

## Controle biológico de fitopatógenos por *Bacillus subtilis* in vitro

Gaspar Moreira Braga Junior<sup>1\*</sup>, Aloisio Freitas Chagas Junior<sup>2</sup>, Lillian França Borges Chagas<sup>3</sup>, Magno Rodrigues de Carvalho Filho<sup>4</sup>, Luciane de Oliveira Miller<sup>5</sup>, Gil Rodrigues dos Santos<sup>6</sup>

1. Agrônomo e Doutorando em Produção Vegetal (Universidade Federal do Tocantins, Brasil).

2. Agrônomo (Universidade Federal Rural da Amazônia). Doutor em Biotecnologia (Universidade Federal do Amazonas). Professor da Universidade Federal do Tocantins, Brasil.

3. Agrônoma e Doutora em Produção Vegetal (Universidade Federal do Tocantins, Brasil).

4. Biólogo (Faculdade da Terra de Brasília). Doutor em Fitopatologia (Universidade de Brasília, Brasil).

5. Agrônoma e Mestre em Ciências Agrárias (University of Missouri-Columbia, Estados Unidos).

6. Agrônomo (Universidade Federal da Paraíba). Doutor em Fitopatologia (Universidade de Brasília). Professor da Universidade Federal do Tocantins, Brasil.

\*Autor para correspondência: [gasparjr\\_braga@uft.edu.br](mailto:gasparjr_braga@uft.edu.br)

### RESUMO

Considerando as perdas causadas por doenças em diversas culturas, as rizobactérias se apresentam como uma alternativa para manejar esses patógenos. O trabalho teve por finalidade avaliar a potencialidade antagonista de isolados de *Bacillus subtilis* aos fungos fitopatogênicos *Fusarium subglutinans*, *Curvularia lunata* e *Bipolaris* spp.. Foram estudados sete isolados de *B. subtilis* e seus efeitos antagonísticos em fungos fitopatogênicos utilizando quatro métodos: técnica de cultura fúngica sobre cultura antagonista, pareamento direto, pareamento com risco no centro da placa e técnica de círculo. Também foram avaliados os efeitos de metabólitos voláteis e termoestáveis desses isolados. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado através de três repetições. As avaliações foram feitas aos três, seis, nove e doze dias para os quatro métodos e aos seis e doze dias para avaliação de metabólitos voláteis e termoestáveis, onde foram medidos o diâmetro da colônia e calculado a porcentagem de inibição de crescimento (PIC) do patógeno. Os isolados de *B. subtilis* UFTBs 03, UFTBs 05, UFTBs 06 e UFTBs 07 foram eficazes na inibição de crescimento micelial dos fungos patogênicos *F. subglutinans*, *C. lunata* e *Bipolaris* spp. pelos quatro métodos. Os isolados UFTBs 02, UFTBs 03, UFTBs 06 e UFTBs 07 inibiram por metabólitos voláteis o crescimento micelial de *F. subglutinans*. Os isolados UFTBs 01, UFTBs 04, UFTBs 05, UFTBs 06 e UFTBs 07 foram capazes de inibir o crescimento micelial de *F. subglutinans*, *C. lunata* e *Bipolaris* spp. por metabólitos termoestáveis.

**Palavras-chave:** Biocontrole, Rizobactérias, Antagonismo, *Bacillus subtilis*.

## Biological control of plant pathogens by *Bacillus subtilis* in vitro

### ABSTRACT

Considering the losses caused by diseases in many cultures, rhizobacteria present themselves as an alternative for managing these pathogens. The work aimed to evaluate the potential antagonist of *Bacillus subtilis* isolates to pathogenic fungi *Fusarium subglutinans*, *Curvularia lunata* and *Bipolaris* spp. Seven were studied isolates of *B. subtilis* and its antagonistic effect on pathogenic fungi using four methods: fungal culture technique on culture antagonist, direct pairing, pairing with risk in the center of the plate and circle technique. Was also evaluated effect of volatile metabolites and thermostable these isolates. The experimental design was completely randomized with three repetitions. The assessments took the tree, six, nine and twelve day for the four methods and the six and twelve day to evaluate volatile metabolites and thermostable, which were measured the diameter of the colony and calculated the percentage growth inhibition (PGI) of the pathogen. *B. subtilis* isolates UFTBs 03, UFTBs 05, UFTBs 06 and UFTBs 07 were effective in inhibiting mycelial growth of pathogenic fungi *F. subglutinans*, *C. lunata* and *Bipolaris* spp. by four methods. Isolated UFTBs 02, UFTBs 03, UFTBs 06 and UFTBs 07 inhibited by volatile metabolites mycelial crecimiento of *F. subglutinans*. Isolated UFTBs 01, UFTBs 04, UFTBs 05, UFTBs 06 and UFTBs 07 they were able to inhibit the mycelial growth of *F. subglutinans*, *C. lunata* and *Bipolaris* spp. by thermostable metabolites, so considering the antibiosis the mechanism of action.

**Keywords:** Biocontrol; Rhizobacteria; Antagonism; *Bacillus subtilis*.

### Introdução

Os principais cultivos agrícolas no Brasil são constantemente afetados por diversas doenças de importância econômica, que podem ser de origem bacteriana, fúngica, viral ou causada por nematoides. Essas doenças levam a diminuição na produção podendo chegar até a perda total da lavoura, causando assim grandes prejuízos econômicos aos produtores. Dentre as doenças mais preocupantes estão àquelas causadas por fungos que atacam desde o início da cultura até o final do ciclo afetando todas as partes da planta. Entre os fungos causadores de doenças encontram-se o *Fusarium subglutinans*, *Curvularia lunata* e *Bipolaris* spp..

O gênero *Fusarium* compreende um grande grupo heterogêneo de fungos que provoca doenças em diversas plantas, como por exemplo o abacaxizeiro, danificando tanto a qualidade como a quantidade dos seus produtos, sendo, portanto, economicamente prejudicial (MATARESE et al., 2012). O fungo *Fusarium subglutinans* é o agente causador da fusariose no abacaxi, e tem como principal característica a capacidade de infectar frutos e mudas do abacaxizeiro (MATOS et al., 2009).

A *Curvularia lunata* é considerado um patógeno importante em algumas culturas causando danos severos, entre as doenças causadas pelo fungo *C. lunata* se encontra a manchas-das-glumas no arroz. Os sintomas característicos da doença são o apodreci-

mento dos bulbos e as manchas nas hastes e flores (EMBRAPA CLIMA TEMPERADO, 2005).

Fungos do gênero *Bipolaris* atacam uma grande quantidade de espécies vegetais, e são importantes patógenos de sementes. Entre as espécies causadoras de doenças se encontra *Bipolaris oryzae* fungo causador da mancha parda no arroz. A mancha parda ataca o coleóptilo, folhas, bainha, ramificações das panículas, glumelas e grãos (LOBO et al., 2006).

O método mais utilizado para o controle desses fitopatógenos é o químico. Entretanto, o intensivo uso de produtos químicos nas últimas décadas vem criando inúmeros problemas, tais como: resistência microbiana, contaminação ambiental (água, solo, produtor e consumidor) e elevação dos custos de produção. Assim torna-se necessário o desenvolvimento de alternativas de controle desses fitopatógenos. Dentre as alternativas estudadas, atualmente, destaca-se o controle biológico por meio de micro-organismos antagonistas (MOREIRA et al., 2008; SANTOS; SILVA, 2014). A grande diversidade de micro-organismos, bem como, suas relações antagonísticas, é uma alternativa para o controle biológico aplicado.

