bacteriolytic enzymes and degradation of bacteria by filamentous fungi. Journal of General Microbiology, 132:2353-2358, 1986.

- GRANT,W.D.; PROSSER,B.A.; WAKEFIELD,J. Cytolysis of Bacillus subtilis by Fusarium oxysporum. Journal of General Microbiology, 137: 287-291, 1991.

- HARMAN,G.E. Seed treatments for biological control of plant disease. Crop Protection, 10: 166-171, 1991.

- HARMAN,G.E.; TAYLOR,A.G.; STASZ,T.E. Combining effective strains of Trichoderma harzianum and sold matrix priming to improve biological seed treatments. Plant Disease 78(8): 631-637, 1989.

- HEWETT,P.D. & GRIFFITHS,D.G. The biology of seed treatment. In: JEFFS,R.A. ed., Seed treatment. England, CIPAC, 1978. 101p, chapter 2.

- HUBBARD,J.P.; HARMAN,G., HADAR,Y. Effect of soilborne Pseudomonas spp on the biological control agent, Trichoderma harzianum on pea seeds. Phytopathology, 73(5): 655-59,1983.

-HUBER,D.M.; EL-NASSHAR,H.; MOORE,L.W.; MATHRE,D.E; WAGNER,J.E.

Interaction between a peat carrier and bacterial seed treatments evaluated for biological control of the take-all diseases of wheat (Triticum aestivum L.). Biology and Fertility of Soils, 8: 166-171, 1989.

-IBGE. Anuario estatístico do Brasil, 1989. Rio de Janeiro, v.49, p.331, 1989.

-IGARASHI,S. Brusone do trigo- histórico e distribuição geográfica no Paraná. In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE TRIGO,15, Passo Fundo, RS, 1988. Resumos dos trabalhos apresentados na XV reunião nacional de pesquisa do trigo. Passo Fundo, EMBRAPA/CNPT, 1988. p.157.

-IGARASHI,S.; UTIAMADA,C.M.; IGARASHI,L.C.; KAZUMA,A.H.; LOPES, R.S. Pyricularia sp em trigo, I ocorrência de Pyricularia sp no estado do Paraná. Fitopatologia Brasileira, 11(2):351-52, 1986. (resumo).

-JACOBSEN,B.J. & BACKMAN,P.A. Biological and cultural plant disease controls: alternatives and supplements to chemicals in IPM systems. Plant Disease, 77(3): 311-315, 1993.

- JINDAL,K.K. & THIND,B.S. Microflora of cowpea seeds and its significance in the biological control of seedborne infection of Xanthomonas campestris pv. vignicola. Seed Science and Technology, 18: 393-403, 1990.
- JUNQUEIRA,N.T.V. & GASPAROTTO,L. Controle biológico de fungos estromáticos causadores de doenças foliares em seringueira. In: BETTIOL,W. ed. Controle biológico de doenças de plantas. Jaguariúna, EMBRAPA-CNPDA, 1991. p.307-331.
- KATZ,E. & DEMAINE,A.L. The peptide antibiotics of Bacillus chemistry, biogenesis, and possible functions. Bacteriological Review, 41(2): 449-474, 1977.
- KEMPF,H.J. & WOLF,G. Erwinia herbicola as a biocontrol agent of Fusarium culmorum and Puccinia recondita f.sp. tritici on wheat. Phytopathology, 79(9): 990-994, 1989.
- LEE,W.H. & OGOSHI,A. Studies on the seed bacterization of sugar beets II. Antibiosis to damping-off pathogens and growth stimulation of sugar beets by rhizoplane bacteria. Annals of the Phytopathological Society of Japan, 52(2): 175-183,1986.

