

SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS ANTAGÔNICOS A PYRICULARIA ORYZAE
CAV. PARA O CONTROLE DA BRUSONE DO ARROZ (ORYZA SATIVA L.)

WAGNER BETTIOL
Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. HIROSHI KIMATI

Tese apresentada à Escola Superior
de Agricultura "Luiz de Queiroz",
da Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Doutor em
Agronomia. Área de Concentração:
Fitopatologia.

P I R A C I C A B A
Estado de São Paulo - Brasil
Março - 1988



B565s

Bettiol, Wagner

Seleção de microrganismos antagônicos a Pyricularia oryzae Cav. para o controle da brusone do arroz (Oryza sativa L.) / Wagner Bettiol. Piracicaba, 1988.

140p.

Tese (Ph D) Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz.

1. Controle Biológico - Fitopatologia. 2. Fungos - Fitopatologia - Rizicultura. 3. Bacillus subtilis - Fitopatologia. I. Título.

CDD 632.96

632.4

SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS ANTAGÔNICOS A Pyricularia oryzae
CAV. PARA O CONTROLE DA BRUSONE DO ARROZ (Oryza sativa L.)

WAGNER BETTIOL

Aprovada em: 25/05/88

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Hiroshi Kimati	ESALQ/USP
Prof. Dr. Tasso Leo Krüger	ESALQ/USP
Prof. Dr. Clélio Lima Salgado	ESALQ/USP
Prof. Dr. Nelson Gimenes Fernandes	UNESP
Dr. Jaciro Soave	IAC

Prof. Dr. Hiroshi Kimati
Orientador



*Aos meus pais,
Angélico e Elzira,
e aos meus irmãos,
Evani e Valcir,*

OFEREÇO

*A
Raquel Ghini*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Para a realização de todo e qualquer trabalho, inúmeros são os colaboradores, inclusive muitos desconhecidos, porém seria negligência se não reconhecesse e agradesse:

Ao Professor Dr. Hiroshi Kimati, pela orientação, apoio, amizade, dedicação e incentivo;

Aos Professores do Departamento de Fitopatologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", pelos ensinamentos e amizade;

Ao Professor Dr. Tasso Leo Krügn^{er}, pela elaboração do "Summary" e pelo apoio ao longo do curso de mestrado e doutoramento;

Ao Professor Dr. Carlos H.W. Flechtmann, pelos ensinamentos, amizade e constante estímulo;

Aos Eng^{os}. Agr^{os}. Dr. Darcy M. da Silva, Dra. Neusa Nogueira, MS. Ana Maria Ayres Bordin, MS. Seiji Igarashi, pelo fornecimento de materiais;

Ao Eng^o Agr^o Dr. Jaciro Soave, pelas sugestões e fornecimento de materiais;

Aos Eng^{os}. Agr^{os}. MS. José Arlindo de Camargo Pacheco, Maria Edna Tenório Nunes e Dr. Itamar S. de Melo, pelas colaborações;

- Aos Eng^{os}. Florestais MS. Celso Garcia Auer e Luiz Eduardo Aranha Camargo, pelas inúmeras formas de colaboração e, principalmente, pela amizade;
- Aos Senhores Fernando Augusto de Freitas, Edivaldo A.R. Rosa e Pedro da Silva, pelas inúmeras horas de trabalho;
- À MS. Margarida Maria Hoepfner Zaroni e à Elizabeth Sayuri Tanaka, pela realização de análises estatísticas;
- À Biblioteconomista Maria Amélia T. Leme, pela colaboração na organização das referências bibliográficas;
- À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela bolsa de estudos fornecida;
- À Financiadora de Estudos e Projetos, pelo financiamento dos trabalhos de pesquisa;
- Ao Centro Nacional de Pesquisa de Defesa da Agricultura - EMBRAPA, pela liberação para realização dos trabalhos a partir do momento em que passei a integrar o seu corpo técnico.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	x
RESUMO	xii
SUMMARY	xv
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	04
2.1. Importância da cultura do arroz	04
2.2. Importância da Brusone do arroz	06
2.3. Controle biológico, considerações gerais	12
2.4. Seleção de microrganismos antagonicos	16
2.5. Controle biológico de <i>Pyricularia oryzae</i>	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1. Coleta de material para isolamentos dos anta- gonistas	28
3.2. Obtenção de isolados de <i>Pyricularia oryzae</i> ..	31
3.3. Isolamento de possíveis antagonistas a <i>Pyricu- laria oryzae</i>	31
3.4. Avaliação da capacidade dos microrganismos isolados causarem antibiose a <i>Pyricularia ory- zae</i>	34
3.5. Seleção dos antagonistas mais eficientes na inibição do crescimento micelial de <i>Pyricula- ria oryzae</i> , in vitro	35
3.6. Preservação dos microrganismos que apresenta- vam antibiose a <i>Pyricularia oryzae</i>	36
3.6.1. Em água estéril e meio agarizado	36
3.6.2. Em solo estéril	37

3.7. Identificação dos microrganismos antagônicos a <i>Pyricularia oryzae</i>	38
3.8. Efeito do período de incubação do isolado AP-51, em meio líquido (BD), na inibição de <i>Pyricularia oryzae</i>	40
3.9. Avaliação da concentração de caldo onde isolados dos antagonistas foram multiplicados na inibição do crescimento micelial de <i>Pyricularia oryzae</i>	41
3.10. Influência do caldo onde o isolado AP-471 foi multiplicado sobre a germinação de conídios de <i>Pyricularia oryzae</i>	42
3.11. Influência das condições de luminosidade na incubação dos antagonistas multiplicados em meio líquido na inibição do crescimento micelial de <i>Pyricularia oryzae</i>	43
3.12. Efeito do tratamento de sementes com antagonistas a <i>Pyricularia oryzae</i> na recuperação de microrganismos associados a sementes de arroz (<i>Oryza sativa</i> L.) variedade IAC-165	45
3.13. Controle da Brusone do arroz com antagonistas a <i>Pyricularia oryzae</i> , em condições de campo. I. Ano Agrícola 85/86	46
3.14. Controle da Brusone do arroz com antagonistas a <i>Pyricularia oryzae</i> em condições de campo. II. Ano Agrícola 86/87	49
4. RESULTADOS	51
4.1. Avaliação da capacidade dos microrganismos isolados causarem antibiose a <i>Pyricularia oryzae</i> .	51

4.2. Seleção dos antagonistas mais eficientes na inibição do crescimento micelial de <i>Pyricularia oryzae</i> , in vitro	52
4.3. Preservação dos microrganismos que apresentaram antibiose a <i>Pyricularia oryzae</i>	53
4.4. Identificação dos microrganismos antagonísticos a <i>Pyricularia oryzae</i>	54
4.5. Efeito do período de incubação de <i>Bacillus subtilis</i> (isolado AP-51) em meio líquido (BD), na inibição de <i>Pyricularia oryzae</i> ...	56
4.6. Avaliação da concentração do caldo onde isolados de <i>Bacillus subtilis</i> foram multiplicados na inibição de <i>Pyricularia oryzae</i>	57
4.7. Influência do caldo onde <i>Bacillus subtilis</i> foi multiplicado sobre a germinação de conídios de <i>Pyricularia oryzae</i>	61
4.8. Influência das condições de luminosidade na incubação de <i>Bacillus subtilis</i> , multiplicado em meio líquido, no crescimento micelial de <i>Pyricularia oryzae</i>	62
4.9. Efeito do tratamento de sementes com <i>Bacillus subtilis</i> na frequência de microrganismos associados a sementes de arroz (<i>Oryza sativa</i> L.) variedade IAC-165.....	65
4.10. Controle da Brusone do arroz causada por <i>Pyricularia oryzae</i> com isolados de <i>Bacillus subtilis</i> em condições de campo. I. Ano Agrícola 85/86.....	68
4.11. Controle da Brusone do arroz causada por <i>Pyricularia oryzae</i> com isolados de <i>Bacillus subtilis</i> em condições de campo. II. Ano Agrícola 86/87.....	70

	Página
5. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	74
6. CONCLUSÕES	84
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86
8. APÊNDICE	101

LISTA DE TABELAS

TABELA Nº		Página
1	Resultados dos testes para identificação dos microrganismos antagonicos a <i>Pyricularia oryzae</i> , selecionados por apresentarem maior eficiência na inibição do patógeno <i>in vitro</i> ...	55
2	Influência da concentração do caldo (BD) onde os isolados de <i>Bacillus subtilis</i> foram multiplicados na inibição do crescimento micelial de <i>Pyricularia oryzae</i>	58
3	Influência da diluição do caldo (BD) no crescimento micelial de <i>Pyricularia oryzae</i>	59
4	Doses estimadas do caldo (BD) onde os isolados de <i>Bacillus subtilis</i> foram multiplicados que inibem o crescimento micelial de <i>Pyricularia oryzae</i> em 50, 90 e 95% (ED ₅₀ , ED ₉₀ e ED ₉₅)	60
5	Influência da concentração do caldo onde <i>Bacillus subtilis</i> (AP-471) foi multiplicado sobre a germinação de conídios de <i>Pyricularia oryzae</i>	61
6	Influência das condições de luminosidade na incubação de <i>Bacillus subtilis</i> multiplicado em meio líquido na inibição do crescimento micelial de <i>Pyricularia oryzae</i>	63

7	Doses estimadas do caldo (BD) onde isolados de <i>Bacillus subtilis</i> foram multiplicados, sobre diferentes condições de luminosidade, que inibem o crescimento micelial de <i>Pyricularia oryzae</i> em 50, 90 e 95% (ED ₅₀ , ED ₉₀ e ED ₉₅).	64
8	Efeito do tratamento de sementes de arroz (<i>Oryza sativa</i> L.) variedade IAC-165 com <i>Bacillus subtilis</i> sobre a frequência (%) de microrganismos a elas associados	66
9	Efeito do tratamento de sementes de arroz (<i>Oryza sativa</i> L.) variedade IAC-165 com <i>Bacillus subtilis</i> sobre a frequência (%) de microrganismos a elas associados	67
10	Efeito de pulverizações com <i>Bacillus subtilis</i> sobre a incidência da Brusone causada por <i>Pyricularia oryzae</i> na folha bandeira, na inserção da folha bandeira e no nó de plantas de arroz. Ano Agrícola 85/86	69
11	Efeito de pulverizações com <i>Bacillus subtilis</i> sobre a incidência da Brusone causada por <i>Pyricularia oryzae</i> na folha bandeira e no nó de plantas de arroz. Ano Agrícola 86/87	71
12	Efeito de pulverizações de <i>Bacillus subtilis</i> na cultura de arroz sobre a incidência de <i>Pyricularia oryzae</i> , <i>Helminthosporium</i> spp. e <i>Phoma</i> spp., nas sementes oriundas de panículas com e sem Brusone produzidas no ano agrícola 86/87	73

SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS ANTAGÔNICOS A PYRICULARIA ORYZAE
CAV. PARA O CONTROLE DA BRUSONE DO ARROZ (ORYZA SATIVA L.)

Autor: WAGNER BETTIOL

Orientador: Prof. Dr. HIROSHI KIMATI

RESUMO

Levantamentos de microrganismos, a maioria de solos e de várias partes do arroz, efetuados através de isolamento e teste qualitativo de antagonismo *in vitro* em BDA (batata, dextrose, ágar) evidenciaram a alta freqüência de antagonistas a *Pyricularia oryzae*: 348 de um total de 472 isolados. A maior freqüência foi obtida de folhas, seguida de raízes, sementes e solo. Em todas as localidades amostradas foram isolados antagonistas.

Utilizando a técnica de cultura dupla (antagonista vs. *P. oryzae*) e tendo como parâmetros a porcentagem de inibição do crescimento micelial do patógeno (PIP) e a relação PIP/crescimento do antagonista, dos 348 isolados comparados foram selecionados os 27 mais eficientes, de códigos: AP-3, AP-12, AP-42, AP-48, AP-49, AP-51, AP-85, AP-91, AP-94, AP-105, AP-114, AP-115, AP-137, AP-150, AP-165,

AP-181, AP-183, AP-203, AP-323, AP-332, AP-339, AP-365,
AP-366, AP-401, AP-420, AP-429 e AP-471.

Esses isolados foram preservados pelos métodos de repicagens sucessivas, de Castellani e de solo estéril, mantendo a viabilidade e a capacidade antagônica por pelo menos, 6 meses, 2 anos e um ano, respectivamente.

Para estabelecer a posição sistemática dos 27 isolados selecionados, foram determinadas a morfologia celular, as dimensões celulares, os aspectos das colônias em meio de cultura, o crescimento em diferentes temperaturas, as reações aos métodos de coloração, as reações a meios seletivos e as reações bioquímicas, tendo sido verificado que todos pertencem a ordem Eubacteriales, família Bacillaceae, gênero *Bacillus* e espécie *Bacillus subtilis*.

O antagonismo apresentado por *Bacillus subti*-*lis* a *P. oryzae*, verificado em todos os ensaios foi do tipo antibiose. Os antibióticos liberados por *B. subtilis* inibem tanto o crescimento micelial como a germinação de conídios de *P. oryzae*; conídios germinados podem apresentar tubo germinativo deformado. As substâncias antagônicas liberadas por *B. subtilis* são termoestáveis, agem em baixas concentrações e não são específicas inibindo também o crescimento de outros fungos.

Mesmo não apresentando diferença estatística-

mente significativa, o isolado de *B. subtilis* de código AP-150 apresentou comportamento superior aos tratamentos utilizados como padrões (kasugamicina e benomyl) no controle da Brusone em condições de campo em dois anos agrícolas (85/86 e 86/87).

O conjunto dos resultados indica que as perspectivas de controle da Brusone do arroz com *Bacillus subtilis* e/ou seus metabólitos são promissoras.

SELECTION OF ANTAGONISTIC MICROORGANISMS TO
PYRICULARIA ORYZAE CAV. FOR CONTROLLING
RICE (ORYZA SATIVA L.) BLAST

Author: WAGNER BETTIOL

Adviser: Prof. Dr. HIROSHI KIMATI

SUMMARY

A survey of microorganisms, most from soil and various parts of the rice plant, was carried out by isolation and an in vitro qualitative test for antagonism against *Pyricularia oryzae* in potato-dextrose-agar. From a total of 472 isolates, 348 showed antagonism to the pathogen. The majority was obtained from leaves, but roots, seeds and soils also yielded antagonists. All localities sampled showed the occurrence of antagonists.

Twenty-seven isolates were selected on the basis of the pathogen mycelial growth inhibition (PIP) and the PIP/antagonist growth ratio, by using the double culture technique. These isolates were AP-3, AP-12, AP-42, AP-48, AP-49, AP-51, AP-85, AP-91, AP-94, AP-105, AP-114, AP-115, AP-137, AP-150, AP-165, AP-181, AP-183, AP-203, AP-323, AP-332, AP-339, AP-365, AP-366, AP-401, AP-420, AP-429 and AP-471.

The selected antagonists were preserved in water (Castellani technique) and in soil, where they remained viable for at least six months, 2 and 1 years, respectively.

Cellular morphology, cell dimensions cultural characteristics, growth at different temperatures, reaction to stains and selective media and biochemical tests indicated that all antagonistic isolates belonged to the species *Bacillus subtilis*.

Antibiosis was the mechanism of antagonism showed by *B. subtilis* to *P. oryzae*. Antibiotics secreted by *B. subtilis* are inhibitory to mycelial growth as well as to conidial germination. Germinated conidia can show deformed germ tubes. The antagonistic substances produced by *B. subtilis* are thermo-stable. They act at low concentrations and are not specific. *Helminthosporium oryzae*, *Nigrospora Epicoccum*, *Cladosporium* and other fungi are also inhibited by these substances.