Muitas pesquisas com bactérias vêm sendo realizadas para elucidar as interações entre antagonista-patógeno-hospedeiro (HALFELD-VIEIRA et al., 2006; RYAN et al., 2008). Entre elas se

encontram as rizobactérias promotoras de crescimento de planta (RPCPs), bactérias que vivem e colonizam a rizosfera, e que promovem crescimento das plantas associadas numa relação não simbiótica (CAMPOS, 2010).

Um dos gêneros de riziobactérias com poder antagonista de maior relevância é o *Bacillus* spp., que se destaca por formar endósporo resistentes a condições adversas e apresentar uma multiplicidade de mecanismos antagônicos, possibilitando dessa forma, a sua longa manutenção e sobrevivência em nichos ecológicos específicos, com grande versatilidade nos mecanismos de ação e inibir as defesas dos fitopatógenos. A espécie *B. subtilis* tem um grande potencial como biocontrole devido a múltiplos entre eles a antibiose (LANNA FILHO et al., 2010).

Tendo em vista as propriedades do *Bacillus subtilis* o presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antagonista *in vitro* de isolados de *B. subtilis* contra os fungos fitopatogênicos *Fusarium subglutinans*, *Curvularia lunata* e *Bipolaris* spp., visando seu emprego e seleção para controle de doenças fúngicas em plantas.

### Material e Métodos

Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Tocantins - UFT, câmpus de Gurupi, durante o período de janeiro a maio de 2015.

Foram utilizados sete isolados de *Bacillus subtilis* da coleção do Laboratório de Microbiologia da UFT, Campu de Gurupi. Esses isolados foram obtidos de solos de cerrado em áreas de cultivos no Estado do Tocantins, e identificados conforme metodologia pela análise do perfil dos ácidos graxos (SASSER, 2001). Os isolados foram mantidos em meio estoque LB (Luria-Bertani) e repicados em meio LB e BDA (Batata-Dextrose-Ágar).

Os fungos *Fusarium subglutinans* e *Curvularia lunata* foram isolados do fruto do abacaxizeiro, cultivadas no estado do Tocantins que apresentavam sintomas das doenças causadas por esses fungos. O isolamento foi através de método de isolamento de fungos fitopatogênicos conforme Alfenas et al. (2016). O fungo *Bipolaris* sp. foi isolado de grãos armazenados de arroz. Todos os fungos fitopatogênicos foram identificados morfolologicamente conforme Barnett e Hunter (1998).

Para o início dos experimentos *in vitro* os patógenos foram mantidos em meio de cultura BDA por sete dias de incubação, em câmara de crescimento tipo BOD sob fotoperíodo de 12 h à temperatura de  $25 \pm 2$  °C (SALGADO et al., 2003).

A atividade antagonista de *Bacillus subtilis* contra os fungos patogênicos *Fusarium subglutinans*, *Curvularia lunata* e *Bipolaris* sp. foi testada utilizando-se quatro métodos. Os sete isolados de *B. subtilis* foram colocados em crescimento em meio líquido LB sobre agitador mecânico tipo shaker com velocidade de 140 rpm à 27 °C durante três dias. Os fungos fitopatogênicos foram colocados em crescimento em meio BDA modificado, conforme Figueiredo et al. (2010).

No primeiro método foi utilizada a técnica de cultura fúngica sobre cultura antagonista. Após três dias de crescimento dos isolados de *B. subtilis*, os inóculos foram plaqueados em meio BDA. Em seguida, discos de 7 mm contendo meio de cultura com colônias de cada fungo fitopatogênico com sete dias de crescimento, foram colocados no centro das placas (FIGUEIREDO et al., 2010).

No segundo método foi utilizada a técnica de cultura pareada. Os fungos fitopatogênicos foram colocados em crescimento em meio BDA e após sete dias de crescimento foi retirado um disco de 7 mm contendo a cultura e colocado à 1,5 cm da borda da placa de petri (90 x 15 mm) contendo meio BDA e na outra extremidade, também a 1,5 cm da borda da placa, foi colocado 3 µL do isolado de *B. subtilis* (MELO; VALARINI, 1995).

No terceiro método foi utilizada a técnica de pareamento com risco no centro da placa conforme descrito por Dennis e Webster (1971) com algumas modificações. Para isso, disco do isolado fungico foi transferido após sete dias de crescimento, com auxílio de um estilete flambado, para placas de Petri, contendo meio de cultura BDA. Sendo cada disco do meio colonizado com o fungo medindo aproximadamente 7,0 mm de diâmetro e colocados nos dois centros de cada metade das placas. Os isolados de *Bacillus* foram inoculados com o auxílio de uma alça de platina, fazendo um risco no centro da placa. Para o controle negativo (testemunha) foram colocados dois discos com crescimento micelial do fungo patogênico, um em cada extremidade da placa com meio BDA, e não foi feito o risco no centro da placa com a cultura antagonista.

No quarto método foi utilizada a técnica de círculo, transferindo asepticamente para o centro da placa de petri um disco de 7,0 mm de diâmetro com crescimento micelial dos fitopatógenos. Em seguida inoculou-se a bactéria, na mesma placa formando um círculo com diâmetro de aproximadamente de 4 cm, em torno do disco do patógeno. Para o tratamento controle ou testemunha foi utilizado somente fitopatógeno cultivado em meio BDA (MARIANO, 1993).

Todos os experimentos foram realizados em triplicatas. Após os procedimentos as placas foram incubadas em câmara de crescimento tipo BOD sob fotoperíodo de 12 horas à temperatura de  $25 \pm 2$  °C (SALGADO et al., 2003). As leituras foram feitas no terceiro, sexto, nono e décimo segundo dia após as sementeiras. Para a avaliação foram efetuadas medições do diâmetro das colônias, em três sentidos diametralmente opostos, com auxílio de um paquímetro, definindo-se uma média para cada colônia.

A percentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) foi calculada pela fórmula de Menten et al. (1976), onde:  $PIC = [(diâmetro\ médio\ do\ controle - diâmetro\ médio\ do\ tratamento) / diâmetro\ médio\ do\ controle] \times 100$ . Os tratamentos onde não obtiveram inibição de crescimento receberam valor igual a zero.

Para a avaliação da produção de metabólitos termoestáveis mediados por *B. subtilis* foi utilizado o método para detecção qualitativa de antibióticos, conforme Lima et al. (2014) adaptado de Kupper et al. (2003). Foram preparadas alíquotas de 200 ml de meio LB líquido em Erlenmeyer e colocados discos de meio LB contendo a cultura dos isolados de *B. subtilis*, com sete dias de crescimento. Os frascos permaneceram durante 15 dias, sem agitação. Após esse período, foram adicionadas 4 g de Ágar em cada frasco, e estes autoclavados por 40 minutos, e o caldo agarizado foi vertido em placas de Petri. No centro das placas foram colocados discos de 7 mm da cultura de *Fusarium subglutinans*, *Curvularia lunata* e *Bipolaris* sp., em seguida incubados em câmara de crescimento tipo BOD sob fotoperíodo de 12 h à temperatura de  $25 \pm 2$  °C. As avaliações se deram ao sexto e ao décimo segundo dia, medindo-se em três sentidos diametralmente opostos com auxílio de um paquímetro, definindo-se uma média para cada colônia. Os diâmetros das colônias do patógeno foram comparados com o controle negativo (testemunha), cujo patógeno se desenvolveu em meio BDA, sem a presença do caldo agarizado autoclavado.

A percentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) foi calculada, também, pela fórmula de Menten et al. (1976). Para o tratamento controle ou testemunha foi utilizado somente fitopatógeno cultivado em meio BDA (MARIANO, 1993).

Para a avaliação de metabólitos voláteis utilizou-se a metodologia modificada semelhante à apresentada por Barnett e Hunter (1998). Foram utilizadas placas de petri divididas ao meio onde foi vertido meio BDA. Em um lado da placa foi colocado disco de micélio de 7 mm de diâmetro do fungo patogênico, e no outro lado disco de 7 mm de diâmetro com a cultura antagonista dos isolados de *B. subtilis*. Em seguida, as placas foram incubadas em

câmara de crescimento tipo BOD sob fotoperíodo de 12 h à temperatura de 25 ± 2 °C. As avaliações foram realizadas ao sexto e décimo segundo dia, medindo-se em três sentidos diametralmente opostos com auxílio de um paquímetro, definindo-se uma média para cada colônia. A percentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) foi calculada, também, pela fórmula de Menten et al. (1976).

Para todos os experimentos foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado com 3 repetições e os dados analisados pelo teste de Duncan a 5% probabilidade (SILVA, 2008).

## Resultados e Discussão

No experimento onde se avaliou o efeito antagonista dos sete isolados de *Bacillus subtilis* pelos quatro métodos contra fungo fitopatogênico *Fusarium subglutinans*, alguns isolados mostraram efeito inibidor no crescimento micelial do fungo (Tabela 1). No

primeiro método utilizou-se a técnica de cultura fúngica sobre cultura antagonista, e dos isolados testados quatro deles (UFTBs 03, UFTBs 05, UFTBs 06 e UFTBs 07) foram superiores (p<0,05) ao controle a partir do nono dia de incubação, chegando a uma percentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) de 62,7% pelo isolado UFTBs 06. No segundo método, pareamento direto, o isolado UFTBs 03 foi superior (p<0,05) à testemunha ao inibir o crescimento micelial do fungo a partir do sexto dia de crescimento, chegando a 53,4% de PIC. No terceiro método, técnica de pareamento com risco no centro da placa, ao décimo segundo dia os isolados UFTBs 03, UFTBs 04, UFTBs 05, UFTBs 06 e UFTBs 07 foram superiores (p<0,05) a testemunha, inibindo o crescimento micelial do patógeno (Tabela 1), com PIC variando de 22,2 a 55%. No quarto método, técnica de círculo, o isolado UFTBs 03, UFTBs 06 e UFTBs 07 foram superiores (p<0,05) a testemunha no décimo segundo dia de incubação, com PIC variando de 23,8 a 47,6%.

**Tabela 1.** Inibição do crescimento micelial de *Fusarium subglutinans* por *Bacillus subtilis*.<sup>1</sup> / **Table 1.** Inhibition of mycelial growth of *Fusarium subglutinans* by *Bacillus subtilis*.

Tratamento	3 dias de incubação		6 dias de incubação		9 dias de incubação		12 dias de incubação	
	Ø <sup>(2)</sup> colônia (mm)	PIC <sup>(3)</sup> (%)	Ø colônia (mm)	PIC (%)	Ø colônia (mm)	PIC (%)	Ø colônia (mm)	PIC (%)
<b>Método 1</b>								
UFTBs 01	37,1 a	0,0	65,0 a	0,0	70,0 a	0,0	70,0 a	0,0
UFTBs 02	35,5 a	0,0	65,0 a	0,0	70,0 a	0,0	70,0 a	0,0
UFTBs 03	13,9 bc	46,9	17,4 c	54,9	20,7 d	57,8	34,3 d	37,7
UFTBs 04	22,3 bc	15,3	29,8 bc	29,3	44,6 bc	9,2	47,1 bc	14,4
UFTBs 05	11,6 c	55,8	25,8 bc	33,0	20,7 d	57,8	22,6 e	58,9
UFTBs 06	14,9 bc	43,1	14,0 c	63,6	19,0 d	61,2	20,5 e	62,7
UFTBs 07	16,2 bc	38,4	24,0 bc	37,7	36,2 c	26,4	42,1 cd	23,5
Testemunha	26,3 ab		38,6 b		49,2 b		55,1 b	
CV(%)	30,5		30,5		15,5		14,5	
<b>Método 2</b>								
UFTBs 01	19,8 ab	24,5	65,0 a	0,0	65,0 a	0,0	65,0 a	0,0
UFTBs 02	36,4 a	0,0	65,0 a	0,0	63,0 a	0,0	65,0 a	0,0
UFTBs 03	17,6 b	33,0	18,0 c	53,4	26,9 b	45,2	34,2 b	37,9
UFTBs 04	23,9 ab	9,0	29,8 bc	22,7	53,3 a	0,0	55,0 a	0,1
UFTBs 05	29,0 ab	0,0	29,8 bc	22,7	52,9 a	0,0	50,2 a	8,7
UFTBs 06	32,9 ab	39,3	16,0 c	58,5	55,8 a	0,0	55,6 a	0,0
UFTBs 07	35,4 ab	3,4	25,0 bc	35,1	53,0 a	0,0	55,3 a	3,2
Testemunha	26,3 ab		38,6 b		49,2 a		55,1 a	
CV(%)	33,1		30,5		17,8		15,0	
<b>Método 3</b>								
UFTBs 01	27,4 ab	0,0	39,1 ab	0,0	46,8 ab	4,8	48,6 ab	11,6
UFTBs 02	35,4 a	0,0	48,8 a	0,0	51,1 a	0,0	52,2 a	5,2
UFTBs 03	21,7 b	17,4	25,2 b	34,5	31,6 c	35,7	33,3 de	39,5
UFTBs 04	32,6 ab	0,0	38,4 ab	0,5	39,6 ab	19,4	42,8 bc	22,2
UFTBs 05	22,9 ab	12,9	25,5 b	33,8	28,4 c	42,2	24,7 e	55,0
UFTBs 06	27,2 ab	0,0	31,4 ab	18,6	33,7 c	31,4	33,9 cd	38,3
UFTBs 07	25,8 ab	1,7	38,0 ab	1,6	36,0 bc	26,7	35,5 cd	35,4
Testemunha	26,3 ab		38,6 ab		49,2 a		55,1 a	
CV(%)	25,5		27,0		16,4		12,5	
<b>Método 4</b>								
UFTBs 01	25,3 ab	3,9	59,6 a	0,0	65,6 a	0,0	64,1 a	0,0
UFTBs 02	31,6 a	0,0	58,3 a	0,0	63,6 a	0,0	63,0 ab	0,0
UFTBs 03	19,7 ab	24,9	29,8 b	22,7	37,5 bc	23,7	41,9 cd	23,8
UFTBs 04	28,9 ab	0,0	59,9 a	0,0	63,2 a	0,0	62,5 ab	0,0
UFTBs 05	18,5 ab	29,7	30,5 b	21,0	37,8 bc	23,0	46,7 bc	15,1
UFTBs 06	12,1 b	53,8	19,5 b	49,5	21,0 c	57,3	28,8 d	47,6
UFTBs 07	15,5 ab	41,0	21,6 b	43,9	34,0 bc	29,6	40,6 cd	26,2
Testemunha	26,3 ab		38,6 ab		49,2 ab		53,1 ab	
CV(%)	43,9		35,3		24,0		17,9	

<sup>1</sup> Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade. <sup>2</sup> Ø = Diâmetro da colônia. <sup>3</sup> PIC = Percentagem de inibição do crescimento micelial. Método 1: técnica de cultura fúngica sobre cultura antagonista; Método 2: técnica de pareamento direto; Método 3: técnica de pareamento com risco no centro da placa; Método 4: técnica de círculo.