- LAZZARETTI, E.; MENTEN, J.O.M.; BETTIOL, W. Bacillus subtilis antagônicos aos principais patógenos associados à sementes de feijão e trigo. In: SIMPOSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 3, águas de Lindóia/SP, 1992. Anais. Jaguariúna, EMBRAPA/CNPDA, 1992. p.295.
- LEE, Y.H.; SHIM, G.Y.; LEE, E.J.; MEW, T.W. Evaluation of biocontrol activity of fluorescent pseudomonads against some rice fungal diseases in vitro and green house. Korean Journal of Plant Pathology, 6(1): 73-80, 1990.
- LI, D.M. & ALEXANDRER, M. Co-inoculation with antibiotic producing bacteria to increase colonization and nodulation by rhizobia. Plant and Soil, 108: 211-210, 1988.
- LOPES, M.E.B.M. & BUENO, J.T. Estudos preliminares sobre detecção de Pyricularia sp em sementes de trigo (Triticum aestivum) e eficiência do tratamento de sementes com fungicidas em condições de laboratório. Summa Phytopathologica, 16(2): 166-176, 1990.
- LUCCA FILHO, O.A. Metodologia dos testes de sanidade de sementes. In: SOAVE, J. & WETZEL, M.M.V.S. ed. Patologia de sementes, Campinas, Fundação Cargill, 1987. p.276-298.
- LUZ, W.C. Blocontrole de ferrugem da folha do trigo. Fitopatologia brasileira, 13:111, 1988.

- LUZ, W.C. Controle biológico das doenças na espermosfera. In: BETTIOL, W. org. Controle biológico de doenças de plantas. Jaguariúna, EMBRAPA/CNPDA, 1991. p.25-31.
- LUZ, W.C. Controle microbiológico do mal do pé do trigo pelo tratamento de sementes. Fitopatologia Brasileira, 18(1): 82-85, 1993.
- MACHADO, J.C. Introdução à patologia de sementes. In: SOAVE, J. & WETZEL, M.M.V.S. ed. Patologia de sementes. Campinas, Fundação Cargill, 1987. p.3-17.
- MEHTA, Y.R. Doenças de trigo e seu controle. São Paulo, Ceres, 1978. 190p.
- MEHTA, Y.R.; IGARASHI, S.; NAZARENO, N.R.X. Doenças do trigo no estado do Paraná: guia para identificação e controle. Londrina, IAPAR, 1988. 54p. (IAPAR. Documentos, 8)
- MENTEN, J.O.M. Situação atual e perspectivas da patologia de sementes no Brasil. In: MENTEN, J.O.M., ed. Patógenos em sementes: detecção, danos e controle químico. Piracicaba, ESALQ/FEALQ, 1991a. p.21-36.
- MENTEN, J.O.M. Prejuízos causados por patógenos associados às sementes. In: MENTEN, J.O.M. ed., Patógenos em sementes: detecção, danos e controle químico, Piracicaba, ESALQ/FEALQ, 1991b. p.115-136.

- MENTEN, J.O.M. Importância do tratamento de sementes. In: MENTEN, J.O.M. ed., Patógenos em sementes: detecção, danos e controle químico, Piracicaba, ESALQ/FEALQ, 1991c. p.203-224.
- MENTEN, J.O.M. & BUENO, J.T. Transmissão de patógenos pelas sementes. In: SOAVE, J. & WETZEL, M.M.V.S. ed., Patologia de sementes, Fundação Cargill, Campinas, 1987. p.184-191.
- MERRIMAN, P.R.; PRICE, R.D.; KOLLMORGEN, J.F.; PIGGOTT, T.; RIDGE, E.H. Effect of seed inoculation with Bacillus subtilis and Streptomyces griseus on the growth of cereals and carrots. Australian Journal of Agricultural Research, 25: 219-226, 1974.
- MICHHEREFF, S.J.; MENEZES, M.; MARIANO, R.L.R. Antagonismo de espécies de Trichoderma sobre Colletotrichum graminicola, agente da antracnose do sorgo em condições de laboratório. Summa Phytopathologica, 19(1): 14-17, 1993.
- MOTA, F.S. Clima e zoneamento para triticultura no Brasil. In: OSÓRIO, E. coord. Trigo no Brasil. Campinas, Fundação Cargill, 1982. p. 27-62.
- NASSER, L.G.B. Testes de sanidade de sementes de trigo (Triticum aestivum L.). In: SOAVE, J. & WETZEL, M.M.V.S. ed. Patologia de sementes. Campinas, Fundação Cargill, 1987. p.469-480.