Field tests carried out in two consecutive years (85/86 and 86/87) showed a tendency to confirm the antagonistic effect of *B. subtilis* against *P. oryzae*. Isolate AP-150 gave better control than the standard treatments (kasugamicin and benomyl). More field trials should be performed in order to obtain more conclusive results to confirm the potential for utilization of *B. subtilis* and/or its metabolites in the biological control of rice blast.

1. INTRODUÇÃO

O arroz é um cereal de grande importância para o Brasil, sendo que no ano de 1984 a produção brasileira foi cerca de 9 milhões de toneladas obtidas em, aproximadamente, 5,3 milhões de hectares, com produtividade média de 1686 kg/ha. A cultura é disseminada por todo o território nacional, ocupando o terceiro lugar em área colhida e quarto em valor de produção (ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL, 1985). Contudo, no Brasil existem grandes diferenças de produtividade, dependentes do sistema de cultivo e dos fatores biológicos e sócio-econômicos de cada região.

Sob todas as condições de cultivo, a Brusone, doença causada por *Pyricularia oryzae* CAV., é considerada a mais séria da cultura, tanto por sua larga distribuição como pelo poder de destruição, não só no Brasil, mas em todo o mundo (CARDOSO & KIMATI, 1980; OU, 1985). O arroz de sequeiro, que é o mais cultivado no Brasil, está sujeito a maiores danos decorrentes da Brusone quando comparado ao sistema de arroz irrigado (PRABHU, 1980).

Os dados de perdas na produção de arroz causa

das por *P. oryzae*, no Brasil, são variáveis, existindo relatos de 9 a 100% (FRATINI & SOAVE, 1974; TOLEDO et alii, 1975; RIBEIRO, 1976; PRABHU, 1980; PRABHU, 1984), dependentes das condições de cultivo, resistência de cultivar e condições climáticas.

As medidas de controle da Brusone do arroz são baseadas, principalmente, na utilização de variedades resistentes, de fungicidas e de práticas culturais adequadas (TOLEDO et alii, 1975; CARDOSO & KIMATI, 1980; RIBEIRO, 1981; OU, 1985).

O controle biológico vem, nos últimos anos, despontando como uma das alternativas de controle para vários fitopatógenos em culturas de expressão econômica. Para Brusone o primeiro relato é de Ioshii (1949)¹, citado por FUKUNAGA (1965), que mostra a possibilidade de controle através de antibióticos produzidos por *Cephalothecium* spp.. Após este relato inúmeros estudos, quase a totalidade no Japão, buscaram descobrir microrganismos produtores de antibióticos que controlassem *P. oryzae*, culminando com a seleção de *Streptomyces griseochromogenes* e *S. kasugaensis* produtores, respectivamente, de blasticidina S (primeiro antibiótico usado exclusivamente para fins agrícolas) e kasugamicina (FUKU-

¹ YOSHII, K. Studies on *Cephalothecium* as a means of artificial immunization of agricultural crops. Ann. Phytopathol. Soc., Japan, 31 (3/4): 37-40, 1949.

NAGA, 1965; UMEZAWA et alii, 1965 e Okamoto, 1972², citado por OU, 1985) produtos esses utilizados até hoje. Mais recentemente, SY et alii (1978ab); LINDBERG (1981); SY et alii (1983ab); SY et alii (1984) e RIBEIRO (1987), entre outros, encontraram microrganismos antagonistas de *P. oryzae*.

Face ao exposto e levando em consideração que os produtos usados no controle da Brusone no Brasil são todos importados, a alternativa de controle biológico, tecnologia ao nosso alcance, por sua característica de fácil descoberta e baixo custo, é muito atraente. Visando contribuir para a viabilização dessa alternativa, o presente trabalho teve por objetivos imediatos:

1. realizar o levantamento de microrganismos antagonistas a *P. oryzae* que ocorrem no Brasil;
2. selecionar os antagonistas mais eficientes em inibir *P. oryzae* *in vitro*
3. verificar a produção de antibióticos e identificar os antagonistas a nível de espécie; e
4. avaliar a eficiência desses microrganismos no controle de patógenos das sementes de arroz e no controle da Brusone, causada por *P. oryzae*, em condições de campo.

² OKAMOTO, H. On the characteristics of kasumin, antibiotic fungicide. Japan Pesticide Information, 10: 66 - 99, 1972

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. IMPORTÂNCIA DA CULTURA DO ARROZ

O arroz é considerado como planta semi-aquática adaptada tanto a clima tropical, como subtropical. As cultivares de arroz das espécies cultivadas (*Oryza sativa* e *O. glaberrima*) podem se desenvolver tanto em solos inundados, como em solos bem drenados (FAGERIA, 1984).

Cultivado entre as latitudes 53° N-35° S, o que abrange 111 países de todos os continentes, com exceção da Antártida (CHANG, 1976) e em altitudes de até 2400 m (CHANDLER, JR., 1979) o arroz é a principal fonte alimentícia para cerca de dois terços da população mundial. O arroz é o principal item de alimentação para muitos países da África e América Latina, inclusive o Brasil. Fornece algo em torno de um terço das calorias diárias consumidas em vários países da Ásia, inclusive o Japão, sendo a principal fonte de proteínas para a população deste continente. Ocupa o segundo lugar no mundo em área plantada e produtividade e o terceiro em produção, entre os principais cereais. Em área é infe-

rior ao trigo, em produtividade ao milho e em produção a ambos (FAGERIA, 1984). Em 1981 a produção mundial de arroz foi de 413 milhões de toneladas contra 458 de trigo e 451 de milho (ANNUAIRE FAO, 1981). Contudo, a quase totalidade de arroz produzida é consumida diretamente pelo homem, enquanto que grande parte do milho e trigo é destinada à alimentação animal. Assim, o arroz revela-se como o primeiro cereal do mundo em matéria de consumo direto pela humanidade (SY et alii, 1983b).

A área de arroz plantada no mundo aumentou de 120,1 milhões de hectares em 1960/61 para 144,9 milhões de hectares em 1981/82, o que corresponde a um aumento de 21%. No mesmo período, a produção de arroz cresceu em 74%. A produtividade, que em 1960/61 era de 1950 kg/ha passou em 1981/82 a 2820 kg/ha, apresentando um aumento de mais ou menos 45% (FOREIGN AGRICULTURE CIRCULAR, 1982). Assim sendo, fica claro que o aumento de produtividade contribuiu muito mais para o aumento da produção mundial do que o aumento da área.

Mesmo sendo uma cultura amplamente difundida por todo o território brasileiro, a produção nacional está concentrada nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste. Os Estados do Rio Grande do Sul, Maranhão, Goiás, Mato Grosso, Minas Gerais, Santa Catarina, São Paulo e Mato Grosso do Sul contribuíram em 1984 com 86,5% da produção do país (ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL, 1985). Embora a produção brasileira venha aumentando com o tempo, a produtividade tende a diminuir devido ao aumento da área cultivada com arroz de sequeiro (EMBRAPA, 1981) ainda que a produtividade do arroz irrigado venha aumentando ano a ano.

2.2. IMPORTÂNCIA DA BRUSONE DO ARROZ

Sob todas as condições de cultivo, a Brusone, doença causada por *Pyricularia oryzae* CAV., é considerada a mais séria da cultura, não só no Brasil, mas em todo o mundo (CARDOSO & KIMATI, 1980). O arroz de sequeiro, que é o mais cultivado, no Brasil, está sujeito a maiores danos decorrentes da Brusone que o sistema de arroz irrigado (PRABHU, 1980).

OU (1985) afirma que a Brusone do arroz é uma das doenças de plantas mais largamente distribuídas no mundo, estando presente praticamente em todos os locais onde



se cultiva o arroz. Sua adaptabilidade para várias condições ambientes é extraordinária.

P. oryzae afeta todas as partes da planta, incluindo as folhas, os nós do colmo, as bainhas, as várias partes das panículas e os grãos. Nas folhas, os sintomas característicos são manchas elípticas, com extremidades pontiagudas, centro cinza ou esbranquiçado e bordos marrons ou marrom avermelhados, às vezes circundadas por um halo amarelo. As manchas usualmente se iniciam com pequenos pontos esbranquiçados, acinzentados ou azulados, aumentando rapidamente sob condições favoráveis em cultivares susceptíveis, permanecendo acinzentados por certo tempo. As lesões atingem 1 - 1,5 cm de comprimento por 0,3 - 0,5 cm de largura. Dependendo das características da cultivar e das condições ambientes, as manchas podem coalescer, provocando a seca total das folhas e mesmo da planta toda. A Brusone nodal ocorre geralmente no segundo ou terceiro nó ou quase no nível da água em arroz irrigado. Quando esses nós são atacados ficam fracos e quebram-se facilmente. Durante ventos pode ocorrer acamamento. Frequentemente, parte dos nós se quebram, permanecendo conectados por uns poucos cordões vasculares. O ataque ao nó causa necrose total da parte atingida e impede a circulação da seiva que faz com que as panículas formadas sejam brancas. Em algumas condições brasileiras, o único sintoma observado em determinados anos é a Brusone nos nós. A infecção do nó da base da panícula, conhecida como "pescoço quebrado" pode,

se ocorrer, desde a emissão da panícula até a fase leitosa, produzir grãos totalmente chochos. Por outro lado, se a infecção ocorrer mais tarde há apenas a redução no peso dos grãos. As ramificações das panículas também são atacadas, provocando formação de grãos chochos. Os grãos podem ser afetados e quando isso ocorre as glumas apresentam lesões semelhantes às das folhas (CARDOSO & KIMATI, 1980; PRABHU & BEDENDO, 1982; OU, 1985; SCHNITZLER, s.d. e WALLA, s.d.). Sabe-se que é possível a transmissão do patógeno através de sementes (MATALLO & LASCA, 1978 e RICHARDSON, 1979).

A Brusone é considerada a principal doença do arroz por causa da sua larga distribuição e destruição sob condições favoráveis (OU, 1985). No entanto, as quantificações das perdas são falhas. GOTO (1965) afirma que 24,8% das perdas causadas por doenças, pragas e diversos fatores físicos, no Japão em 1960, foram motivadas pela Brusone, equivalendo a aproximadamente 273.300 toneladas de arroz. Katsube & Koshimizu (1970)³ citados por OU (1985), estimaram que a cada 10% de aumento na incidência da doença no pescoço, houve redução de aproximadamente 6% na produção e aumento de 5% em grãos gessados, o que diminuiu a qualidade do arroz em 1 ou 2 classes.

³ KATSUBE, T. & KOSHIMIZU, Y. Influence of blast disease on harvest of rice plants. 1. Effect of panicle infection on yield components and quality. Bulletin of the Tono-ku Agricultural Experiment Station, 39: 55-96, 1970.

No Brasil, são escassos os trabalhos que determinam as perdas na cultura do arroz motivadas pela Brusone. FRATINI & SOAVE (1974) estimaram as perdas no Estado de São Paulo em torno de 9%. RIBEIRO (1976) relatou que em algumas lavouras no Rio Grande do Sul, onde se registrou ataques epidêmicos, as perdas motivadas pela doença chegaram até a 70 e 80% da produção. TOLEDO et alii (1975) verificaram que um aumento na porcentagem de infecção de 16,63 para 46,42% reduziu a produção de 4.125 para 3.187,5 kg/ha, sendo que o rendimento de grãos inteiros do benefício passou de 59,9 para 36,59%. PRABHU (1980) relata que nos experimentos conduzidos no CNPAF/EMBRAPA (Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão/Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) Goiânia-GO, os prejuízos causados por Brusone variaram entre 16 e 66%, dependendo da susceptibilidade da cultivar à doença e das condições climáticas. SOUZA et alii (1984) afirmaram que as perdas na produção causada por Brusone, podem chegar até a 100% em algumas lavouras.

Dois nomes genéricos têm sido usados para o fungo causador da Brusone, *Pyricularia* e *Dactylaria*, ambos estabelecidos por Saccardo em 1880. Os nomes *Pyricularia grisea*, *Dactylaria grisea*, *P. oryzae* e *D. oryzae* têm sido usados por diferentes autores. Cavara, na Itália, em 1881, foi o primeiro a descrever *Pyricularia* em arroz, denominando *P. oryzae* (OU, 1972). ASUYAMA (1965) concluiu que o fungo causador da Brusone deve ser incluído no gênero *Pyricularia*. Há

literatura que apresenta o nome genérico como *Piricularia*, no entanto, como originalmente o gênero foi descrito como *Pyricularia*, esta deve ser a forma usada (OU, 1972).

P. oryzae, deuteromiceto da ordem Moniliales, família Moniliaceae, caracteriza-se por produzir conidióforos longos, delgados, principalmente simples e septados. Os conídios são piriformes a grosseiramente elipsoidais, com 1 ou 2 septos transversais (2 a 3 células) e ligados ao conidióforo pelo seu lado mais dilatado (BARNETT & HUNTER, 1972). OU (1985) descreve que os conídios são piriformes, com base arredondada, ápice estreito, tendo geralmente 2 septos, raramente 1 ou 3; algumas vezes uma leve constrição nos septos, de hialino a oliva palha; usualmente com $19-33 \mu \times 7-9 \mu$ com um pequeno pé basal de $1,6 - 2,4 \mu$. Os conídios germinam pela célula apical e basal e menos freqüentemente pela célula do meio. O número de núcleos nas células do micélio, conídio e apressório é variável. Yamazaki & Niizeki (1965)⁴, citados por OU (1985), observaram células uninucleadas e células contendo de 2 a 6 núcleos. O modo de ramificação do conidióforo é simpodial. O segundo conídio é formado no ápice do conidióforo justamente acima do ponto de inserção do primeiro (HENRY & ANDERSON, 1948). Este processo continua até a formação de 7 - 9 conídios por conidióforo (ASUYAMA, 1965).

⁴ YAMAZAKI, Y & NIIZEKI, H. Studies on variation of the riceblast fungus *Piricularia oryzae* CAV. I Karyological and genetical studies on variation. Bulletin of the National Institute of Agricultural Sciences, D - 13, 231 - 274, 1965

Para o controle duradouro da doença o uso de variedades com resistência vertical torna-se quase impossível devido à plasticidade genética do fungo, sendo que procura-se desenvolver variedades com resistência horizontal, as quais poderão ser usadas por períodos de tempo mais longos (CARDOSO & KIMATI, 1980). No entanto, devido às dificuldades de obtenção da resistência horizontal, variedades com resistência vertical são lançadas, propiciando bons resultados por um curto período. Desta forma, segundo TOLEDO et alii (1975), o uso de fungicidas para o controle da Brusone vem se tornando prática cada vez mais comum, sendo diversos os produtos específicos para tal fim encontrados no mercado. No Japão, substâncias químicas têm sido extensivamente usadas para controle da Brusone e virtualmente todos os campos de arroz têm sido tratados com fungicidas nos anos recentes. Assim a doença tem causado somente pequenos danos à cultura (OU, 1985). Além dessas medidas de controle, práticas culturais adequadas podem reduzir a incidência da doença. É muito conhecido o aumento da incidência e severidade da Brusone com aumento da adubação nitrogenada (PRABHU, 1983). Assim, há necessidade de se considerar este fator na condução da cultura. No Japão, mas não apenas neste país, o plantio precoce tem reduzido usualmente a doença (OU, 1985). RIBEIRO (1981) realizou estudo sobre a influência da época de semeadura do arroz irrigado sobre os danos ocasionados pela Brusone e verificou que para as diferentes cultivares estudadas, a semeadura em

dezembro (tardia) levou a uma maior severidade da doença nas folhas e panículas, com maiores danos, principalmente, para as cultivares mais susceptíveis. Há necessidade de se considerar a densidade de semeadura, pois quanto maior a densidade mais favoráveis são as condições para o patógeno.