Os isolados de *B. subtilis* podem ter atuado de diferentes formas e mecanismos para inibir o patógeno *Fusarium subglutinans*, com a produção de compostos voláteis, produção de antibióticos/antifúngicos e competição, podendo agir de forma isolada ou com todos esses mecanismos. Lima et al. (2014) avaliando o efeito

antagonista 10 isolados de *Bacillus* spp. sobre *Fusarium oxysporum* agente causador da fusariose no tomateiro, utilizando a técnica de círculo, observaram que todos isolados apresentaram efeito inibidor ao patógeno avaliado.

No experimento para avaliação do efeito antagonista dos iso-

lados de *B. subtilis* sobre o fungo patogênico *Bipolaris* spp., no primeiro método no terceiro dia de incubação todos os isolados inibiram o crescimento do patógeno superior ( $p < 0,05$ ) ao controle. A partir do sexto dia os isolados que inibiram o crescimento do *Bipolaris* spp. foram UFTBs 03, UFTBs 05, UFTBs 06 e UFTBs 07

(Tabela 2), chegando a um PIC de 78,6%. No segundo método, no terceiro dia de incubação, todos os tratamentos foram superiores ( $p < 0,05$ ) a testemunha (Tabela 2). A partir do sexto dia os isolados UFTBs 03, UFTBs 05, UFTBs 06 e UFTBs 07 foram superiores ( $p < 0,05$ ) a testemunha, chegando a 26,7% de PIC.

**Tabela 2.** Inibição do crescimento micelial de *Bipolaris* sp. por *Bacillus subtilis*.<sup>1</sup> / **Table 2.** Inhibition of mycelial growth of *Bipolaris* sp. by *Bacillus subtilis*.

Tratamento	3 dias de incubação		6 dias de incubação		9 dias de incubação		12 dias de incubação	
	Ø <sup>(2)</sup> colônia (mm)	PIC <sup>(3)</sup> (%)	Ø colônia (mm)	PIC(%)	Ø colônia (mm)	PIC(%)	Ø colônia (mm)	PIC(%)
<b>Método 1</b>								
UFTBs 01	29,1 b	24,4	50,7 a	4,7	56,6 a	14,1	62,9 a	3,8
UFTBs 02	30,8 b	19,9	55,1 a	0,0	62,9 a	4,5	63,9 a	5,2
UFTBs 03	12,8 d	66,6	12,9 b	75,6	14,8 b	77,5	14,9 b	77,8
UFTBs 04	29,1 b	24,4	52,0 a	2,2	57,2 a	13,2	66,4 a	1,6
UFTBs 05	12,7 d	66,8	13,06 b	75,4	15,4 b	76,6	14,4 b	78,6
UFTBs 06	17,3 c	55,0	16,5 b	68,9	18,4 b	72,0	18,9 b	71,9
UFTBs 07	12,3 d	68,0	12,7 b	76,0	15,8 b	75,9	15,5 b	77,0
Testemunha	38,5 a		53,2 a		65,9 a		67,5 a	
CV(%)	6,9		18,0		17,9		9,3	
<b>Método 2</b>								
UFTBs 01	31,6 bc	17,9	49,1 ab	7,8	57,2 ab	13,0	66,6 a	1,4
UFTBs 02	30,3 bc	21,3	43,9 b	17,5	50,5 b	23,2	59,3 ab	12,3
UFTBs 03	28,9 c	24,8	43,1 b	18,9	49,7 b	24,4	55,6 b	17,7
UFTBs 04	30,6 bc	19,9	45,6 b	14,3	57,8 ab	12,1	67,2 a	0,6
UFTBs 05	33,1 b	13,9	43,9 b	17,4	48,2 b	26,7	50,6 b	25,1
UFTBs 06	31,6 bc	17,8	46,1 b	13,3	51,8 b	21,2	54,7 b	19,0
UFTBs 07	28,3 c	26,5	42,5 b	20,1	48,4 b	26,4	50,6 b	25,1
Testemunha	38,5 a		53,2 a		65,8 a		67,6 a	
CV(%)	5,9		7,4		10,5		9,0	
<b>Método 3</b>								
UFTBs 01	34,3 ab	10,9	40,2 b	24,4	49,8 b	24,2	54,9 b	18,7
UFTBs 02	30,9 bc	19,7	41,3 b	22,4	49,8 b	24,2	55,5 b	17,9
UFTBs 03	18,5 e	51,9	26,9 c	49,3	29,2 cd	55,5	30,3 d	55,1
UFTBs 04	36,2 a	5,9	39,4 b	25,8	45,7 b	30,5	55,4 b	17,9
UFTBs 05	22,6 de	41,2	27,6 c	48,1	26,3 d	60,0	31,2 d	53,7
UFTBs 06	23,5 de	38,9	31,1 c	41,5	32,4 cd	50,7	38,2 cd	43,4
UFTBs 07	27,4 cd	28,6	31,1 c	41,4	35,1 c	46,6	39,4 c	41,7
Testemunha	38,5 a		53,2 a		65,8 a		67,6 a	
CV(%)	9,4		12,2		9,8		9,4	
<b>Método 4</b>								
UFTBs 01	44,9 b	0,0	60,6 a	0,0	66,0 a	0,0	66,8 a	1,1
UFTBs 02	40,4 c	0,0	59,5 a	0,0	66,0 a	0,0	67,3 a	0,4
UFTBs 03	9,9 e	74,1	70,7 d	79,7	12,1 c	81,5	12,3 c	81,8
UFTBs 04	48,4 a	0,0	58,4 ab	0,0	65,6 a	0,3	66,9 a	0,9
UFTBs 05	12,1 de	68,5	14,8 cd	72,0	12,9 b	80,3	15,5 b	77,0
UFTBs 06	13,9 d	63,7	16,4 c	69,1	16,9 b	74,2	16,9 b	75,4
UFTBs 07	9,7 e	74,6	11,2 cd	78,9	12,4 b	81,1	13,0 c	80,7
Testemunha	38,5 c		53,2 b		65,8 a		67,6 a	
CV(%)	5,9		8,4		4,7		2,3	

<sup>1</sup>Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade. <sup>2</sup>Ø = Diâmetro da colônia. <sup>3</sup>PIC = Percentagem de inibição do crescimento micelial. Método 1: técnica de cultura fúngica sobre cultura antagonista; Método 2: técnica de pareamento direto; Método 3: técnica de pareamento com risco no centro da placa; Método 4: técnica de círculo.