- NEERGARD,P. Risks for the EPPO regions from seed-borne pathogens. EPPO bulletin, 11(3): 207-212, 1981.
- NEERGARD,P. & SAAD,A. Seed health testing of rice.1 A contribution to development of laboratory routine testing methods. In: Handbook on seed health testing, Series 2A(2).s.e., The International Seed Testing Association, 1973. 31p.
- NORRIS,J.R.; BERKELEY,R.C.W.; LOGAN,A.; O'DONNELL,A.L. The genera Bacillus and Sporolactobacillus. In: STARR,M.P. The Prokaryotes. Berlin, Springer Verlag, 1981. p.1711-1742.
- NUNES.M.E.T.; BETTIOL,W.; KIMATI,H. Seleção de microrganismos antagônicos a Helminthosporium oryzae para o controle da mancha parda do arroz. Fitopatologia Brasileira, 11:336, 1989.
- PARKE,J.L. Population dynamics of Pseudomonas cepacia in the pea spermosphere in relation to biocontrol of Pythium. Phytopathology, 80(12): 1307-11, 1990.
- PAPAVIZAS,G.C. & HUNDSEN,R.D. Biological control of soilborne fungae propagules. Annual Review of Phytopathology, 18:389-412,1980.

- PATRICIO,F.R.A.: BORIN,R.B.R.G.: ORTOLANI,D.B. Patógenos associados a sementes que reduzem a germinação e vigor. In: MENTEN,J.O.M. ed., Patógenos em sementes: detecção, danos e controle químico. Piracicaba, ESALQ/FEALQ, 1991. p.137-160.
- PUSEY,P.L. & WILSON,C.L. Postharvest biological control of stone fruit brown rot by Bacillus subtilis. Plant Disease, 68 (9):753-756, 1984.
- PAULITZ,T.C. Effect of Pseudomonas putida on the stimulation of Pythium ultimum by seed volatiles of pea and soybean. Phytopathology, 81(10): 1282-87, 1991.
- PICININI,E.C. & FERNANDES,J.M.C. Ocorrência da Brusone (Pyricularia oryzae) em lavouras comerciais de trigo (Triticum aestivum) no estado do Rio Grande do Sul. Fitopatologia Brasileira, 15(1): 83-84, 1990.
- RAHALKAR,P.W. & NEERGARD,P. Studies on Aureofungin as seed treatment in controlling seed borne fungal diseases. Hindustan Antibiotics Bulletin, 11(3):163-165, 1969.
- REEDY,M.S. & RAHE,J.E. Growth effects associated with seed bacterization not correlated with populations of Bacillus subtilis inoculant in onion seedling rhizospheres. Soil Biology and Biochemistry, 21(3): 373-378, 1989.

- REIS,E.M. Patologia de sementes de cereais de inverno. São Paulo, CNDA, 1987. 32p.
- REIS,E.M.; FERNANDES,J.M.C.; PICININI,E.C. Estratégias para o controle de doenças do trigo. Passo Fundo, EMBRAPA-CNPT, 1988. 50p. (EMBRAPA-CNPT. Documentos, 7).
- ROBBS,C.F. Bactérias como agentes de controle biológico de fitopatógenos. In: BETTOL,W. org. Controle biológico de doenças de plantas. Jaguariúna:EMBRAPA/CNPDA, 1991. p.121-133.
- ROLIM,P.R.R.; CENTURION,M.A.P.C; MENTEN,J.O.M. Alternaria sp. em feijoeiro (Phaseolus vulgaris): incidência na semente, tipos morfológicos, patogenicidade e transmissibilidade de diferentes isolados. Summa Phytopathologica, 16(2):130-139, 1990.
- ROSSALL,S. & McKNIGHT,S.E. Some effects of Bacillus subtilis (MBI 600) on the development of cotton and peanut. Bulletin-SROP, 14(8): 88-92, 1991. APUD Review of Plant Pathology, 71(11):880, 1992.
- SARTORI,J.F. Giberela In: OSORIO,E.A. coord. Trigo no Brasil, Campinas, Fundação Gargill, 1982. 620p.