SY **et alii** (1983b) obtiveram dados interessantes com o controle biológico de *P. oryzae*. Reconhecidamente os antibióticos blasticidina S e kasugamicina apresentam grande eficiência no controle da Brusone, sendo de origem microbiana produzidos por *Streptomyces griseochromogenes* (OU, 1985) e *S. kasugaensis* (UMEZAWA **et alii**, 1965), respectivamente. O uso desses produtos pode ser apontado como um bem sucedido exemplo de controle biológico.

2.3. CONTROLE BIOLÓGICO, CONSIDERAÇÕES GERAIS

O aumento do interesse em pesquisar controle biológico de doenças de plantas é evidente em todo o mundo, especialmente nesses dias quando a deterioração do ambiente por produtos químicos usados na agricultura tem sido um assunto de constante interesse, e também devido ao maior conhecimento das conseqüências decorrentes do desequilíbrio causado pelo homem.

BAKER & COOK (1974, p.43) definem controle biológico como "a redução da densidade de inóculo ou das ati

vidades determinantes da doença provocada por um patógeno ou parasita nos seus estados de atividade ou dormência, por um ou mais organismos, realizado naturalmente ou através da manipulação do ambiente, hospedeiro ou antagonista, ou pela introdução em massa de um ou mais antagonistas". Esta definição foi reduzida por COOK & BAKER (1983, p. 60) para: "controle biológico é a redução da soma de inóculo ou das atividades determinantes da doença provocada por um patógeno realizada por ou através de um ou mais organismos que não o homem". E os autores explicam: - atividades determinantes de doenças - envolvem crescimento, infectividade, virulência, agressividade e outras qualidades do patógeno, ou processos que determinam infecção, desenvolvimento de sintomas e reprodução. Os organismos incluem: indivíduos ou populações avirulentas ou hipovirulentas dentro das espécies patogênicas; a planta hospedeira manipulada geneticamente ou por práticas culturais ou microrganismos para maior ou mais efetiva resistência contra o patógeno; e antagonistas dos patógenos definidos como microrganismos que interferem na sobrevivência ou atividades determinantes de doenças causadas por patógenos. Assim, segundo COOK & BAKER (1983), controle biológico pode ser acompanhado por práticas culturais para criar um ambiente favorável aos antagonistas e a resistência da planta hospedeira ou ambos; através do melhoramento da planta para aumentar resistência ao patógeno ou adequar o hospedeiro para as atividades dos antagonistas, através da introdução em massa de antagonistas, linhagens não patogênicas ou outros orga

nismos ou agentes benéficos. Essas definições abrangentes são aceitas por muitos fitopatologistas (COOK, 1985). Entretanto, controle biológico será usado neste trabalho como controle de um microrganismo através de outro microrganismo (CULLEN & ANDREWS, 1984).

Os mecanismos das interações antagonísticas entre microrganismos patogênicos e antagonistas com a planta podem ser divididos em: antibiose, competição, parasitismo, predação, hipovirulência e indução de defesa do hospedeiro (BOOSALIS, 1964; BAKER & COOK, 1974; SCHROTH & HANCOCK, 1981; BLAKEMAN & FOKKEMA, 1982; COOK & BAKER, 1983; MEINHARDT, 1984; COOK, 1985). Antibiose é definida como uma interação entre organismos na qual um agente metabólico produzido por um organismo tem um efeito danoso sobre o outro; usualmente ocorre inibição no crescimento podendo ser letal, mas o metabólito pode penetrar na célula e inibir sua atividade por toxicidade química. Competição é referente à interação de dois organismos empenhados na mesma ação ou coisa. A competição entre microrganismos é principalmente por alimento (carboidratos, nitrogênio e fatores de crescimento), por espaço e oxigênio. Parasitismo é usado em referência ao fenômeno de um microrganismo parasitar o outro. Os hiperparasitas atacam hifas e estruturas de esporulação dos patógenos da planta, reduzindo a infecção e o inóculo do patógeno. Os predadores obtêm o alimento dos patógenos e de várias outras fontes. A hipovirulência é usada introduzindo uma linhagem

do patógeno menos agressiva ou não patogênica que por anastomose pode transmitir a característica para as patogênicas, a qual pode ser conferida por um determinante citoplasmático. Um antagonista pode agir através de um ou mais mecanismos de interações antagonísticas.

Embora negligenciado no passado, o interesse por controle biológico de patógenos da parte aérea de plantas tem recentemente sido estimulado (CORKE & RISHBETH, 1980). A maior compreensão da natureza física, química e microbiológica da superfície foliar ocorreu graças aos trabalhos de PREECE & DICKINSON (1971) e DICKINSON & PREECE (1976). Somente nos últimos 30 anos, tornou-se largamente reconhecido que grandes populações de microrganismos epifíticos vivem nas superfícies foliares e que são capazes de influenciar as espécies patogênicas no processo de infecção de folhas e caules (FOKKEMA, 1976).

Segundo BLAKEMAN (1985) para um programa de controle biológico atingir o sucesso, devem ser conhecidas, inicialmente, informações fundamentais como a natureza das relações entre hospedeiro, patógeno e microflora associada. Tais relações são influenciadas por fatores externos como microclima da superfície da planta e variações ocasionais as quais causam no microhabitat do filoplano uma contínua flutuação. O ambiente abiótico da parte aérea é muito diferente do solo (BAKER & COOK, 1974), sendo que o da superfície

das folhas varia muito mais rapidamente do que o da superfície das raízes (BLAKEMAN, 1985). Temperatura e umidade variam mais amplamente e rapidamente e os microrganismos são expostos a luz solar e radiação ultravioleta, havendo grande exposição ao ar atmosférico e riscos de serem lavados por chuva (BAKER & COOK, 1974). A umidade relativa na superfície foliar é provavelmente o fator mais importante que influencia o crescimento e a sobrevivência dos microrganismos neste habitat, uma vez que para suportar o crescimento de muitos microrganismos na superfície foliar a umidade relativa deve ser em torno de 95% ou mais (BLAKEMAN, 1985).

Na abordagem de controle biológico, doença é mais do que uma íntima interação do patógeno com o hospedeiro, é o resultado de uma interação entre o hospedeiro, 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; COOK, 1985).

2.4. SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS ANTAGÔNICOS

A seleção de microrganismos antagônicos sustenta virtualmente todo o programa de controle biológico. Este procedimento parece formidável dado o vasto número de indivíduos que podem ser selecionados numa comunidade microbiana típica. Muitos microrganismos valiosos para a fitopatolo

gia e medicina animal e humana foram descobertos acidentalmente. No entanto, existem caminhos que aumentam as chances de resultados positivos (ANDREWS, 1985). STESSEL et alii (1953) afirmaram que muitos antibióticos usados na medicina resultaram de uma sistemática pesquisa de seleção.

Uma opção é aplicar mistura de populações de microrganismos em placas de Petri com ágar semeadas com o patógeno e verificar os microrganismos que possuem atividade antagonística, considerada pela zona de inibição (JOHNSON et alii, 1967). Esta abordagem combina isolamento com seleção.

Segundo ANDREWS (1985), muitos pesquisadores preferem selecionar microrganismos com características como: presença no local onde o controle será aplicado; bom crescimento, estabilidade e esporulação em cultura; membro de espécies ou gêneros conhecidos como antagonísticos; características morfológicas ou fisiológicas distintas para facilitar o reconhecimento e sobrevivência no local em diferentes condições. Essa abordagem deve ser usada se existirem evidências de trabalhos preliminares de que a atividade antagonística seja restrita a um grupo específico de microrganismos. Conhecedor destas evidências BASTOS (1979) isolou a partir de basidiocarpos de *Crinipellis pernicioso*, o fungo *Dactylium* sp. (*Cladobotrium* sp.) que apresenta antagonismo a esse patógeno, agente causal da Vassoura de Bruxa do cacauero.

Todos os métodos de seleção para antagonismo são baseados em evidências de que o organismo candidato interfere com o patógeno ou reduz a doença. Interferência implica em algumas formas de dilaceração ou inibição e pode ser avaliada em laboratório, *in vitro* em meio agarizado ou por exames microscópicos de cortes de folhas, e em lâmina com película de ágar em microscópio, ou *in vivo*, pela redução da doença, tanto em condições controladas como em campo (ANDREWS, 1985).

In vitro são utilizados principalmente métodos em placas de Petri com meio agarizado, lâminas com ágar ou com gotas de diferentes suspensões de microrganismos (ANDREWS *et alii*, 1983; ANDREWS, 1985). O teste em placas de Petri com meio agarizado consiste basicamente na transferência do possível antagonista para o meio antes ou após o patógeno a ser controlado, verificando a formação de zona de inibição entre as colônias ou parasitismo. Utilizando esta metodologia inúmeros autores obtiveram bons antagonistas (DUNLEAVY, 1955; ABO-EL-DAB & GOORANI, 1964; JENKINS, 1968; BASTOS & FIGUEIREDO, 1976; FRAVEL & SPURR, 1977; THIRUMALACHAR & O'BRIEN, 1977; HENIS *et alii*, 1979; UTKHEDE & RAHE, 1980; BELL *et alii*, 1982; UTKHEDE & RAHE, 1983; SIVAN *et alii*, 1984; PUSEY & WILSON, 1984; LOPES, 1986; BETTIOL *et alii*, 1986; NUNES *et alii*, 1986ab; HALL *et alii*, 1986). Utilizando lâminas com ágar para avaliar o efeito na germinação dos esporos e lise do tubo germinativo, MORGAN (1963) e ANDREWS *et alii* (1983) isolaram antagonistas eficientes.

Usualmente não há correlação significativa entre antagonismo demonstrável em cultura e efetividade no campo (ANDREWS, 1985; LOPES, 1986). A disparidade aparente entre o comportamento *in vitro* e *in vivo* pode representar nada mais do que diferenças na sobrevivência nos dois ambientes. Comumente, organismos que mostram antagonismo em testes de placas não controlam a doença quando aplicados nas plantas. Menos comumente, antagonistas efetivos em controlar a doença no campo não mostram propriedades inibitórias em cultura (ANDREWS, 1985 ; LOPES, 1986), podendo ser descartados se o ensaio em placas agarizadas for usado como único critério. LOPES (1986) verificou, em condições de campo, que isolado de *Bacillus* sp. não afeta o desenvolvimento de queima foliar e podridão de cartucho no milho causadas por *Pseudomonas avenae*, controlando bem *in vitro* e em casa de vegetação. Por outro lado, mesmo apresentando reduzida inibição *in vitro*, um isolado de *Pseudomonas fluorescens* controlou a doença efetivamente em casa de vegetação e campo.

Testes para antagonismo na superfície foliar de plantas crescendo sob condições controladas são chaves para seleção de agentes para controle biológico (ANDREWS, 1985). Microrganismos os quais não inibem patógenos em meio de ágar podem ser detectados por este método (FOKKEMA, 1976). O método de folha destacada pode ser usado como intermediário entre o *in vitro* e *in vivo*.

LEBEN (1964) isolou 230 bactérias das folhas de plântulas de pepino e através de seleção em condições controladas obteve um isolado que diminuiu de fato a Antracnose do pepino. No entanto, nenhum dos isolados controlou Oídio.

A seleção de antagonistas na superfície foliar de plantas crescendo em condições controladas é particularmente importante para selecionar leveduras. LUZ (1985) isolou *Sporobolomyces roseus*, *Rhodotorula* sp. e *Sporobolomyces* sp. de folhas de trigo e demonstrou que essas leveduras são efetivas para controlar *Cochliobolus sativus* e *Leptosphaeria nodorum* do trigo sob condições controladas. FOKKEMA & VAN DER MEULEN (1976) verificaram que *Aureobasidium pullulans*, *S. roseus* e *Cryptococcus laurentii* var. *florescens* reduziram a infecção de *Septoria nodorum* em trigo, mas o efeito antagônico sobre a germinação de esporos foi baixo.

O teste mais importante no procedimento para seleção é quanto ao possível desempenho do antagonista quando introduzido numa comunidade microbiana natural, na qual ele estará exposto às condições ambientes prevalentes (ANDREWS, 1985), sendo considerado o teste definitivo do potencial de controle biológico do antagonista. Muitos antagonistas eficientes *in vitro* e em condições controladas não passam por este teste final. A variabilidade das condições ambientes é um grande problema a ser considerado nos testes de campo, assim os testes devem ser repetidos por vários anos e locais, antes de alguma conclusão consistente sobre eficiência ser feita (ANDREWS, 1985). Com

provando esta necessidade, LUZ (1985) verificou que em condições de campo *S. roseus* reduziu significativamente a infecção de *C. sativus* e *L. nodorum* no trigo, em 1981, inclusive aumentando o rendimento de grão. Por outro lado, em 1982 esta levedura não produziu efeito sobre as doenças e sobre o rendimento do trigo.

O grau de sobrevivência do antagonista, o crescimento e disseminação são os pontos mais críticos nos testes de campo, sendo pré-requisitos para efetiva sustentação do controle biológico, devendo ser monitorados e avaliados independentemente da severidade da doença. Marcadores genéticos, meios seletivos, exame em microscópio de varredura ou clareamento e tingimento da folha são métodos utilizados para monitoramento (ANDREWS & KENERLY, 1978; PAPAIVIZAS & LEWIS, 1983; CULLEN et alii, 1984). A importância da sobrevivência do antagonista é relatada por LEBEN et alii (1965), os quais verificaram que o isolado de uma bactéria antagonista a *Venturia inaequalis*, *Colletotrichum lagenarium* e *Alternaria solani*, falhou no controle desses patógenos no campo porque 24 horas após aplicação 99% das células tinham perdido a viabilidade.

Segundo ANDREWS (1985), antagonistas que falham neste teste final não são necessariamente sem valor e não devem ser descartados. Fracasso na performance *in vivo* pode ser devido somente à rápida morte no filoplano. Este problema pode ser facilmente corrigido por manipulações

para proteger o inóculo da dessecação, provendo adesão, etc. Se o antagonista não se estabelecer no filoplano, este pode ainda ser valioso como suprimento de genes, convertendo um organismo residente de alta colonização em antagonista. Pode ainda o antagonista ser melhorado quanto a característica de colonização.