No terceiro método, com exceção dos isolados UFTBs 01 e UFTBs 04 no terceiro dia de incubação, os demais isolados testados inibiram o crescimento do patógeno ( $p < 0,05$ ), chegando a 55,5% de PIC pelo isolado UFTBs 03 no nono dia de incubação (Tabela 2). Pelo quarto método os isolados UFTBs 03, UFTBs 05, UFTBs 06, UFTBs 07 foram capazes de inibir o crescimento micelial do patógeno superior ( $p < 0,05$ ) a testemunha em todos os dias avaliados, chegando a um PIC de 81,8% pelo isolado UFTBs 03.

Os mecanismos pelos quais esses isolados podem ter inibido o crescimento micelial do *Bipolaris* sp., são os mesmos que foram citados anteriormente para o *F. subglutinans*, entre eles o mais frequente. Segundo Kupper et al. (2003) os micro-organismos que agem por antibiose possuem um grande espectro de ação, de forma que ao inibir fungos patogênicos a produção de substâncias tóxicas é mais efetiva do que qualquer outro mecanismo de ação. Isolados de *B. subtilis* tem capacidade de produzir uma grande

gama de metabólitos antifúngicos, entre os quais se encontram lipopeptídeos das famílias da surfactina, iturina e fengicina (LANNA FILHO et al., 2010). Quando o isolado bacteriano entra em contato com o patógeno, pode ocorrer a produção de antibióticos ou a competição por espaço e nutrientes. Pascoal e Aguiar (2014) em seu trabalho isolaram e identificaram 54 bactérias endofíticas do arroz como sendo a maioria do gênero *Bacillus* spp., onde foram testadas utilizando a técnica de pareamento direto contra o fungo fitopatogênico *Bipolares* spp., no qual seis isolados tiveram ação antagonica contra patógenos desse gênero.

Na avaliação de *B. subtilis* em relação ao fungo *Curvularia lunata* utilizando o primeiro método, ao terceiro dia de crescimento todos os isolados inibiram o crescimento do patógeno. Aos doze dias de incubação os isolados que foram capazes de inibir o crescimento do patógeno foram os isolados UFTBs 03, UFTBs 05, UFTBs 06 e UFTBs 07 (Tabela 3), com um PIC variando de 15,2 a 85,5%.

No segundo método, no terceiro dia de incubação, todos os isolados foram superiores ( $p < 0,05$ ) a testemunha. E aos doze dias os isolados UFTBs 03, UFTBs 05, UFTBs 06 e UFTBs 07 foram

superiores ( $p < 0,05$ ) a testemunha e aos outros isolados ao inibir o crescimento micelial do patógeno (Tabela 3), chegando a um PIC de 43,3%.

**Tabela 3.** Inibição do crescimento micelial de *Curvularia lunata* por *Bacillus subtilis*.<sup>1</sup> / **Table 3.** Inhibition of mycelial growth of *Curvularia lunata* by *Bacillus subtilis*.

Tratamento	3 dias de incubação		6 dias de incubação		9 dias de incubação		12 dias de incubação	
	Ø <sup>(2)</sup> colônia (mm)	PIC <sup>(3)</sup> (%)	Ø colônia (mm)	PIC(%)	Ø colônia (mm)	PIC(%)	Ø colônia (mm)	PIC(%)
<b>Método 1</b>								
UFTBs 01	26,5 b	31,1	64,9 b	13,9	71,5 ab	8,2	77,0 a	2,1
UFTBs 02	23,1 b	40,0	58,8 bc	22,1	69,4 b	10,9	75,7 a	3,8
UFTBs 03	12,1 c	68,4	10,8 d	85,6	13,8 d	82,2	14,3 c	81,8
UFTBs 04	27,9 b	27,4	73,8 a	2,6	75,6 ab	2,9	76,6 a	2,6
UFTBs 05	8,7 c	77,2	9,7 d	87,1	10,2 d	86,9	11,4 c	85,5
UFTBs 06	25,6 b	33,4	52,4 c	30,5	59,0 c	24,2	66,7 b	15,2
UFTBs 07	11,9 c	69,0	13,2 d	82,5	16,8 d	78,3	13,4 c	82,9
Testemunha	38,5 a		75,5 a		77,9 a		78,7 a	
CV(%)	13,8		11,1		8,9		7,1	
<b>Método 2</b>								
UFTBs 01	31,6 b	17,9	58,8 bc	22,0	61,4 abc	21,2	73,8 a	6,1
UFTBs 02	31,9 b	17,0	68,7 ab	8,9	71,3 a	8,5	75,8 a	3,6
UFTBs 03	26,4 c	31,4	47,1 cd	37,6	44,5 c	42,9	54,7 bc	30,4
UFTBs 04	31,4 b	18,4	56,0 c	25,7	65,5 ab	15,9	72,4 a	8,0
UFTBs 05	31,5 b	18,2	55,3 c	26,7	51,4 bc	34,0	60,3 b	23,3
UFTBs 06	25,3 c	34,3	49,5 cd	34,4	51,8 bc	33,4	50,8 bc	35,4
UFTBs 07	27,3 c	29,1	40,3 d	46,6	42,7 c	45,3	44,6 c	43,3
Testemunha	38,5 a		75,5 a		77,9 a		78,7 a	
CV(%)	6,9		11,3		11,7		9,6	
<b>Método 3</b>								
UFTBs 01	51,5 a	0,0	51,6 b	31,6	53,7 b	31,1	59,9 b	23,8
UFTBs 02	48,2 ab	0,0	48,2 bc	35,7	51,5 b	33,9	61,7 b	21,5
UFTBs 03	36,0 d	6,4	34,4 d	48,9	34,6 c	55,5	39,8 c	49,4
UFTBs 04	47,7 ab	0,0	47,7 bc	36,7	51,6 b	33,8	65,3 b	16,9
UFTBs 05	39,7 bc	0,0	39,4 cd	47,7	36,9 c	52,6	41,8 c	46,8
UFTBs 06	38,6 cd	0,0	38,6 cd	48,8	39,2 c	49,6	41,8 c	43,0
UFTBs 07	37,9 d	1,4	37,9 cd	49,7	38,7 c	50,9	40,4 c	48,6
Testemunha	38,5 cd		75,5 a		77,9 a		78,7 a	
CV(%)	12,0		11,9		12,0		11,9	
<b>Método 4</b>								
UFTBs 01	42,3 ab	0,0	62,8 b	16,8	72,8 a	6,5	75,5 ab	4,0
UFTBs 02	44,3 a	0,0	60,3 b	20,1	75,6 a	2,9	74,4 ab	5,4
UFTBs 03	8,0 c	79,2	9,3 c	87,6	12,7 b	83,6	12,5 c	84,0
UFTBs 04	44,8 a	0,0	63,6 b	15,7	72,3 a	7,2	73,0 b	7,2
UFTBs 05	7,5 c	80,4	7,3 c	90,2	8,1 b	89,6	8,3 c	89,4
UFTBs 06	9,7 c	74,6	10,9 c	85,4	12,0 b	84,5	11,6 c	85,1
UFTBs 07	7,8 c	79,6	8,5 c	88,7	11,8 b	84,7	10,0 c	87,2
Testemunha	38,5 b		75,5 a		77,9 a		78,7 a	
CV(%)	11,5		13,4		7,3		6,2	

<sup>1</sup> Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade. <sup>2</sup> Ø = Diâmetro da colônia. <sup>3</sup> PIC = Percentagem de inibição do crescimento micelial. Método 1: técnica de cultura fúngica sobre cultura antagonista; Método 2: técnica de pareamento direto; Método 3: técnica de pareamento com risco no centro da placa; Método 4: técnica de círculo.