- SCORTHICHINI,M.: ROSSI,M.P., RICCI,B.: NDZOUNBA,B. Soybean (Glycine max (L.) Merr) seed decay associatede with Bacillus subtilis (Ehrenberg) Cohn, in Gabon. FAO Plant Protection Bulletin, 37(2): 87-91, 1989.
- SINCLAIR,J.B. Fungicide sprays for the control of seedborne pathogens of rice, soybean and wheat. Seed & Technology, 9:697-705, 1981.
- SINGH,V. & DEVERALL,B.J. Bacillus subtilis as a control agent against funagl pathogens of citrus fruit. Transactions of the British Mycological Society, 83(3): 487-490, 1984.
- SOAVE,J. & MORAES,S.A. Medidas de controle das doenças transmitidas por sementes In: SOAVE,J. & WETZEL,M.M.V.S. ed., Patologia de sementes, Campinas, Fundação Cargill, 1987. p.192-259.
- SOYTONG,K. & QUIMIO,T.H. Biological control of rice blast disease by seed coating with Chaetomium. Philippine Phytopathology, 24(1-2):60, 1989. (resumo).
- STAVELY,J.R.: THOMAS,G.A.: BAKER,G.J.: MACFALL,J.S. Greenhouse control of bean rust with Bacillus subtilis. Phytopathology, 71(7), 1981.

- SUDO,S. Blocontrole de Catacauma torrindiella e Coccostroma palmicola, agentes causadores da lixa preta no coqueiro. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS DE PLANTAS, 3, 1989. Piracicaba. Anais Piracicaba, USP/EMBRAPA, 1989. p.57-59.
- TANAKA,M.A.S.; MENTEN,J.O.M.; MARIANO,M.I.A. Inoculação artificial de sementes de algodão com Colletotrichum gossypii var. cephalosporioides e infecção das sementes em função do tempo de exposição ao patógeno. Summa Phytopathologica, 15(3-4):232-237, 1989.
- TAYLOR,A.G. & HARMAN,G.E. Concepts and technologies of selected seed treatments.Annual Review of Phytopathology, 28:321-339, 1990.
- TOLEDO,A.C.D. & CARDOSO,E.J.B.N. Antagonismo de alguns fungos do solo ao Fusarium moniliforme Sh. Summa Phytopathologica, 1(3):164-168, 1975.
- TURNER,J.T. & BACKAMAN,P.A. Factors relating to peanut yield increases after seed treatment with Bacillus subtilis. Plant Disease, 75(4): 347-353, 1991.
-

- VALARINI,P.J. & MENTEN,J.O.M. Inoculação artificial de sementes de feijão com Xanthomonas campestris pv. phaseoli e seu efeito na sanidade e germinação das sementes. Summa Phytopathologica, 17(3/4): 227-231, 1991.
- VENKATASUBBAIAH,P. Efficacy of Bacillus subtilis as a biocontrol for rot of coffe pathogen. Geobios, 12(3/4): 101-104, 1985.
- WALLAGE,H.A.H. & BATEMAN,G.L. Fungicidal seed treatment of cereals. In:JEFFS,K.A. ed. Seed treatment, England, CIPAC, 1978. p.44-58.
- WEI,G.; KLOPPER,J.W.; TUZUN,S. Induction of systemic resistance of cucumber to Colletotrichum orbiculare by select strains of plant growth promoting rhizobacteria. Phytopathology, 81(12):1508-1512, 1991.
- WELLER,D.M. Biological control of rhizosphere with bacteria. Annual Review of Phytopathology, 26: 379-407, 1988.
- WELLER,D.M. & COOK,R.J. Increased growth of wheat by seed treatments with fluorescent pseudomonads and implications of Pythium control. Canadian Journal of Plant Pathology, 8(3): 328-334,1986.

-ZASPEL, I. Studies on the influence of antagonistic rhizosphere bacteria on winter wheat attacked by Gaeumannomyces graminis var. tritici. Bulletin OILB/SROP, 15(1): 142-144, 1992. Apud Review of Plant Pathology, 72(12):273, 1993.