Um progresso lógico do protocolo de seleção de antagonista para controle biológico procede através de vários estágios, e em teoria é de *in vitro* para *in vivo* (testes em placa de Petri ou lâmina para *in vivo* controlado e deste para *in vivo* não controlado). ANDREWS (1985) sugere, preliminarmente, seleção coordenada por uma das técnicas *in vitro* e uma *in vivo* sobre condições controladas, seguindo posteriormente para o estágio definitivo que são os ensaios de campo. Esta seqüência de seleção foi utilizada por BASTOS (1978) para obter antagonistas a *C. perniciosa*. Inicialmente selecionou antagonistas *in vitro* ao patógeno através da formação de halo de inibição em cultura dupla. No ano seguinte, BASTOS (1979) isolou *Dactylium* sp. (*Cladobotryum* sp.) que se mostrava antagônico a *C. perniciosa*. Na continuação dos trabalhos BASTOS et alii (1981) identificaram como *Cladobotryum amazonense* um novo fungo hiperparasita com potencial para controlar fungos patogênicos do cacau. BASTOS (1984) verificou que o filtrado da cultura de *C. amazonense* inibiu a germinação de esporos de *C. perniciosa* e revelou capacidade de proteger os frutos do cacau contra a infecção deste patógeno, sem apresentar fitotoxicidade. BAS-

TOS & FIGUEIREDO (1983) demonstraram que o filtrado de *C. amazonense* apresentou acentuado efeito tóxico a *Phytophthora palmivora*, *P. capsici* e *P. citrophthora* inibindo tanto o crescimento micelial *in vitro* como a capacidade de produzir lesões *in vivo*. BASTOS et alii (1986) estudando a substância antibiótica produzida por *C. amazonense*, indicaram o antibiótico como um polipeptídeo, mas ainda desconhecem a estrutura da substância. Estes trabalhos demonstraram a viabilidade do esquema de seleção de microrganismos antagonistas proposto por ANDREWS (1985).

Se a principal meta da seleção de microrganismos antagonistas for encontrar produtores de antibióticos, os testes que demonstram antibiose *in vitro* são fundamentais. STEssel et alii (1953) sugerem os seguintes passos: 1. seleção de microrganismos antagonísticos do solo, usando fungos fitopatogênicos como organismos testes; 2. seleção de antagonistas com base na inibição de vários fitopatógenos; 3. produção de antibiótico pelos antagonistas em meio líquido; 4. estudo da estabilidade dos antibióticos produzidos pelos organismos selecionados. ANDREWS (1985) afirma que o teste mais importante no procedimento de seleção é o das condições ambientais, assim obtendo-se um antagonista efetivo *in vitro*, há necessidade do mesmo ser levado para campo.

Segundo WOOD & TVEIT (1955), organismos selecionados como antagonistas não devem ser fitopatogênicos, devem ter propriedades que facilitem a aplicação na superfície

das plantas ou solos e devem ter capacidade de rápido estabelecimento. Seus esporos ou estruturas de sobrevivência devem germinar bem e rapidamente. Os organismos devem apresentar alta taxa de crescimento e capacidade reprodutiva, especialmente de esporos relativamente resistentes. Os antagonistas devem ser facilmente cultivados em meios disponíveis e não devem ser exigentes em seus requerimentos nutricionais, de modo que grandes quantidades de inóculo possam ser facilmente preparados a baixo custo.

2.5. CONTROLE BIOLÓGICO DE *Piricularia oryzae*

Yoshii (1949)⁷, citado por FUKUNAGA (1965), reportou pela primeira vez a possibilidade de controlar Brusone do arroz com antibióticos. Ele verificou que *Cephalothecium* spp. produzem cefalotecina, a qual inibia o crescimento de *P. oryzae* nas folhas de planta do arroz. Segundo Fukunaga **et alii** (1955)⁸, citados por FUKUNAGA (1965), pesquisadores japoneses que trabalhavam com arroz passaram a selecionar antibióticos para Brusone a partir de 1950, motivados principalmente pelo desenvolvimento desses produtos pa

⁷ YOSHII, K. Studies on *Cephalothecium* as a mean of artificial immunization of agricultural crops. Ann. Phytopathol. Soc., Japan, 31(3/4): 37-40, 1949.

⁸ FUKUNAGA, K. **et alii**. Application of antibiotics to agricultural chemical. I. Screening of antifungal actinomyces against *Piricularia oryzae*. Ann. Phytopathol. Soc. Japan, 20: 95, 1955.

ra uso médico. Vários antibióticos promissores foram descobertos: antiblastina, antimicina A, blastimicina, blasticidina A. No entanto, não foram utilizados na prática por causa ou da instabilidade química ou de sua alta toxicidade aos peixes.

Em 1955, blasticidina S foi obtida de *Streptomyces griseochromogenes* e experimentos *in vitro* e *in vivo* de vegetação mostraram que o antibiotico possuía efeito terapêutico. Em 1961, foi colocado no mercado, sendo o primeiro antibiótico usado exclusivamente para fins agrícolas no mundo (FUKUNAGA, 1965). *P. oryzae* é altamente sensível a blasticidina S e a germinação de esporos é inibida completamente com 1 ppm, indicando que esse antibiótico tem o mesmo efeito de acetato fenil-mercúrio. Enquanto há a necessidade de 10 ppm de acetato fenil-mercúrio para inibir o crescimento micelial do agente causal da Brusone, 1 ppm de blasticidina S é suficiente (FUKUNAGA, 1965).

O desenvolvimento da blasticidina S estimulou vários institutos a pesquisar antibióticos para controle da Brusone e outro resultado de grande sucesso foi a kasugamicina, produzida por *Streptomyces kasugaensis* (UMEZAWA *et alii*, 1965 ; Okamoto, 1972⁹, citado por OU, 1985). Ainda hoje esses dois antibióticos são mundialmente comercializados.

⁹ OKAMOTO, H. On the characteristics of kasumin antibiotic fungicide. Pesticide Information, Japan, 10: 66-9, 1972.

Excluindo os inúmeros trabalhos com blastocidina S e kasugamicina, são escassas as publicações que versam sobre o controle biológico de *P. oryzae*, utilizando um microrganismo. No entanto, alguns trabalhos demonstram a possibilidade de se encontrar outros agentes microbianos com potencial antagonista ao fungo. SY et alii (1978a) demonstraram a inibição do crescimento micelial de *P. oryzae* com *Trichoderma viride*, *Chaetomium globosum* e *Myrothecium verrucaria*, com respostas diferenciais de acordo com o pH do meio. SY et alii (1978b) verificaram que a 25°C a germinação de conídios de *P. oryzae* é totalmente inibida por filtrados brutos autoclavados de uma cultura de *Chaetomium globosum* desenvolvida em meio líquido com pH 4,1; também a suspensão de conídios de *M. verrucaria* em meio líquido a pH 4,1 ou 6,0 inibiu a germinação do patógeno. Filtrados estéreis de *C. globosum* e *M. verrucaria* apresentaram inibição de 98% e 71% na germinação de conídios, respectivamente. LINDENBERG (1981) verificou que um antibiótico produzido por *Pseudomonas* sp. e identificado como tropolone foi letal para colônias de muitos fungos, incluindo *Pyricularia*. SY et alii (1983a) verificaram que quatro espécies de *Trichoderma* inibiram fortemente o crescimento de *P. oryzae* a 15, 28 e 35°C. SY et alii (1984) verificaram que em meio de cultura com diferentes pH *T. harzianum*, *T. koningii*, *Fusarium* sp. e duas bactérias inibiram o crescimento micelial de *P. oryzae*. sendo a inibição por *T. pseudokoningii* e *Aspergillus niger* maior que 60% com pH 4,1 e 6,2. SY et alii (1983b), em experimentos realiza-

dos em casa de vegetação verificaram que *Micromonospora* sp., *Trichoderma* sp. (IKP-6), *T. roseum* (N39), *Micromonospora* sp. (PN7-6) e *T. harzianum* (N-72) inibiram a incidência da Brusone em 90,8; 76,88; 71,5; 66,65; e 55,0%, respectivamente; enquanto *Micromonospora* sp. (PS6-2), *Trichoderma* sp. (IKP-6), *Micromonospora* sp. (PN7-6), *Trichoderma* sp. (CLY-3), bactéria (PTZ), *T. harzianum* (N72) e *T. harzianum* (N68) inibiram a severidade da doença em 97,2; 90,0; 80,85; 79,8; 78,97; 77,9 e 50,9%, respectivamente. RIBEIRO (1987), estudando a ação de microrganismos no controle biológico de doenças do arroz irrigado, verificou que *Trichoderma*, *Trichothecium* e *Nigrospora* inibiram o crescimento de colônias de *P. oryzae* e *Helminthosporium oryzae*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. COLETA DE MATERIAL PARA ISOLAMENTO DOS ANTAGONISTAS

A primeira coleta foi realizada no município de Boa Esperança do Sul-SP, numa cultura de arroz (variedade não identificada), com aproximadamente 60 dias desenvolvendo-se em solo orgânico. As plantas de arroz, de modo geral, não apresentavam manchas foliares, estando completamente saudáveis e aparentemente sem problemas nutricionais. Até a data da coleta, não haviam sido realizadas aplicações de defensivos na cultura. A partir de uma das extremidades do campo foram amostradas plantas na diagonal, retirando-se ao acaso touceiras inteiras. Operação semelhante foi realizada na outra diagonal. Após a coleta, no próprio campo, foi eliminada parte dos perfilhos de cada touceira e os selecionados foram transportados para laboratório dentro de saco de papel, tendo permanecido por aproximadamente 30 horas nestas embalagens antes da realização do isolamento.

A segunda coleta foi realizada nos municípios de Jaboticabal-SP e Matão-SP. Em Jaboticabal-SP, a amostragem foi realizada no

campo experimental da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal/UNESP, numa cultura de arroz da variedade IAC-165 com aproximadamente 40 - 50 dias. Por ser um ensaio de competição de erva daninha, foram amostradas apenas as bordas duras dos lotes de capina mecânica e testemunha. Como as bordaduras possuíam 3 linhas foram coletadas plantas ao acaso nas linhas centrais. No município de Matão-SP, o campo de arroz amostrado estava com aproximadamente 60 dias. A metodologia de amostragem foi semelhante a do município de Boa Esperança do Sul-SP. Nas duas localidades as plantas não apresentavam problemas fitossanitários. Tanto o material de Jaboticabal-SP, como o de Matão-SP, foram transportados envolvidos em papel jornal. O isolamento foi realizado 60 horas após a coleta.

A terceira amostragem foi realizada no município de Rio Claro-SP. A cultura de arroz da variedade IAC-165, estava na fase de florescimento, sendo que aparentemente não apresentava problemas nutricionais nem fitossanitários. Não foi realizada adubação nitrogenada em cobertura, nem aplicação de defensivos. Como na primeira localidade, a amostra foi retirada nas duas diagonais. Plantas inteiras envolvidas em papel jornal foram transportadas para o laboratório. O isolamento dos possíveis antagonistas foi feito 2 horas após a coleta.

A quarta amostragem foi realizada no Campo Experimental do Instituto de Genética da Escola Superior de

Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP, município de Piracicaba-SP, nas bordaduras de ensaios de melhoramento de plantas, formadas pela variedade IAC-165 no estágio de florescimento. As amostras foram retiradas ao acaso. Neste campo não foi observada a ocorrência da Brusone. As plantas amostradas, aparentemente, não apresentavam problemas nutricionais e não receberam pulverizações com defensivos agrícolas.

A quinta amostragem foi realizada num lote de sementes de arroz da variedade Agulha Precoce, fornecido pelo Instituto Agronômico de Campinas-IAC, Campinas-SP.

A sexta coleta foi efetuada no município de Goiânia-GO, no campo experimental do CNPAF/EMBRAPA, pela Engenheira Agrônoma MS Ana Paula Ayres Bordin. Foram coletadas folhas de cinco pontos do campo experimental. Durante as coletas não foram identificadas as variedades e/ou linhagens amostradas. As folhas foram transportadas em envelopes de papel, tendo permanecido nestas embalagens por quatro dias antes de realizar o isolamento de microrganismos. O histórico dos pontos de amostragem é desconhecido.

A sétima amostragem foi efetuada no município de Ribeirão Preto-SP, pelo Engenheiro Agrônomo Dr. Jaciro Soave do Instituto Agronômico de Campinas, Campinas-SP, coletando folhas com sintomas de Brusone. Essas foram transportadas em sacos plásticos, tendo permanecido um dia nas embalagens antes dos trabalhos de isolamento.

3.2. OBTENÇÃO DE ISOLADOS DE *Pyricularia oryzae*

Os trabalhos foram realizados com cinco isolados, sendo quatro de códigos 240, 303, 305 e 431, cedidos pelo Dr. Yoshitaka Tanaka do CNPAF/EMBRAPA, Goiânia-GO. O quinto isolado é de material proveniente do município de Londrina-PR, cedido pelo Engenheiro Agrônomo MS Seiji Igarashi. Após obtenção do isolado, este foi testado quanto à patogenicidade em condições controladas na ESALQ/USP e reisolado após surgimento das lesões.

3.3. ISOLAMENTO DE POSSÍVEIS ANTAGONISTAS A *Pyricularia oryzae*

A primeira etapa consistiu no isolamento de microrganismos antagônicos que apareciam como contaminantes nos trabalhos do Laboratório de Microbiologia do Departamento de Fitopatologia da ESALQ/USP. Todos os microrganismos assim isolados foram repicados para tubos de cultura com BDA inclinado para futuros testes da sua capacidade antagônica a *P. oryzae*.

Em seguida foram isolados microrganismos que apareciam no filoplano e rizoplano das plantas de arroz coletadas nas diversas localidades, bem como do solo da cultura amostrada. Para isolamento de microrganismos do solo, foi

pesado 1g, do transportado pela touceira, e transferido para tubos de cultura com 9 ml de água destilada esterilizada. Deste tubo foi retirado 1 ml da suspensão, o qual foi transferido para outro com 9 ml de água destilada estéril. Este procedimento foi realizado até diluição 10^{-4} . Com pipeta graduada de 1 ml foi colocado 0,2 ml da suspensão 10^{-4} em placas de Petri com BDA e com auxílio de alça de Drigalski este volume foi espalhado uniformemente na superfície do meio. As placas de Petri assim preparadas foram mantidas em condições de luz constante, fornecidas por 3 lâmpadas de 40 watts, luz do dia, marca Philips, colocadas a uma altura de aproximadamente 30 cm e temperatura variando de 26 - 28°C. Após 24 horas todas as colônias que surgiram foram transferidas para tubos de cultura com BDA inclinado para posterior teste de antibiose do isolado a *P. oryzae*.

Para isolamento dos microrganismos existentes nas folhas, hastes e raízes, pequenos fragmentos foram assepticamente retirados com auxílio de escalpelo e transferidos, sem prévia desinfestação superficial (a fim de não eliminar os microrganismos existentes) para placas de Petri com BDA, num total de 10 fragmentos por placa. No caso de sementes existentes nas plantas no estágio de florescimento estas foram transferidas inteiras, sem prévia desinfestação superficial, para placas de Petri com BDA, num total de 10 sementes por placa. Após 24 horas todas as colônias que apareceram foram transferidas para tubos de cultura com BDA inclinado a fim de realizar teste para verificar a antibiose a *P. oryzae*. Es

tes procedimentos foram semelhantes para os materiais coletados em Boa Esperança do Sul-SP, Jaboticabal-SP e Matão-SP.

Nos coletados em Rio Claro-SP, Piracicaba-SP, Goiânia-GO e Ribeirão Preto-SP, houve alteração no meio utilizado para isolamento. Em vez do BDA padrão (200 g de batata, 20 g de dextrose, 18 g de ágar e 1000 ml de água destilada) foi utilizado BDA/2 (100 g de batata, 10 g de dextrose, 18 g de ágar e 1000 ml de água destilada). Esta alteração foi efetuada porque em testes preliminares, com meio diluído, não houve diferença quanto ao número e tipos de microrganismos isolados. Os demais procedimentos permaneceram constantes. O isolamento de microrganismos existentes nas sementes de arroz da variedade Agulha Precoce foi semelhante aos descritos anteriormente para sementes. Para todos os isolamentos, as condições de incubação foram semelhantes às descritas anteriormente.