No terceiro método todos isolados inibiram o crescimento do patógeno e se diferiram ( $p < 0,05$ ) da testemunha (Tabela 3), com um PIC chegando a 55,5% a partir do sexto dia de incubação. Pelo quarto método, os isolados que foram antagonísticos ao patógeno evitando o seu crescimento até os doze dias de incubação foram UFTBs 03, UFTBs 05, UFTBs 06 e UFTBs 07, apresentando um PIC de 74,6 a 90,2% (Tabela 3).

As bactérias do gênero *Bacillus* possuem a característica de produzir enzimas hidrolíticas, que degradam os componentes da parede celular de outros micro-organismos, o que pode lhe dar a característica de micoparasitismo (ZAGO et al., 2000). Basha e Ulaganathan (2002) em seu trabalho utilizaram a cepa de *Bacillus* sp. BC121 que foi isolada da rizosfera do sorgo, onde esse isolado apresentou alta atividade antagonística contra *Curvularia lunata*, sendo observado por microscopia eletrônica de varredura a degradação da parede celular da célula fúngica do patógeno, inibindo o crescimento da *Curvularia lunata* até 60%, ainda constatou em teste a capacidade do isolado em secretar

quitinase.

A maioria dos microrganismos envolvidos no controle biológico atua por antibiose, onde um metabolito produzido por um deles tem efeito prejudicial sobre o outro. Podendo ter contato físico ou não entre esses microrganismos, a produção desses metabólitos pode resultar na lise e dissolução da estrutura celular. Diversas espécies de *Bacillus* incluindo a *subtilis* são citadas como produtoras de antibióticos, podendo secretar metabólitos como enzimas amilolíticas e proteolíticas (BETTIOL; GHINI, 1995).

Ao avaliar a capacidade dos isolados em produzir metabólitos voláteis aos doze dias de incubação contra o fungo fitopatogênico *F. subglutinans* os isolados UFTBs 02, UFTBs 03, UFTBs 06 e UFTBs 07 inibiram o crescimento do patógeno diferindo ( $p < 0,05$ ) da testemunha. Destaque para os isolados UFTBs 06 e UFTBs 07 que inibiram o crescimento do *F. subglutinans* em 55,8% e 52,8% respectivamente. Para o fungo fitopatogênico *C. lunata* o isolado UFTBs 07 foi capaz de inibir o seu crescimento

por metabólitos voláteis, diferindo ( $p < 0,05$ ) da testemunha, com PIC de 47,7%. Para *Bipolaris* sp. apenas o isolado UFTBs 05 foi capaz de inibir o crescimento do fungo e diferir ( $p < 0,05$ ) da testemunha, por metabólitos voláteis, com PIC de 60,1% (Tabela 4). Chen et al. (2008) identificaram 14 compostos voláteis antifúngicos a partir de *Bacillus subtilis* que inibiram o desenvolvimento de *Botrytis cinerea*, agente causal do mofo cinzento em frutas e vegetais.

**Tabela 4.** Efeito de metabólitos voláteis de *Bacillus subtilis* no crescimento micelial de *Fusarium subglutinans*, *Curvularia lunata* e *Bipolaris* sp.<sup>1</sup>/ **Table 4.** Volatile metabolites effect of *Bacillus subtilis* on mycelial growth of *Fusarium subglutinans*, *Curvularia lunata* and *Bipolaris* sp.

Tratamentos	6 dias de incubação		12 dias de incubação	
	Ø <sup>(2)</sup> colônia (mm)	PIC <sup>(3)</sup> (%)	Ø colônia (mm)	PIC (%)
<b><i>Fusarium subglutinans</i></b>				
UFTBs 01	46,5 ab	8,8	56,9 a	0,0
UFTBs 02	25,6 c	41,6	43,9 cd	21,5
UFTBs 03	36,7 b	27,9	41,3 d	26,3
UFTBs 04	43,2 ab	15,2	50,8 ab	9,2
UFTBs 05	44,5 ab	12,6	47,9 bc	14,4
UFTBs 06	11,1 d	78,2	24,7 e	55,8
UFTBs 07	11,7 d	76,9	26,4 e	52,8
Testemunha	51,0 a		56,0 ab	
CV (%)	16,5		11,0	
<b><i>Curvularia lunata</i></b>				
UFTBs 01	53,9 a	0,0	57,4 a	7,5
UFTBs 02	46,1 ab	7,9	53,5 a	13,8
UFTBs 03	49,9 a	0,1	59,0 a	5,1
UFTBs 04	52,6 a	5,1	60,4 a	2,7
UFTBs 05	48,5 ab	3,0	60,2 a	3,5
UFTBs 06	45,4 ab	9,3	48,8 ab	21,3
UFTBs 07	34,3 b	31,4	32,4 b	47,7
Testemunha	50,0 a		62,1 a	
CV (%)	16,2		19,3	
<b><i>Bipolaris</i> spp.</b>				
UFTBs 01	54,0 a	0,0	59,4 a	3,0
UFTBs 02	53,2 a	0,0	61,7 a	0,0
UFTBs 03	46,0 ab	0,3	53,9 a	12,0
UFTBs 04	51,1 ab	0,0	61,6 a	0,0
UFTBs 05	27,5 c	40,4	24,4 b	60,1
UFTBs 06	41,8 b	9,5	45,8 a	25,1
UFTBs 07	47,0 ab	0,0	41,6 ab	32,0
Testemunha	46,2 ab		61,3 a	
CV (%)	12,4		21,3	

<sup>1</sup> Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade. <sup>2</sup> Ø = Diâmetro da colônia. <sup>3</sup> PIC = Percentagem de inibição do crescimento micelial.

No estudo da inibição do crescimento micelial de *F. subglutinans*, *C. lunata* e *Bipolaris* spp., pelos metabólitos com atividade antimicrobiana secretados em caldo agarizado por sete isolados de *Bacillus subtilis*, os isolados UFTBs 01, UFTBs 03, UFTBs 04, UFTBs 05, UFTBs 06 e UFTBs 07 diferiram ( $p < 0,05$ ) da testemunha ao décimo segundo dia de incubação (Tabela 5 e Figura 1). O isolado UFTBs 06 mostrou que seus produtos antibióticos foram capazes

de inibir o crescimento micelial de *F. subglutinans*, *C. lunata* e *Bipolaris* sp. em 53,4, 78,5 e 82,7%, respectivamente, sendo o isolado que proporcionou maior inibição em todos patógenos.

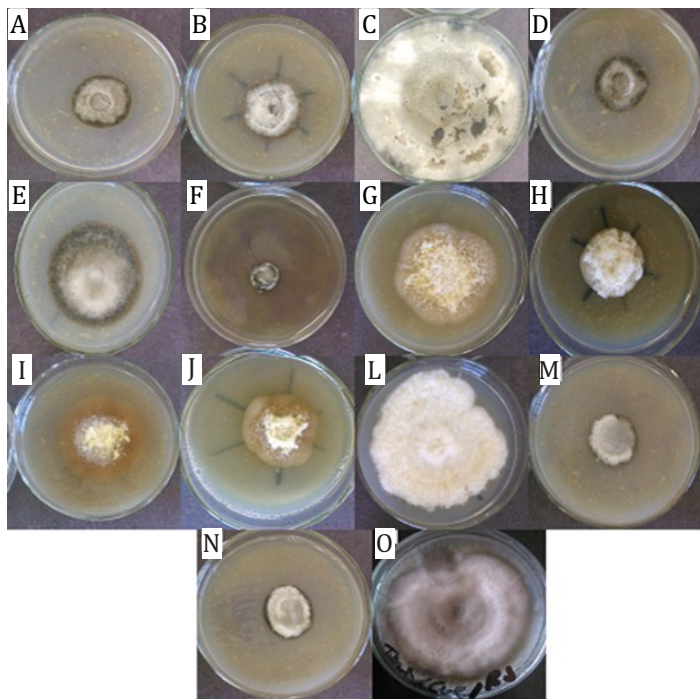
**Tabela 5.** Efeito de metabólitos termoestáveis de *Bacillus subtilis* no crescimento micelial de *Fusarium subglutinans*, *Curvularia lunata* e *Bipolaris* sp.<sup>1</sup>/ **Table 5.** Thermostable metabolites effect of *Bacillus subtilis* on mycelial growth of *Fusarium subglutinans*, *Curvularia lunata* and *Bipolaris* sp.

Tratamentos	6 dias de incubação		12 dias de incubação	
	Ø <sup>(2)</sup> colônia (mm)	PIC <sup>(3)</sup> (%)	Ø colônia (mm)	PIC (%)
<b><i>Fusarium subglutinans</i></b>				
UFTBs 01	16,9 cd	47,8	47,6 b	22,6
UFTBs 02	44,2 a	0,0	61,1 a	0,6
UFTBs 03	26,6 bc	18,1	52,5 a	14,6
UFTBs 04	11,3 d	65,2	28,8 d	53,1
UFTBs 05	14,6 cd	55,0	42,4 c	31,0
UFTBs 06	11,1 d	65,8	28,6 d	53,4
UFTBs 07	16,7 cd	48,5	41,7 c	32,1
Testemunha	32,5 ab		61,5 a	
CV (%)	30,9		6,4	
<b><i>Curvularia lunata</i></b>				
UFTBs 01	23,2 bc	57,7	27,5 c	58,9
UFTBs 02	61,6 a	0,0	66,2 a	1,2
UFTBs 03	29,8 b	45,5	46,9 b	29,9
UFTBs 04	13,7 c	74,9	19,8 cd	70,3
UFTBs 05	12,3 c	77,5	23,4 c	65,0
UFTBs 06	9,5 c	82,6	14,4 d	78,5
UFTBs 07	13,8 c	74,7	22,8 c	65,9
Testemunha	54,8 a		67,0 a	
CV (%)	31,1		12,0	
<b><i>Bipolaris</i> spp.</b>				
UFTBs 01	13,5 bc	76,5	27,9 c	58,5
UFTBs 02	62,1 a	0,0	67,0 a	0,6
UFTBs 03	17,7 b	69,2	50,2 b	25,5
UFTBs 04	12,0 c	79,1	18,1 e	73,0
UFTBs 05	12,5 c	78,3	21,9 de	67,4
UFTBs 06	10,2 c	82,2	11,6 f	82,7
UFTBs 07	12,7 c	77,8	24,9 cd	63,0
Testemunha	57,7 a		67,5 a	
CV (%)	10,5		7,7	

<sup>1</sup> Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade. <sup>2</sup> Ø = Diâmetro da colônia. <sup>3</sup> PIC = Percentagem de inibição do crescimento micelial.

Esses resultados mostram que os metabólitos com atividade antimicrobiana presentes no caldo agarizado autoclavado são termoestáveis, ou seja, resistem a altas temperaturas sem perder as características antifúngicas e seu modo de antagonismo a outros microrganismos. Fuga (2013) em seu trabalho verificou que todos os isolados de *Bacillus* spp. testados inibiram o crescimento de *Sclerotium cepivorum*, o que revela que os metabólitos produzidos se mostraram termoestáveis e mantiveram suas atividades mesmo após a autoclavagem.

Os resultados obtidos também demonstram o potencial dos isolados de *B. subtilis* no controle biológico de fungos patogênicos de plantas, como o *Fusarium subglutinans*, *Bipolaris* spp. e *Curvularia lunata*.



**Figura 1.** Atividade antagonista *in vitro* de *B. subtilis* contra os fungos patogênicos *Fusarium subglutinans*, *Bipolaris* spp. e *Curvularia lunata*, pela produção de metabólitos termostáveis. (A) *Bipolaris* spp. e UFTBs 07; (B) *Bipolaris* spp. e UFTBs 01; (C) *Bipolaris* spp. e testemunha; (D) *Bipolaris* spp. e UFTBs 05; (E) *Bipolaris* spp. e UFTBs 03; (F) *Bipolaris* spp. e UFTBs 06; (G) *F. subglutinans* e UFTBs 07; (H) *F. subglutinans* e UFTBs 06; (I) *F. subglutinans* e UFTBs 05; (J) *F. subglutinans* e UFTBs 03; (L) *F. subglutinans* e testemunha; (M) *C. lunata* e UFTBs 07; (N) *C. lunata* e UFTBs 05; (O) *C. lunata* e testemunha. / **Figure 1.** Antagonistic activity *in vitro* of *B. subtilis* against pathogenic fungi *Fusarium subglutinans*, *Bipolaris* sp. and *Curvularia lunata*, for producing thermostable metabolites. (A) *Bipolaris* sp. and UFTBs 07; (B) *Bipolaris* sp. and UFTBs 01; (C) *Bipolaris* sp. and control; (D) *Bipolaris* sp. and UFTBs 05; (E) *Bipolaris* sp. and UFTBs 03; (F) *Bipolaris* sp. and UFTBs 06; (G) *F. subglutinans* and UFTBs 07; (H) *F. subglutinans* and UFTBs 06; (I) *F. subglutinans* and UFTBs 05; (J) *F. subglutinans* and UFTBs 03; (L) *F. subglutinans* and control; (M) *C. lunata* and UFTBs 07; (N) *C. lunata* and UFTBs 05; (O) *C. lunata* and control.

## Conclusões

Os isolados de *Bacillus subtilis* UFTBs 03, UFTBs 05, UFTBs 06, UFTBs 07 foram eficazes na inibição de crescimento micelial dos fungos patogênicos *Fusarium subglutinans*, *Curvularia lunata* e *Bipolaris* quando avaliados pelos métodos de círculo e o de cultura fúngica sobre cultura antagonista os que tiveram maior porcentagem de inibição de crescimento micelial.

Quanto a capacidade dos isolados em inibir o crescimento micelial dos patógenos pela produção de metabólitos voláteis os isolados UFTBs 02, UFTBs 03, UFTBs 06 e UFTBs 07 foram capazes de inibir apenas o crescimento do patógeno *Fusarium subglutinans*. Apenas o isolado UFTBs 07 foi capaz de inibir *Curvularia lunata*, e o isolado UFTBs 05 foi capaz de inibir o crescimento do fungo *Bipolaris*.

Os isolados UFTBs 01, UFTBs 04, UFTBs 05, UFTBs 06 e UFTBs 07 foram capazes de inibir o crescimento micelial do *Fusarium subglutinans*, *Curvularia lunata* e *Bipolaris* sp. por metabólitos termostáveis, sendo a antibiose seu principal mecanismo de ação.