O material coletado em Piracicaba-SP, além do isolamento como descrito anteriormente, foi acrescido outra metodologia, consistindo na elevação do pH do meio de cultura para 10, com as demais operações semelhantes. Esta alteração foi baseada nos trabalhos de HO & KO (1979), os quais verificaram que em ágar-água com pH neste nível, crescem, praticamente, apenas actinomicetos, sendo que são esses os principais microrganismos produtores de antibióticos.

3.4. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS CAUSAREM ANTIBIOSE. A *Pyricularia oryzae*

Após isolamento de microrganismos das plantas de arroz e dos antagonistas isolados nos trabalhos de laboratório, foram realizados testes para verificar a capacidade destes inibirem o crescimento micelial de *P. oryzae* *in vitro*.

Discos de BDA de 0,5 cm de diâmetro contendo *P. oryzae*, em pleno desenvolvimento, foram transferidos para o centro de placas de Petri com BDA, permanecendo incubados sob condições de luz constante, fornecidas por 3 lâmpadas fluorescentes, luz do dia, marca Philips, 40 watts, numa altura de 30 cm, aproximadamente, e temperatura entre 25-28°C. Transcorridas 48 horas, fragmentos do meio com células dos possíveis antagonistas foram transferidos para dois pontos distanciados 3,5 cm do centro da placa de Petri com *P. oryzae* em pleno crescimento. Em seguida, as placas de Petri foram novamente colocadas para incubação nas condições anteriores. A avaliação foi realizada entre 48 e 72 horas, tomando como base a capacidade ou não de inibir o crescimento micelial de *P. oryzae* e formação de halo de inibição.

3.5. SELEÇÃO DOS ANTAGONISTAS MAIS EFICIENTES NA INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL DE *Pyricularia oryzae* IN VITRO

Após obtenção de 348 isolados de microrganismos que se comportaram como antagonísticos a *P. oryzae*, *in vitro*, foram realizados testes a fim de comparar a eficiência dos isolados e selecionar os antagonistas mais eficientes em inibir o crescimento micelial de *P. oryzae*.

Os testes foram realizados em placas de Petri contendo BDA em cujos fundos foram previamente marcados dois pontos distanciados de 7 cm. Um disco de 7 mm de diâmetro de uma cultura ativa de *P. oryzae* foi transferido para um dos pontos da placa de Petri a qual foi mantida sob as condições citadas no item 3.4, com temperatura entre 25 - 27° C. Decorridas 72 horas, um disco do isolado do antagonista a ser estudado, foi transferido para outra extremidade da placa retornando-a às condições anteriores de incubação. Depois de quatro dias foram avaliados o diâmetro da colônia de *P. oryzae* e do antagonista e o halo de inibição, todos na reta traçada entre os pontos.

A fim de facilitar a seleção dos antagonistas mais eficientes, *in vitro*, foi determinada a porcentagem de inibição de *P. oryzae*. Além da porcentagem de inibição foi determinada a relação entre a porcentagem de inibição e

o crescimento do antagonista. Como a fórmula para determinar a porcentagem de inibição exige o conhecimento do crescimento da testemunha, aos testes foi acrescido o tratamento testemunha (*P. oryzae*, isoladamente). Foram feitas três repetições para cada isolado dos antagonistas.

Por impossibilidade de ensaiar simultaneamente todos os antagonistas, os testes foram realizados em grupo de microrganismos antagônicos. Por este motivo, a seleção dos mais eficientes, foi realizada isoladamente para cada grupo de antagonista testado, sempre considerando a porcentagem de inibição e a relação porcentagem de inibição/crescimento do antagônico.

A metodologia foi estabelecida através de adaptações de trabalhos de vários autores: TOLEDO & CARDOSO (1975), THIRUMALACHAR & O'BRIEN (1977), LOCH (1978), UTKHEDE & RAHE (1980), BELL et alii (1982), BLAKEMAN & FOKKEMA (1982) e UTKHEDE & RAHE (1983)

3.6. PRESERVAÇÃO DOS MICRORGANISMOS QUE APRESENTAVAM ANTIBIOSE A *Pyricularia oryzae*

3.6.1. Em água estéril e meio agarizado

Cada um dos 348 isolados de microrganismos selecionados quanto à antibiose a *P. oryzae* foi repicado para dois tubos de cultura com BDA inclinado e incubado por 48 ho

ras, sob as condições citadas no item 3.4, com temperatura entre 25 e 27°C. Após este período foram envolvidos por papel alumínio e armazenados em geladeira para preservação. Todos os isolados preservados em tubo de cultura com BDA sofriram, de 6 em 6 meses, nova repicagem para tubos com BDA, cuja técnica é mais conhecida por repicagem sucessiva.

Antes do envolvimento com papel alumínio e armazenamento, de um dos tubos de cada isolado, foi retirado um cubo de meio de cultura contendo células do antagonista e mergulhado em vidro de penicilina de 10 ml, com 4 ml de água destilada esterilizada. A seguir os vidros foram tampados com rolhas de borracha e lacrados com tampas herméticas de alumínio através do uso de cravadora especial. Os vidros foram armazenados em condições ambientes. Todos os antagonistas foram preparados por este método, que é conhecido como de Castellani (FIGUEIREDO, 1967), durante o mês de setembro/1985. Em 01/09/87 foi avaliada a viabilidade de alguns antagonistas transferindo-se fragmentos do cubo (BDA + células dos antagonistas) ou pequenas porções da suspensão formada no vidro de penicilina para placas de Petri com BDA.

3.6.2. Em solo estéril

Os 27 microrganismos selecionados por apresentarem maior eficiência na inibição de *P. oryzae*, *in vitro*, foram repicados para tubos de cultura com BDA inclinado e

incubados nas condições citadas no item 3.4. Decorridas 48 horas, os antagonistas foram suspensos em 5 ml de água destilada esterilizada, sendo que 2,5 ml da suspensão foram transferidos para tubo de ensaio com 10 ml de solo previamente esterilizado e armazenado em condições ambientes. Para obter solo estéril houve necessidade de autoclavagem diária, durante 5 dias por 1 hora a 120°C.

Decorridos 30 dias, foi realizada a recuperação dos antagonistas de cada tubo, transferindo-se alguns grânulos para placas com BDA afim de verificar a sobrevivência dos microrganismos e também se os mesmos mantinham o poder de inibir o crescimento de *P. oryzae*. Estas avaliações foram ainda realizadas após 180 e 365 dias.

3.7. IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS ANTAGÔNICOS A *Pyricularia oryzae*

Com os isolados antagonistas considerados mais eficientes em inibir o crescimento micelial de *P. oryzae*, *in vitro*, foram realizados testes para determinação de suas posições sistemáticas, ou seja, identificá-los e caracterizá-los. Por serem caracterizados como bactérias, a identificação desses microrganismos foi baseada em BREED *et alii* (1957), BUCHANAN & GIBBONS (1975) e ROMEIRO (1976) e foram realizados os seguintes testes para todos os isolados: determi-

nação da forma celular; coloração de Gram; formação e posição do endosporo; forma, elevação e bordo da colônia em placa de Petri; crescimento em meio inclinado; produção de catalase; hidrólise de gelatina; crescimento na superfície; relação com oxigênio livre; produção de acetoina a partir da glicose (vermelho de metila e VOGES PROSKAUER); produção de ácido e gás a partir de glicose; produção de amilase, produção de ácido a partir de xilose, de arabinose e de manitol motilidade celular; crescimento em NaCl 5 e 7%; crescimento em sódio azida 0,02%; hidrólise de caseína; decomposição de tirosina; redução de nitrato para nitrito; redução de nitrato para amônia; reação em gema de ovo; crescimento a 10, 15, 20, 25, 45, 50, 55 e 60°C; dimensões celulares e presença de flagelos.

As dimensões celulares foram obtidas de 44 células através de microscopia eletrônica, com aumento de 29.100 X, sendo as microfotografias também utilizadas para determinar a posição dos flagelos.

3.8. EFEITO DO PERÍODO DE INCUBAÇÃO DO ISOLADO AP-51, EM MEIO LÍQUIDO (BD), NA INIBIÇÃO DE *Pyricularia oryzae*

Este ensaio foi realizado com a finalidade de verificar a influência do período de incubação do isolado AP-51, em meio líquido estacionário ou com agitação constante, sobre o crescimento de *P. oryzae*.

Para dois frascos Erlenmeyer de 250 ml com 100 ml de BD (batata-dextrose) autoclavados por 20 minutos a 120°C e 1 atm foi transferido um disco de 0,5 cm de diâmetro de meio de cultura (BDA) com isolado AP-51 em pleno desenvolvimento. Um frasco permaneceu estacionário e outro sob agitação constante, ambos em condições ambientes com temperatura variando entre 25 e 28°C. Este procedimento foi repetido durante 15 dias. Findo este período, obteve-se culturas líquidas do antagonista com 1 até 15 dias e intervalos de 1 dia de incubação, com ou sem agitação. Neste momento foi acrescentado 1,6 g de agar às culturas, esterilizadas e vertidas para 6 placas de Petri. No centro de três placas de Petri, foi transferido um disco de 0,5 cm de diâmetro de meio de cultura (BDA) com *P. oryzae* em pleno desenvolvimento. Essas placas foram incubadas conforme item 3.4, com temperatura entre 25 e 27°C. Após 5 dias foi realizada a leitura do crescimento micelial do fungo, através do diâmetro da colônia.

A fim de se avaliar a estabilidade das substâncias inibidoras de *P. oryzae* produzidas pelo isolado AP-51, as outras três placas de Petri, contendo meios de cultura onde o antagonico foi multiplicado, permaneceu armazenada em condições ambientes, durante 30 dias. Decorrido este período, no centro das placas foi transferido um disco de 0,5 cm de diâmetro de meio de cultura (BDA) com *P. oryzae*. A leitura do diâmetro da colônia foi realizada após 5 dias de incubação nas mesmas condições anteriores.

3.9. AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CALDO, ONDE ISOLADOS DOS ANTAGONISTAS FORAM MULTIPLICADOS, NA INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL DE *Pyricularia oryzae*

Para avaliar o efeito da concentração do caldo (BD) onde os antagonistas foram multiplicados, na inibição do crescimento micelial de *P. oryzae*, os isolados AP-3, AP-12, AP-42, AP-48, AP-49, AP-51, AP-85, AP-91, AP-94, AP-105, AP-114, AP-115, AP-137, AP-150, AP-165, AP-181, AP-183, AP-203, AP-323, AP-332, AP-339, AP-365, AP-366, AP-401, AP-420, AP-429 e AP-471, foram colocados para multiplicação em 100 ml de meio líquido (BD), contidos em frasco Erlenmeyer de 250 ml, por 10 dias, sob agitação constante, em condições ambientes. Após este período, a cultura foi esterilizada em autoclave a 120°C e 1 atm por 20 minutos.

Posteriormente, este caldo foi incorporado em BDA nas concentrações de 0,1; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0 e 20,0% (V/V) no vamente autoclavados a 120°C e 1 atm por 20 minutos e vertidos em placas de Petri. No centro de 5 placas de Petri foi transferido um disco de 0,5 cm de diâmetro de meio de cultura (BDA) com *P. oryzae* em pleno desenvolvimento e mantidas em condições ambientes com temperatura variando entre 25 - 27°C por 5 dias. Decorrido este período, foi realizada leitura do crescimento micelial de *P. oryzae* através do diâmetro da colônia e determinada a porcentagem de inibição.

Para excluir o efeito da diluição dos nutrientes do meio de cultura foi realizado ensaio semelhante ao descrito anteriormente usando as mesmas diluições com água destilada.

A partir da porcentagem de inibição foi calculado o ED₅₀, ED₉₀ e ED₉₅, para cada antagonista, transformando a porcentagem de inibição em probitos e a concentração da dosagem em Log₁₀ (FINNEY, 1971; SAS, 1985).

3.10. INFLUÊNCIA DO CALDO ONDE O ISOLADO AP-471 FOI MULTIPLICADO SOBRE A GERMINAÇÃO DE CONÍDIOS DE *Pyricularia oryzae*

O isolado AP-471, foi colocado para multiplicação em 100 ml de meio líquido (BD), contidos em frasco

Erlenmeyer de 250 ml, por 10 dias, sob agitação constante em condições ambientes com temperatura entre 25 - 28°C. Após este período, a cultura foi incorporada em ágar-água nas concentrações de 0,1; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0 e 20,0% (V/V), esterilizada em autoclave a 120°C e 1 atm por 20 minutos e vertida em placas de Petri Pyrex. Com auxílio de pipeta de 1 ml esterilizada, 0,1 ml de uma suspensão de conídios (concentração $3,1 \times 10^5$ conídios/ml), foi transferido para as placas de Petri. Com auxílio de alça de Drigalski, a suspensão foi uniformizada sobre o meio de cultura. Após 24 horas de incubação, sob condições ambientes com temperatura entre 25 - 27°C, foi realizada leitura determinando-se o número de esporos germinados e não germinados por campo de microscópio óptico comum. Foram avaliados 10 campos por placa, sendo 5 em duas direções perpendiculares entre si. Foram considerados como conídios germinados todos aqueles que apresentavam tubo germinativo normal ou não.

3.11. INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES DE LUMINOSIDADE NA INCUBAÇÃO DOS ANTAGONISTAS MULTIPLICADOS EM MEIO LÍQUIDO NA INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL DE *Pyricularia oryzae*

Os isolados AP-12, AP-85, AP-114, AP-420, AP-429 e AP-471 foram colocados sob três condições de luminosidade (escuro, luz fluorescente e próximo do ultravioleta) pa

ra multiplicação em 100 ml de meio líquido (BD), contidos em frasco Erlenmeyer de 250 ml, por um período de 7 dias. Os frascos que foram mantidos no escuro e luz fluorescente permaneceram sob agitação constante em condições ambientes (temperatura entre 22,5 e 24,5°C), enquanto os incubados em ultravioleta-próximo foram agitados por um minuto quatro vezes ao dia e mantidos numa temperatura entre 20 e 22°C. Após este período, as culturas foram esterilizadas em autoclave a 120°C e 1 atm por 20 minutos.

Posteriormente, as culturas esterilizadas foram incorporadas em BDA nas concentrações de 1,0; 2,5; 5,0; 10,0; 20,0% (V/V), autoclavadas a 120°C e 1 atm por 20 minutos e vertidas em 5 placas de Petri. No centro dessas placas de Petri foi transferido um disco de 0,5 cm de diâmetro de BDA contendo micélio de *P. oryzae* em pleno desenvolvimento, a seguir, as placas foram mantidas em condições ambientes com temperatura entre 23 e 26°C, por 4 dias. Decorrido este período foram determinados os diâmetros das colônias de *P. oryzae* e a porcentagem de inibição. Após cálculo da porcentagem de inibição foram obtidos os ED₅₀, ED₉₀ e ED₉₅, conforme apresentado no item 3.10.