## Referências Bibliográficas

ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. 2016. **Métodos em Fitopatologia**. 2 ed. UFV. Viçosa. Ed. UFT. 516 p. 2016.  
 BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. 1998. **Illustrated genera of imperfect fungi**. Minnesota: Burgess Publishing Company, 4 ed. 218 p., 1998.  
 BASHA, S.; ULAGANATHAN, K. Antagonism of *Bacillus* species (strain BC121) towards *Curvularia lunata*. **Current science**, v. 82, n. 12, p. 1457-1463, 2002.  
 BETTIOL, W.; GHINI, Controle Biológico. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos**. São Paulo: Ceres, P717-728. 1995.  
 CAMPOS, J. T. DE. **Rizobactérias promotoras do crescimento de cana-de-açúcar**. 2010. 71f. Dissertação (Mestrado). Instituto Agronômico de Campinas,

Campinas, 2010.  
 CHEN, H.; XIAO, X.; WANG, J.; WU, L.; ZHENG, Z.; YU, Z. Antagonistic effects of volatiles generated by *Bacillus subtilis* on spore germination and hyphal growth of the plant pathogen, *Botrytis cinerea*. **Biotechnology Letters**, v.30, n.5, p.919-923, 2008.  
 DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* III. Hyphal interactions. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 57, n. 3, p.363-369, 1971.  
 EMBRAPA CLIMA TEMPERADO. Cultivo do arroz irrigado no Brasil. 2005. Disponível em <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Arroz/ArrozIrrigadoBrasil/cap12.htm>. (Acessada em 13/07/2015).  
 FIGUEIREDO, J. E. F.; TEIXEIRA, M. A.; LIMA, G. V. C.; BRESSAN, W.; PINTO, N. F. J. CASELA, C. R. Atividade antagonista *in vitro* de *Bacillus subtilis* contra fungos fitopatogênicos do milho e sorgo. In: XXVIII Congresso Nacional de Milho e Sorgo, 2010, Goiânia: **Associação Brasileira de Milho e Sorgo**. CD-Rom, 2010.  
 FUGA, C. A. G. **Prospecção de microrganismos e substâncias de origem vegetal para o controle de *Sclerotium cepivorum***. 2013. 46f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa. 2013  
 HALFELD-VIEIRA, B. A.; VIEIRA, J. R.; ROMEIRO, R. S.; SILVA, H. S. A.; BARACATPEIREIRA, M.C. Induction of systemic resistance in tomato by the autochthonous phyloplane resident *Bacillus cereus*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n. 8, p. 1247-1252, 2006.  
 KUPPER, K. C.; GIMENES-FERNANDES, N.; GOES, A. de. Controle biológico de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. **Fitopatologia brasileira**, v. 28, n. 3, p. 251-257, 2003.  
 LANNA FILHO, R.; FERRO, H. M.; DE PINHO, R. S. C. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. **Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 4, n. 2, p. 12-20, 2010.  
 LIMA, O. D. D. R.; DOS SANTOS, M. S. B.; RODRIGUES, A. A. C. Ação antifúngica *in vitro* de isolados de *Bacillus* spp. sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **Revista Caatinga**, v. 27, n. 4, p.57-64, 2014.  
 LOBO, V. L. S.; FILIPPI, M. C.; PRABHU, A. S. Cultivo do arroz de terras altas no estado de Mato Grosso. **Embrapa arroz e feijão**, 2006. Disponível em: [http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/ArrozTerrasAltasMatoGrosso/doencas\\_metodo\\_controle.html](http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/ArrozTerrasAltasMatoGrosso/doencas_metodo_controle.html) (Acessada em 13/07/2015).  
 MARIANO, R. L. R. Métodos de seleção *in vitro* para o controle microbiológico de patógeno de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. Passo Fundo, v. 1, p. 369-409, 1993.  
 MATARESE, F.; SARROCCO, S.; GRUBER, S.; SEIDL-SEIBOTH, V.; VANNACCI, G. Biocontrol of *Fusarium* head blight: interactions between *Trichoderma* and mycotoxigenic *Fusarium*. **Microbiology**, v.158, n. 1, p.98-106, 2012.  
 MATOS, A. P.; SANCHES, N. F.; TEIXEIRA, F. A.; SIMÃO, A. H.; VASCONCELOS, J. A. R.; COELHO, D. Monitoramento da fusariose em plantios de abacaxi conduzidos em sistema de produção integrada no Tocantins. In: Embrapa Mandioca e Fruticultura-Artigo em anais de congresso (ALICE). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 21, 2010, Natal. Frutas: saúde, inovação e responsabilidade: **anais**. Natal: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 2010.  
 MELO, I. S. de; VALARINI, P. J. Potential of rhizobacteria in the control of *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. in cucumber (*Cucumis sativum* L.). **Scientia Agricola**, v. 52, n. 2, p. 326-330, 1995.  
 MENTEN, J. O. M.; MACHADO, C. C.; MINUSSI, E.; CASTRO, C.; KIMATI, H. Efeito de alguns fungicidas no crescimento micelial de *Macrophomina phaseolina* (Tass.) Goid. "in vitro". **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 1, n. 2, p. 57-66, 1976.  
 MOREIRA, C. G. A.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; BONALDO, S. M.; STANGARLIN, J. R.; CRUZ, M. E. DA S. Caracterização parcial de frações obtidas de extratos de *Cymbopogon nardus* com atividade elicitora de fitoalexinas em sorgo e soja e efeito sobre *Colletotrichum lagenarium*. **Summa Phytopathologica**, v.34, n.4, p.332-7, 2008.  
 PASCOAL, P. V.; AGUIAR, R. W. S. Seleção de bactérias endofíticas de plantas de arroz irrigado no estado do Tocantins. In: **10º seminário de iniciação científica da UFT**, Palmas - TO, 2014. Disponível em: <http://eventos.uft.edu.br/index.php/sic/X/paper/viewFile/1591/507> (Acessada em 15/07/2015).  
 RYAN, R.P.; GERMAINE, K.; FRANKS, A.; RYAN, D.J.; DOWLING, D.N. Bacterial endophytes: recent developments and applications. **FEMS Microbiology Letters**, v.278, p.1-9, 2008.  
 SALGADO, A. P. S. P., CARDOSO, M. D. G., SOUZA, P. E. D., SOUZA, J. A. D., ABREU, C. M. P.; PINTO, J. E. Avaliação da atividade fungitóxica de óleos essenciais de folhas de Eucalyptus sobre *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* e *Bipolaris sorokiniana*. **Ciênc. Agrotec**, v.27, n.2, p. 249-254, 2003.  
 SANTOS, M. S. B.; SILVA, A. A. C. R. Sanidade de sementes de arroz, biocontrole, caracterização e transmissão de *Curvularia lunata* em semente-plântula de arroz. **Revista Ceres**, v. 61, n. 4, p. 511-517, 2014.  
 SASSER, M. **Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids: revised**. (MIDI Technical Note, 101) Newark: MIDI, 6p. 2001.  
 SILVA, F. de A. S. **ASSISTAT**. Versão 7.6 beta. Campina Grande, 2008. Disponível em: <http://www.assistat.com/index.html> (Acessada em 15/03/2015).  
 ZAGO, V.C.P.; DE-POLLI, H.; RUMJANEK, N.G. *Pseudomonas* spp. Fluorescentes - Bactérias promotoras de crescimento de plantas e biocontroladoras de fitopatógenos em sistemas de produção agrícola. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2000. 32p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 127).