3.12. EFEITO DO TRATAMENTO DE SEMENTES COM ANTAGONISTAS A *Pyricularia oryzae* NA RECUPERAÇÃO DE MICRORGANISMOS ASSOCIADOS A SEMENTES DE ARROZ (*Oryza sativa* L.) VAR. IAC-165

Antagonistas a *P. oryzae* de códigos AP-12, AP-351 e AP-471, isolados de sementes de feijão, de sementes de arroz e de folha de arroz, respectivamente, foram colocados isoladamente para multiplicação em 100 ml de meio líquido (BD) contidos em frascos Erlenmeyer de 250 ml, sob agitação constante, em condições ambientes com temperatura entre 25-27°C. Transcorridos 10 dias foi realizado o tratamento de sementes com os APs 12, 351 e 471 mergulhando as sementes por 10 minutos no caldo onde foram multiplicados e na mistura do caldo dos três antagonistas; em hipoclorito de sódio 2% por 10 minutos; em hipoclorito de sódio 2% por 10 minutos, para assepsia superficial e posteriormente com os antagonísticos e com benomyl (80 g/100 kg de sementes) através da técnica de molhagem rápida. Os microrganismos a elas associados foram avaliados através do método de papel de filtro (NEERGAARD, 1977). Este método consiste na transferência de 25 sementes de arroz para placa de Petri de plástico transparente contendo 2 discos de papel de filtro previamente umedecidos e incubação a $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$, durante 7 dias, sob ciclos alternados de luz fluorescente e escuro de 12 horas. Depois desse período, as sementes são examinadas sob microscópio estereoscópico para detecção dos microrganismos presentes e quando necessário em microscópio composto.

As sementes utilizadas foram da variedade IAC-165, provenientes da Companhia de Melhoramento CIANORTE do Estado do Paraná, cedidas pelo Engenheiro Agrônomo MS. Seiji Igarashi do IAPAR. Cada tratamento constou de 4 repetições com 25 sementes cada.

A fim de obter dados consistentes sobre o efeito do tratamento de sementes com antagonistas a *P. oryzae* na recuperação de microrganismos associados às sementes de arroz, o ensaio foi repetido duas vezes.

3.13. CONTROLE DA BRUSONE DO ARROZ COM ANTAGONISTAS A *Pyricularia oryzae* EM CONDIÇÕES DE CAMPO. I ANO AGRÍCOLA 85/86

O presente ensaio foi realizado com a finalidade de testar a capacidade dos antagonistas selecionados *in vitro*, em controlar a incidência da Brusone do arroz causada por *P. oryzae*, em condições de campo.

No campo experimental do Departamento de Fito patologia da ESALQ/USP, foram semeadas em 20/01/86, 90 sementes de arroz da variedade Agulha Precoce por metro, num espaçamento de 40 cm entre linhas. O delineamento experimental foi blocos casualizados, sendo que cada tratamento constou de 5 repetições, com parcelas compostas por 4 linhas com 2 metros de comprimento. Antes do plantio foi fei-

ta adubação na base de 40 kg/ha de nitrogênio, 50 kg/ha de P_2O_5 e 80 kg/ha de K_2O . Em 05/03/86 foi feita adubação nitrogenada em cobertura na base de 20 kg/ha de N. Quando necessário o campo foi irrigado, pelo sistema de aspersão.

Discos de BDA contendo os isolados dos antagonistas de códigos AP-3, AP-42, AP-85, AP-94, AP-137, AP-150, AP-203, AP-366, AP-420 e AP-471 foram transferidos para frascos Erlenmeyer de 250 ml contendo 100 ml de BD, 10 dias antes da pulverização no campo, sendo mantidos sob condições ambientes com temperatura entre 25 e 28°C e agitação constante. Antes da pulverização o caldo foi diluído para 1 litro, recebendo 1 gota de Tween 20. Desta suspensão foram aplicados 200 ml/parcela. Como tratamento padrão foi utilizado ka sugamicina 2% (produto comercial Kasumin na dosagem de 2 l/ha) nas mesmas condições que os antagonistas.

As pulverizações dos produtos foram realizadas em 01/04/86, 08/04/86 e 18/04/86, durante o período compreendido entre as 07:00 e 18:00 horas com auxílio de pulverizador "spray brudden", com capacidade para 1 litro.

A avaliação do experimento foi realizada em 01/05/86 através da leitura visual dos sintomas na folha bandeira, na inserção das folhas bandeira e no nó. Para avaliação da Brusone na folha bandeira foi utilizada a escala de 0 - 9 do sistema padrão para avaliação de arroz do IRRI (PRABHU *et alii*, 1982), sendo: 0 - ausência de sintomas; 1 -

pontuações pequenas de cor marrom, do tamanho da ponta de um alfinete; 2 - pontuações maiores do que a cabeça de um alfinete e de coloração marrom; 3 - lesões pequenas, cinzentas, arredondadas ou ligeiramente alongadas e necróticas; 4 - lesões típicas da Brusone, elípticas, com 1 a 2 cm de comprimento e geralmente restritas entre duas nervuras principais, não atingindo mais do que 2% da área foliar; 5 - área foliar infectada inferior a 10%; 6 - área foliar infectada em torno de 25%; 7 - área foliar infectada em torno de 50%; 8 - área foliar infectada em torno de 75% e 9 - área foliar infectada em torno de 100%. Para avaliação da Brusone na inserção da folha bandeira a escala utilizada foi: 1 - sem sintomas; 2 - apenas pontuações; 3 - lesões até 1 cm de comprimento e 4 - lesões com mais de 1 cm de comprimento. Para avaliação da Brusone do nó a escala foi: 1 - sem sintomas; 2 - início de anelamento do nó; 3 - nó anelado e 4 - nó quebrado, tombamento. As avaliações foram realizadas em 10 plantas das linhas centrais, as quais foram tomadas ao acaso, antes do início das pulverizações e marcadas com fita branca.

Não foi determinada a produção das parcelas, principalmente, devido ao intenso ataque de pássaros.

3.14. CONTROLE DA BRUSONE DO ARROZ COM ANTAGONISTAS A
Pyricularia oryzae, EM CONDIÇÕES DE CAMPO. II.
ANO AGRÍCOLA 86/87

No campo experimental do Departamento de Fitopatologia da ESALQ/USP, foram semeadas em 26/09/86, 90 sementes de arroz da variedade Agulha Precoce por metro, num espaçamento de 40 cm entre linhas. O delineamento experimental foi blocos casualizados, sendo que cada tratamento constou de 5 repetições, com parcelas compostas de 4 linhas com 2 metros de comprimento. Antes do plantio foi feita adubação com 625 kg/ha da fórmula 4-14-8. Em 04/11/86 e 20/11/86, foram feitas adubações nitrogenadas em cobertura na base de 20 kg/ha de N. Quando necessário o campo foi irrigado por aspersão.

A multiplicação e preparação das suspensões dos antagonistas para pulverização foram semelhantes à metodologia descrita para o ensaio anterior (item 3.13). Foram testados os isolados AP-3, AP-85, AP-150, AP-203, AP-420 e AP-471 (esses isolados foram utilizados devido aos resultados obtidos nos ensaios dos itens 3.9 e 3.12), sendo as respectivas suspensões aplicadas com e sem adição de açúcar (dextrose 10 g/l). Também foi avaliado o efeito do caldo de batata com e sem açúcar (dextrose 10 g/l). Como tratamentos padrões foram utilizados kasugamicina 2% (produto comercial Kasumin na dosagem 2 l/ha) e benomyl (produto comercial Benlate 50 PM, na dosagem 500 g/ha).

As pulverizações dos produtos foram realizadas em 13/12/86, 29/12/86 e 11/01/87, durante o período compreendido entre 14:00 e 18:00 horas, com auxílio de pulverizador "spray brudden", com capacidade para 1 litro. As pulverizações foram mais esparsas que 85/86 por causa das chuvas.

A avaliação do experimento foi realizada em 26/01/87 através da leitura visual dos sintomas na folha bandeira e no nô, seguindo as mesmas escalas de notas apresentadas no item 3.13. As avaliações foram realizadas em 10 plantas das linhas centrais tomadas ao acaso. Além dessas duas avaliações, em 01/03/87 foi determinada a porcentagem de panículas com Brusone por parcela. Para fazer esta determinação todas as panículas foram colhidas e separadas em lotes de sadias e doentes. Dessas panículas foram separadas as sementes para realização de teste de patologia de sementes afim de verificar a influência dos tratamentos sobre a qualidade fitossanitária das sementes. A metodologia de avaliação foi a mesma apresentada no item 3.12, alterando-se a incubação para 12 horas de luz fluorescente mais luz próxima do ultravioleta e 12 horas escuro. Foi considerado para avaliação a presença de *P. oryzae*, *Helminthosporium oryzae* e *Phoma* spp.

4. RESULTADOS

4.1. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS CAUSAREM ANTIBIOSE A *Pyricularia oryzae*

De um total de 472 isolados de microrganismos das diferentes localidades 348 comportaram-se como antagonistas a *P. oryzae*, perfazendo 75,9% do total, sendo que: 31, 49, 7, 37, 33, 108, 25, 37 e 21 isolados de microrganismos antagonísticos foram obtidos dos trabalhos do Laboratório de Fitopatologia da ESALQ/USP, de material coletado em Boa Esperança do Sul-SP, de sementes da variedade Agulha Precoce originárias de Campinas-SP, de material coletado em Jaboticabal-SP, Matão-SP, Rio Claro-SP, Piracicaba-SP, Goiânia-GO e Ribeirão Preto-SP, respectivamente. Estes valores perfazem 88,6; 98,0; 100; 84,1; 97,1; 59,0; 71,3; 72,6 e 58,4% dos microrganismos isolados em cada localidade.

Nos Apêndices de 1 a 8 são apresentados, de forma qualitativa, os resultados referentes a antibiose obtida para cada isolado de microrganismos antagonísticos que apareceram como contaminantes dos trabalhos do Laboratório do Departamento de Fitopatologia da ESALQ/USP e dos isolados das

plantas de arroz coletadas nos municípios de Boa Esperança do Sul-SP, Campinas-SP, Jaboticabal-SP, Matão-SP, Rio Claro-SP, Piracicaba-SP, Goiânia-GO e Ribeirão Preto-SP, respectivamente.

4.2. SELEÇÃO DOS ANTAGONISTAS MAIS EFICIENTES NA INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL DE *Pyricularia oryzae*, IN VITRO

De acordo com os resultados apresentados nos Apêndices de 9 a 21, foram selecionados para trabalhos posteriores os isolados: AP-3, AP-12, AP-42, AP-48, AP-49, AP-51, AP-85, AP-91, AP-94, AP-105, AP-114, AP-115, AP-137, AP-150, AP-165, AP-181, AP-183, AP-203, AP-323, AP-332, AP-339, AP-365, AP-366, AP-401, AP-420, AP-429 e AP-471. A seleção foi baseada na porcentagem de inibição do crescimento micelial de *P. oryzae* e na relação entre a porcentagem de inibição e o crescimento do antagonista para cada grupo de antagonistas testado. Não são apresentados os dados relativos às áreas dos crescimentos em meio de cultura devido à similaridade com os dos diâmetros.

A faixa da porcentagem de inibição do crescimento micelial de *P. oryzae* por microrganismos antagônicos ficou entre 7,53 e 33,73% para o AP-24 e AP-471, respectivamente. Há necessidade de lembrar que sempre *P. oryzae* desenvolveu-se durante 72 horas na ausência do antagonista, vis

to que, transferido o antagonico antes ou junto com *P. oryzae* no meio de cultura, o agente causal da Brusone praticamente não cresce.

4.3. PRESERVAÇÃO DOS MICRORGANISMOS QUE APRESENTARAM ANTIBIOSE A *Pyricularia oryzae*

Os resultados obtidos evidenciam que a preservação dos microrganismos selecionados quanto à maior eficiência em inibir *P. oryzae* em solo estéril, mostrou-se efetiva até pelo menos 365 dias. Pois em 20/01/86, 20/06/86 e 20/12/86, os microrganismos cujas suspensões de células transferidas para solo estéril em 20/12/85, foram avaliados em relação à sobrevivência e à manutenção da capacidade antagonica, apresentaram respostas positivas.

A preservação dos antagonistas em água estéril (método de Castellani) mostrou-se efetiva até pelo menos 2 anos, pois quando recuperados os antagonistas de código AP-366, AP-374, AP-393, AP-413 e AP-422 em 01/09/87, que tinham sido preparados em 09/85, mantiveram a viabilidade.

Tanto para a preservação em solo estéril como através do método de Castellani serão realizados testes anuais para verificar se os antagonistas a *P. oryzae* mantêm a viabilidade.

4.4. IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS ANTAGÔNICOS A

Pyricularia oryzae

Após determinação da morfologia celular, das dimensões das células, dos aspectos das colônias em meios de cultura, do crescimento em diferentes temperaturas, das reações aos métodos de coloração, das reações a meios seletivos e das reações bioquímicas, foi verificado que todos os microrganismos antagônicos selecionados por apresentarem maior eficiência em inibir *P. oryzae*, *in vitro*, comportaram-se de forma semelhante nos testes. Assim, são apresentados, de forma global, os resultados obtidos (Tabela 1). Com auxílio do "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" 7^a e 8^a edição, respectivamente editadas por BREED *et alii* (1957) e BUCHANAN & GIBBONS (1975) e de NORRIS *et alii* (1981), as bactérias com capacidade de inibir *P. oryzae*, codificadas em: AP-3, AP-12, AP-42, AP-48, AP-49, AP-51, AP-85, AP-91, AP-94, AP-105, AP-114, AP-115, AP-137, AP-150, AP-165, AP-181, AP-183, AP-203, AP-323, AP-332, AP-339, AP-365, AP-366, AP-401, AP-420, AP-429 e AP-471 foram identificadas como:

Classe : Schizomycetes

Ordem : Eubacteriales

Família: Bacillaceae

Gênero : *Bacillus*

Espécie: *Bacillus subtilis*

TABELA 1. Resultados dos testes para identificação dos microrganismos antagonistas a *Pyricularia oryzae*, selecionados por apresentarem maior eficiência na inibição do patógeno in vitro¹.

I.	FORMA DA CÉLULA	:	Bastonete
II.	FORMAÇÃO DE ENDOSPORO	:	Positiva
III.	POSIÇÃO DO ENDOSPORO	:	Central
IV.	COLORAÇÃO GRAM	:	Positivo
V.	MOTILIDADE	:	Positiva
VI.	POSIÇÃO DOS FLAGELOS	:	Peritríquea
VII.	RELAÇÃO COM OXIGÊNIO LIVRE:		Aeróbica
VIII.	PROVAS BIOQUÍMICAS		
	1. Produção de catalase	:	POSITIVO
	2. Produção de ácido a partir da glicose	:	POSITIVO
	3. Produção de gás a partir da glicose	:	NEGATIVO
	4. Produção de acetoina a partir de glicose:		POSITIVO
	5. Hidrólise de gelatina	:	POSITIVO
	6. Produção de ácido a partir de xilose	:	POSITIVO
	7. Produção de ácido a partir da arabinose	:	POSITIVO
	8. Produção de ácido a partir de manitol	:	POSITIVO
	9. Produção de amilase	:	POSITIVO
	10. Reação em gema de ovo	:	NEGATIVO
	11. Hidrólise de caseína	:	POSITIVO
	12. Decomposição de tirosina	:	NEGATIVO
	13. Redução de nitrato para nitrito	:	POSITIVO
	14. Redução de nitrato para amônia	:	POSITIVO
	15. Fermentação de sacarose	:	POSITIVO
IX.	TEMPERATURA DE CRESCIMENTO:		Cresce a 15, 20, 25, 45 e 50°C
X.	CRESCIMENTO EM NaCl 5 e 7%:		POSITIVO
XI.	CRESCIMENTO EM SÓDIO AZIDA 0.02%:		NEGATIVO
XII.	DIMENSÕES CELULARES ² :		Comprimento: 2,1 µm; largura : 0,78 µm
XIII.	FORMA, ELEVAÇÃO E BORDO DA COLÔNIA EM PLACA DE PETRI:		
	Forma:		FILAMENTOSA - RIZÓIDE
	Elevação:		ACHATADA
	Bordo:		EROSADO - FILAMENTOSO
XIV.	CRESCIMENTO EM MEIO INCLINADO:		ARBORESCENTE
XV.	CRESCIMENTO NA SUPERFÍCIE:		PELÍCULA MEMBRANOSO

¹ Os resultados são válidos para AP-3, AP-12, AP-42, AP-48, AP-49, AP-51, AP-85, AP-91, AP-94, AP-105, AP-114, AP-115, AP-137, AP-150, AP-165, AP-181, AP-183, AP-203, AP-323, AP-332, AP-339, AP-365, AP-366, AP-401, AP-420, AP-429 e AP-471, pois apresentaram respostas semelhantes em relação aos testes.

² As dimensões celulares foram obtidas em microscopia eletrônica.

4.5. EFEITO DO PERÍODO DE INCUBAÇÃO DE *Bacillus subtilis* (ISOLADO AP-51), EM MEIO LÍQUIDO (BD), SOBRE A INIBIÇÃO DE *Pyricularia oryzae*

A multiplicação de *B. subtilis* (isolado AP-51) em meio líquido (BD) com ou sem agitação constante liberou me tabólitos, em concentração suficiente para inibir completamen te o crescimento micelial de *P. oryzae* após um dia de incuba ção. Os meios de cultura onde o isolado AP-51 foi multipli- cado por 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 e 15 dias, com ou sem agitação, inibiram completamente o cresci- mento de *P. oryzae*.

As substâncias que inibem o fungo apresentam, no mínimo, estabilidade por 30 dias, visto que, nos meios armazenados, em condições ambientes, por este período o cre scimento do agente causal da Brusone foi nulo. Fato interes- sante foi que mesmo armazenando os meios em condições ambien tes (sobre o balcão) não houve contaminação em nenhuma das 45 placas.

Não foi possível verificar o efeito do perío- do de incubação de *B. subtilis*, pois a avaliação foi qualita tiva. Na testemunha (zero hora de incubação) houve cresci- mento de *P. oryzae*, o diâmetro médio das colônias foi de 4,35 cm, enquanto nos demais tratamentos não houve cre scimen- to. Também não foi possível diferenciar o efeito da agita- ção do meio de cultura na produção de substâncias inibidoras

de *P. oryzae*, visto que, o crescimento foi nulo tanto para as culturas estacionárias quanto para as culturas agitadas, quando a incubação foi superior ou igual a 1 dia.

Os metabólitos liberados por *B. subtilis*, os quais inibem *P. oryzae*, são termoestáveis, pois as culturas foram autoclavadas a 120°C e 1 atm por 30 minutos e ainda permaneceram ativas contra o patógeno.

4.6. AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO CALDO ONDE ISOLADOS DE *Bacillus subtilis* FORAM MULTIPLICADOS, NA INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL DE *Pyricularia oryzae*

Com o aumento da concentração de caldo onde os isolados de *B. subtilis* foram multiplicados, no meio de cultura, há um aumento na porcentagem de inibição do crescimento micelial de *P. oryzae* (Tabela 2).

Nas concentrações de 5; 7,5 e 10,0% de caldo ocorreu inibição média de 81, 89 e 92%, respectivamente, no crescimento micelial de *P. oryzae*. Por outro lado, se forem considerados os antagonistas mais eficientes, a média sobe para 92, 94 e 96%, respectivamente. O AP-12 inibiu 90% o crescimento micelial de *P. oryzae* na concentração de 2,5%.

O efeito da diluição dos nutrientes do meio de cultura foi excluído, visto que, não houve redução no

crescimento do fungo em diluições de até 50% com água destilada (Tabela 3).

TABELA 2. Influência da concentração de caldo (BD) onde os isolados de *Bacillus subtilis* foram multiplicados na inibição do crescimento micelial de *Pyricularia oryzae*.

INIBIÇÃO ¹ (%)	C O N C E N T R A Ç Ã O (%)							
	0,0	0,1	1,0	2,5	5,0	7,5	10,0	20,0
	²							
AP-3	0,0	5,0	54,0	84,0	82,0	92,0	92,0	98,0
AP-12	0,0	-	-	90,0	93,0	94,0	96,0	98,0
AP-42	0,0	12,0	39,0	78,0	84,0	92,0	96,0	100,0
AP-48	0,0	12,0	24,0	40,0	77,0	84,0	88,0	-
AP-49	0,0	5,0	59,0	71,0	89,0	92,0	98,0	-
AP-51	0,0	14,0	82,0	88,0	90,0	93,0	95,0	-
AP-85	0,0	9,0	32,0	66,0	91,0	92,0	93,0	97,0
AP-91	0,0	9,0	48,0	83,0	88,0	90,0	94,0	100,0
AP-94	0,0	21,0	73,0	79,0	76,0	76,0	80,0	94,0
AP-105	0,0	-	-	74,0	82,0	86,0	84,0	87,0
AP-114	0,0	-	-	80,0	85,0	90,0	91,0	100,0
AP-115	0,0	3,0	29,0	71,0	86,0	89,0	93,0	98,0
AP-137	0,0	0,0	13,0	43,0	86,0	92,0	96,0	100,0
AP-150	0,0	4,0	40,0	79,0	84,0	85,0	87,0	100,0
AP-165	0,0	6,0	48,0	85,0	90,0	91,0	93,0	-
AP-181	0,0	6,0	30,0	76,0	81,0	85,0	94,0	100,0
AP-183	0,0	3,0	50,0	82,0	86,0	92,0	94,0	100,0
AP-323	0,0	3,0	37,0	74,0	84,0	93,0	96,0	99,0
AP-332	0,0	7,0	72,0	80,0	89,0	93,0	94,0	100,0
AP-339	0,0	6,0	8,0	26,0	71,0	54,0	59,0	-
AP-365	0,0	8,0	23,0	38,0	65,0	94,0	95,0	-
AP-366	0,0	-	-	85,0	83,0	88,0	96,0	98,0
AP-420	0,0	13,0	33,0	76,0	93,0	97,0	99,0	-
AP-429	0,0	9,0	48,0	53,0	93,0	97,0	100,0	-
AP-471	0,0	12,0	27,0	60,0	94,0	95,0	98,0	-

¹ Porcentagem de inibição = $\frac{\text{crescimento da testemunha} - \text{crescimento do tratamento}}{\text{crescimento da testemunha}} \times 100$.

² Os dados são médias de 5 repetições.

TABELA 3. Influência da diluição do caldo (BD), no crescimento micelial de *Pyricularia oryzae*.

Diluição ¹ (%)	Diâmetro da Colônia (cm)	Inibição (%)
0,0	5,53 ²	0,0
1,0	5,55	0,0
2,5	5,53	0,0
5,0	5,43	1,0
7,5	5,57	0,0
10,0	5,40	2,0
25,0	5,20	5,0
50,0	5,35	3,0

¹ Para diluição foi utilizada água destilada

² Média de 3 repetições.

Os dados de ED₅₀, ED₉₀ e ED₉₅ facilitam a observação dos isolados de *B. subtilis* que se comportam como mais eficientes em inibir o crescimento de *P. oryzae*. Verifica-se que os isolados AP-12, AP-51, AP-332 são os que inibem em 90 e 95% o crescimento com as menores doses do produto, média de 3,69 e 8,24, respectivamente, portanto, os mais eficientes. Enquanto, os isolados AP-94, AP-339 e AP-105 são os menos eficientes, pois as dosagens sobem em média para 41,69 e 142,62, respectivamente, para obtenção da mesma porcentagem de inibição (Tabela 4).

TABELA 4. Doses estimadas do caldo (BD) onde isolados de *Bacillus subtilis* foram multiplicados que inibem o crescimento micelial de *Pyricularia oryzae* em 50, 90 e 95% (ED₅₀, ED₉₀ e ED₉₅)¹.

Isolado	ED ₅₀	ED ₉₀	ED ₉₅
AP-3	0,91	6,35	11,01
AP-12	0,07	2,74	7,73
AP-42	0,93	6,45	11,18
AP-48	1,89	18,43	35,15
AP-49	0,90	5,40	8,98
AP-51	0,42	3,74	6,96
AP-85	1,19	7,69	13,06
AP-91	0,85	5,78	9,96
AP-94	0,51	18,38	50,84
AP-105	0,06	38,70	242,26
AP-114	0,73	6,65	12,46
AP-115	1,53	7,50	11,76
AP-137	2,53	6,63	8,71
AP-150	1,24	8,09	13,77
AP-165	0,89	5,66	9,53
AP-181	1,34	7,93	13,12
AP-183	1,01	5,48	8,85
AP-323	1,29	6,23	9,73
AP-332	0,65	4,61	8,02
AP-339	5,34	66,00	134,75
AP-365	2,06	13,17	22,29
AP-366	0,39	6,20	13,58
AP-420	0,89	5,16	8,50
AP-429	1,01	5,84	9,58
AP-471	1,14	6,77	11,21

¹ Os valores de ED foram calculados de acordo com FINNEY (1971) e SAS (1985).

4.7. INFLUÊNCIA DO CALDO ONDE *Bacillus subtilis* FOI MULTIPLICADO SOBRE A GERMINAÇÃO DE CONÍDIOS DE *Pyricularia oryzae*

Com o aumento na concentração do caldo, onde *B. subtilis* (isolado AP-471) foi multiplicado, no meio de cultura, houve redução na porcentagem de germinação dos conídios de *P. oryzae* presentes no meio (Tabela 5). Foram considerados conídios germinados todos os que apresentavam tubo germinativo normal ou não. No entanto, foi verificado que com o aumento da concentração do caldo presente no meio houve aumento no número de conídios considerados germinados cujo tubo germinativo apresentava-se deformado. Verifica-se desta forma, que os metabólitos liberados por *B. subtilis* causam inibição na germinação e alteração na estrutura do tubo germinativo dos conídios de *P. oryzae*.

TABELA 5. Influência da concentração do caldo onde *Bacillus subtilis* (AP-471) foi multiplicado sobre a germinação de conídios de *Pyricularia oryzae*.

Concentração (%)	Conídios germinados (%)
0,0	81,75 ¹ a
0,1	69,50 ab
1,0	60,45 b
2,5	60,30 b
5,0	54,45 b
7,5	52,15 bc
10,0	54,30 b
20,0	34,00 c

¹ Média de 20 leituras. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si (Tukey 5%).

4.8. INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES DE LUMINOSIDADE NA INCUBAÇÃO DE *Bacillus subtilis* MULTIPLICADO EM MEIO LÍQUIDO NA INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL DE *Pyricularia oryzae*

A multiplicação de *B. subtilis* em meio líquido (BD), sob diferentes condições de luminosidade durante a incubação (escuro, luz fluorescente e luz próxima do ultravioleta), possibilitou a produção de metabólitos antagônicos a *P. oryzae*. No entanto, a produção foi diferenciada de acordo com a incubação. Para todos os isolados de *B. subtilis* testados foi verificado que quando incubados em condições de luz fluorescente apresentaram maior porcentagem de inibição do crescimento micelial de *P. oryzae* do que aqueles incubados no escuro ou em luz próximo do ultravioleta (Tabela 6). Os isolados incubados no escuro apresentaram menor capacidade de inibição de *P. oryzae* que aqueles em luz fluorescente, no entanto, as diferenças foram pequenas. A incubação de *B. subtilis* numa fonte luminosa próxima do ultravioleta foi altamente prejudicial para a produção de metabólitos antagônicos a *P. oryzae* (Tabela 6).

Os resultados apresentados em valores de ED₅₀, ED₉₀ e ED₉₅, confirmam as afirmações anteriores, haja visto, que os valores em média dos EDs quando o caldo foi incubado em luz próxima do ultravioleta são muito superiores àqueles apresentados para a incubação no escuro e luz fluorescente (Tabela 7).

TABELA 6. Influência das condições de luminosidade na incubação de *Bacillus subtilis*, multiplicado em meio líquido na inibição do crescimento micelial de *Pyricularia oryzae*.

Concentração (%)	PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO																	
	AP-12			AP-85			AP-114			AP-420			AP-429			AP-471		
	ES	LF	NUV	ES	IF	NUV	ES	LF	NUV	ES	LF	NUV	ES	LF	NUV	ES	LF	NUV
0,0	0,0 ¹	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
1,0	11,0	14,0	11,0	7,0	13,0	11,0	8,0	10,0	0,0	0,0	2,0	2,0	0,0	8,0	0,5	0,1	13,0	0,0
2,5	16,0	33,0	31,0	8,5	16,0	13,0	21,0	61,0	6,0	3,0	7,0	4,0	0,1	18,0	4,0	14,0	63,0	10,0
5,0	41,0	58,0	40,0	28,0	46,0		44,0		14,0	5,0	22,0	4,4	7,5	71,0	4,5	21,0	87,0	15,0
10,0	88,0	89,0	74,0	93,0	96,0	25,0	89,0	94,0	24,0	10,0	64,0	10,0	22,0	95,0	3,0	38,0	89,0	45,0
20,0	91,0	93,0	77,0	96,0	100,0	28,0	93,0	94,0	52,0	90,0	91,0	11,0	83,0	100,0	9,0	87,0	96,0	69,0

¹ Média de 5 repetições

ES = Escuro; LF = luz fluorescente; NUV = luz próximo do ultravioleta

AP = antagonista a *P. oryzae*

TABELA 7. Doses estimadas do caldo (BD) onde isolados de *Bacillus subtilis* foram multiplicados, sobre diferentes condições de luminosidade que inibem o crescimento micelial de *Pyricularia oryzae* em 50, 90 e 95% (ED₅₀, ED₉₀ e ED₉₅).

Isolado	Escuro			Luz Fluorescente			Próximo Ultravioleta		
	ED ₅₀ ¹	ED ₉₀	ED ₉₅	ED ₅₀	ED ₉₀	ED ₉₅	ED ₅₀	ED ₉₀	ED ₉₅
AP-12	4,93	17,37	24,82	3,60	14,27	21,08	5,67	36,46	61,80
AP-85	5,44	14,16	18,58	4,04	11,27	15,06	217,61	50231,32	234929,03
AP-114	4,67	15,14	21,13	2,53	9,24	13,34	20,02	95,20	148,13
AP-420	13,23	26,78	32,69	7,78	21,04	27,90	1231,75	105360,54	371891,52
AP-429	13,00	26,15	31,87	3,57	8,56	10,98	3622,28	412276,86	1577956,59
AP-471	9,66	32,07	45,07	2,23	8,28	12,00	11,97	44,60	64,76

¹ Os valores de ED foram calculados de acordo com FINNEY (1971) e SAS (1985).

Pelos resultados obtidos não é possível determinar se o efeito foi em induzir menor produção desses metabólitos ou em inibir a multiplicação da bactéria ou inativar os metabólitos produzidos.

É interessante observar que os isolados AP-12, AP-114 e AP-471 apresentaram os valores de ED₅₀, ED₉₀ e ED₉₅ muito inferiores aos isolados AP-85, AP-420 e AP-429, indicando diferença de comportamento em relação à luz (Tabela 7).

4.9. EFEITO DO TRATAMENTO DE SEMENTES COM *Bacillus subtilis* NA FREQUÊNCIA DE MICRORGANISMOS ASSOCIADOS A SEMENTES DE ARROZ (*Oryza sativa* L. VARIEDADE IAC-165)

Nas amostras de sementes estudadas nos dois ensaios foram recuperados os seguintes microrganismos nas sementes de arroz variedade IAC-165: *P. oryzae*, *Helminthosporium oryzae*, *Helminthosporium* sp., *Phoma* spp., *Rhynchosporium oryzae*, *Rhizopus* sp., *Epicoccum* sp., *Nigrospora* sp., *Alternaria tenuis*, *A. longuissima*, *Curvularia* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Fusarium* sp., *Cladosporium* sp., *Neurospora* sp., um fungo não identificado e bactérias (Tabelas 8 e 9).

TABELA 8. Efeito do tratamento de sementes de arroz (*Oryza sativa* L. var. IAC-165) com *Bacillus subtilis* sobre a frequência (%) de microrganismos a elas associados.

Microrganismos detectados	Tratamento									
	Testemunha	Benomyl ⁽¹⁾	HS ⁽²⁾	AP-12 ⁽³⁾	AP-351	AP-471	HS+AP-12	HS+AP-351	HS+AP-471	AP-12 + AP-351 + AP-471
<i>Pyricularia oryzae</i>	29	0	3	15	8	6	10	7	12	10
<i>Helminthosporium oryzae</i>	7	0	1	0	1	2	0	0	2	2
<i>Rhynchosporium oryzae</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
<i>Phoma</i> spp.	2	0	0	6	1	1	0	1	0	4
<i>Nigrospora</i> sp.	4	0	2	0	0	0	0	0	0	0
<i>Curvularia</i> sp.	8	0	0	0	0	3	1	1	3	2
<i>Neurospora</i> sp.	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0
<i>Epicoecum</i> sp.	42	1	6	3	2	4	2	2	5	5
<i>Cladosporium</i> sp.	14	0	7	1	5	3	3	1	0	7
<i>Aspergillus</i> sp.	18	2	0	5	1	4	2	0	0	7
<i>Penicillium</i> sp.	25	0	1	20	2	8	2	3	1	16
<i>Alternaria tenuis</i>	7	0	1	0	0	0	1	0	2	1
<i>Rhizopus</i> sp.	5	2	0	0	0	16	3	2	0	1
Fungo não identificado	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1
Bactéria	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
Total	161	5	22	52	20	47	28	18	23	57

1 Benomyl (80 g/100 kg de semente) - tratamento molhagem rápida

2 A desinfestação com Hipoclorito de sódio 2% foi realizada mergulhando-se as sementes na solução por 10 minutos.

3 As sementes tratadas com os antagonistas (AP) foram mergulhadas por 10 minutos no caldo de batata, no qual os isolados de *B. subtilis* foram multiplicados por 10 dias.

TABELA 9. Efeito do tratamento de sementes de arroz (*Oryza sativa* L. var. IAC-165) com *Bacillus subtilis* sobre a frequência (%) de microrganismos a elas associados.

Microrganismos detectados	Tratamento									AP-12 +
	Testemunha	Benomyl (1)	HS (2)	AP-12 (3)	AP-351	AP-471	HS+AP-12	HS+AP-351	HS+AP-471	AP-351 + AP-471
<i>Pyricularia oryzae</i>	33	0	3	14	3	10	6	4	6	7
<i>Helminthosporium oryzae</i>	2	0	2	1	0	0	1	2	1	1
<i>Helminthosporium</i> sp.	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Phoma</i> spp.	7	0	0	2	0	1	0	0	1	0
<i>Rhynchosporium oryzae</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Rhizopus</i> sp.	9	15	0	3	0	0	0	0	0	0
<i>Epicoccum</i> sp.	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Nigrospora</i> sp.	10	2	0	3	1	2	0	1	0	3
<i>Alternaria tenuis</i>	7	0	0	0	0	0	1	0	0	0
<i>Alternaria longuissima</i>	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0
<i>Curvularia</i> sp.	11	0	2	4	1	3	1	1	0	0
<i>Aspergillus</i> sp.	5	0	1	9	9	7	0	0	0	5
<i>Penicillium</i> sp.	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Fusarium</i> sp.	9	0	0	3	1	0	2	0	5	1
<i>Cladosporium</i> sp.	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Fungo não identificado	0	3	0	2	3	4	2	1	0	3
Bactéria	3	0	1	0	1	2	2	4	1	0
Total	102	21	13	41	19	30	15	13	14	20

1 benomyl (80g/100 kg de semente) - tratamento molhagem rápida.

2 A desinfestação com Hipoclorito de sódio 2% foi realizada mergulhando-se as sementes na solução por 10 minutos

3 As sementes tratadas com os antagonistas (AP) foram mergulhadas no caldo de batata por 10 minutos, no qual os isolados de *B. subtilis* foram multiplicados por 10 dias.

Verifica-se através das Tabelas 8 e 9 que os tratamentos de sementes com benomyl, hipoclorito de sódio 2% e *B. subtilis* (AP-12, AP-351 e AP-471), antagonistas a *P. oryzae*, reduziram significativamente a frequência total de microrganismos recuperados das sementes quando comparados com o tratamento testemunha, demonstrando assim suas eficiências. Os tratamentos com *B. subtilis* reduziram a incidência de *P. oryzae*, *H. oryzae*, *Phoma* spp. e *R. oryzae*, que são os mais importantes patógenos da cultura. No entanto, as reduções foram similares ou inferiores aos tratamentos com hipoclorito de sódio 2% e benomyl. Todos os tratamentos reduziram a frequência dos fungos de armazenamento e de saprófitas.

4.10. CONTROLE DA BRUSONE DO ARROZ CAUSADA POR *Pyricularia oryzae* COM ISOLADOS DE *Bacillus subtilis* EM CONDIÇÕES DE CAMPO. I. ANO AGRÍCOLA 85/86

Na Tabela 10 são apresentadas as notas médias da incidência da Brusone nas folhas bandeira, nas inserções das folhas bandeira e nos nós das plantas de arroz pulverizadas com *B. subtilis* e seus metabólitos e kasugamicina 2%, (Kasumin 2 l/ha), produzida por *Streptomyces kasugaensis*.

TABELA 10. Efeito de pulverizações com *Bacillus subtilis* sobre a incidência da Brusone causada por *Pyricularia oryzae* na folha bandeira, na inserção da folha bandeira e no n^o de plantas de arroz. Ano Agrícola 85/86.

Tratamento	Folha bandeira ¹	Inserção da folha bandeira ²	N ^o ³
1. Testemunha	3,34	3,26	2,24
2. kasugamicina 2% (Kasumin 2 l/ha)	2,64	2,44	1,78
3. AP-3	3,12	3,32	2,44
4. AP-42	3,54	3,05	2,16
5. AP-85	3,15	3,19	2,39
6. AP-94	4,70	3,31	2,79
7. AP-137	3,77	3,51	2,93
8. AP-150	2,61	2,94	2,26
9. AP-203	2,95	3,42	2,53
10. AP-366	3,73	3,20	2,40
11. AP-420	3,02	3,33	2,65
12. AP-471	3,63	3,06	2,04

1 Nota variando de 0 a 9, conforme "Sistema Padrão para Avaliação de Arroz" do IRRI; item 3.13.

2 Nota variando de 1 a 4, conforme apresentado nos Materiais e Métodos, item 3.13.

3 Nota variando de 1 a 4, conforme apresentado nos Materiais e Métodos, item 3.13.

A análise estatística mostrou não existir diferenças significativas entre os tratamentos. Os dados são médias de 4 repetições.

AP = Antagonista a *P. oryzae*

Os tratamentos com o antagonista AP-150 e kasugamicina 2% foram os que apresentaram menor incidência da Brusone na folha bandeira e na inserção da folha bandeira, enquanto que no nó, kasugamicina 2% destacou-se dos demais tratamentos. Entretanto, o que se verifica na Tabela 10, é que a ocorrência da Brusone, avaliada através de notas na folha bandeira, na inserção da folha bandeira e no nó, foi muito próxima para todos os tratamentos nas condições do ensaio, não existindo diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos.

4.11. CONTROLE DA BRUSONE DO ARROZ CAUSADA POR *Pyricularia oryzae* COM ISOLADOS DE *Bacillus subtilis* EM CONDIÇÕES DE CAMPO.

II. ANO AGRÍCOLA 86/87

A ocorrência da Brusone, avaliada através de notas na folha bandeira e no nó, foi semelhante para todos os tratamentos não existindo diferenças significativas entre si (Tabela 11). No entanto, os tratamentos com o antagonista AP-150, com e sem dextrose, apresentaram menor incidência da Brusone na folha bandeira, com comportamento superior a kasugamicina 2% e benomyl. Não foi verificado efeito da aplicação de açúcar junto com o caldo onde *B. subtilis* foi multiplicado.

TABELA 11. Efeito de pulverização com *Bacillus subtilis* sobre incidência da Brusone causada por *Pyricularia oryzae* nas folhas bandeira e nos nós de plantas de arroz. Ano Agrícola 86/87.

Tratamento	Folha bandeira ¹	Nó ²
1. Testemunha	1,14	0,06
2. Kasugamicina 2% (Kasumin 1ℓ/ha)	1,08	0,00
3. Benomyl (Benlate 50 PM 500 g/ha)	1,12	0,02
4. AP-150	0,84	0,00
5. AP-203	1,24	0,06
6. AP-420	1,10	0,00
7. AP-3	0,98	0,02
8. AP-85	1,52	0,18
9. AP-471	1,20	0,04
10. BD	0,92	0,00
11. AP-150 + Dextrose (10g/ℓ)	0,82	0,06
12. AP-203 + Dextrose (10g/ℓ)	1,20	0,02
13. AP-420 + Dextrose (10g/ℓ)	0,94	0,00
14. AP-3 + Dextrose (10g/ℓ)	1,00	0,00
15. AP-85 + Dextrose (10g/ℓ)	1,22	0,00
16. AP-471 + Dextrose (10g/ℓ)	1,24	0,04
17. BD + Dextrose (10g/ℓ)	1,32	0,00
18. Dextrose (10g/ℓ)	1,28	0,08

1 Nota variando de 0 a 9, conforme Sistema Padrão para Avaliação de Arroz, do IRRI, item 3.13.

2 Nota variando de 1 a 4, conforme apresentado nos Materiais e Métodos, item 3.13.

AP = antagonista a *Pyricularia oryzae*; BD = meio líquido batata-dextrose
A análise estatística mostrou não existir diferenças significativas entre os tratamentos. Os dados são médias de 5 repetições.

Como não foram verificadas diferenças marcantes na ocorrência da Brusone na folha bandeira e no n^o, foi decidido realizar testes de patologia com as sementes colhidas no campo, separando as originárias de panículas sadias das doentes. Dessas sementes foram determinadas a porcentagem de sementes com *P. oryzae*, *H. oryzae* e *Phoma* spp., (Tabela 12). Esse parâmetro também não apresentou diferenças que marcassem os efeitos dos tratamentos.

TABELA 12. Efeito da pulverização de *Bacillus subtilis* na cultura do arroz sobre a incidência de *Pyricularia oryzae*, *Helminthosporium* spp. e *Phoma* spp., nas sementes oriundas de panículas com e sem Brusone, produzidas no Ano Agrícola 86/87.

Tratamento	Panículas doentes ¹			Panículas sadias ²		
	<i>P. oryzae</i>	<i>Helminthosporium</i> spp. (%)	<i>Phoma</i> spp.	<i>P. oryzae</i>	<i>Helminthosporium</i> spp. (%)	<i>Phoma</i> spp.
1. Testemunha	29,0	1,0	86,5	33,5	2,5	73,5
2. Kasugamicina 2% (Kasumin 1ℓ/ha)	27,0	0,0	83,0	36,5	1,5	69,0
3. Benomyl (Benlate 50 PM 500g/ha)	21,0	1,5	73,5	26,0	2,0	59,0
4. AP-150	23,0	4,0	76,0	26,5	3,0	72,5
5. AP-203	33,0	0,5	72,0	40,5	3,5	72,5
6. AP-420	32,5	0,0	81,0	33,0	2,5	81,0
7. AP-3	31,0	2,5	71,0	34,5	4,5	61,5
8. AP-85	34,0	3,0	74,5	39,5	3,5	64,0
9. AP-471	28,0	2,5	69,0	36,5	0,0	66,5
10. BD	32,0	1,5	78,0	26,0	6,0	63,5
11. AP-150+Dextrose (10g/ℓ)	27,0	1,5	82,0	36,0	5,0	55,0
12. AP-203+Dextrose (10g/ℓ)	30,0	0,5	91,5	27,0	1,5	69,5
13. AP-420+Dextrose (10g/ℓ)	28,5	2,0	76,0	34,5	2,5	65,0
14. AP-3+Dextrose (10g/ℓ)	24,5	0,5	68,5	30,0	4,0	72,0
15. AP-85+Dextrose (10g/ℓ)	27,5	1,5	77,5	37,5	2,5	55,5
16. AP-471+Dextrose (10g/ℓ)	33,5	1,0	81,5	31,0	1,5	67,5
17. BD + Dextrose	28,5	1,0	76,0	32,5	2,5	70,5
18. Dextrose	40,0	0,5	81,0	38,5	1,5	64,0

1 Panículas atacadas por *P. oryzae*

2 Panículas não atacadas por *P. oryzae*

AP = antagonista a *P. oryzae*; BD = meio líquido de batata-dextrose

5. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Esse estudo básico para o controle biológico do patossistema *Pyricularia oryzae* x *Oryza sativa* é devido aos relatos do controle de diversas doenças com extratos de microrganismos e principalmente das descobertas de bons antibióticos para controle da Brusone como blasticidina S e kasugamicina (FUKUNAGA, 1965; UMEZAWA et alii, 1965) baseados na seleção de antagonistas que ocorriam naturalmente. Assim, como a natureza é repleta de antagonistas, devem existir outros microrganismos que produzam substâncias inibidoras deste patógeno, que é o mais importante da cultura, havendo necessidade de estabelecer um esquema de seleção.

Um grande número de microrganismos antagonísticos a *P. oryzae* foi isolado de todas as partes de plantas de arroz (raízes, folhas e sementes) e dos solos onde essas plantas de desenvolviam (Apêndices 1 a 8), demonstrando que existe na natureza um enorme potencial antagônico. O importante é que em todos os locais de coletas de arroz foram obtidos inúmeros isolados de antagonistas a *P. oryzae*. Este fato indica a possibilidade de se obter antagonistas efi-

cientes para explorar o controle biológico desse patógeno, pela introdução massal de antagonistas ou pelo uso das substâncias produzidas por esses microrganismos. Esta observação indica ainda que deve ocorrer naturalmente controle biológico da Brusone na cultura do arroz.

Inicialmente, havia sido programado utilizar para seleção de microrganismos antagônicos a técnica descrita por JOHNSON *et alii* (1967), porém devido às dificuldades na sua elaboração optou-se pela apresentada nos itens 3.3 e 3.4. Considerando o número e freqüência de isolados de antagonistas obtidos (Apêndices 1 a 8), pode-se inferir que o método de seleção utilizado foi bastante satisfatório, principalmente, devido ao baixo custo dos meios de cultura e a facilidade de execução dos trabalhos. O método utilizado contraria, praticamente, todos os testes de seleção de antagonistas, pois nesses sempre os antagonistas são colocados para desenvolver em meio de cultura antes do patógeno, enquanto nesta metodologia o patógeno foi transferido para meio de cultura dois dias antes que o antagonista. Essa alteração foi necessária porque, como apresentado no item 4.5, onde *B. subtilis* se desenvolveu por 24 horas o crescimento micelial de *P. oryzae* foi nulo.

Tanto durante a fase de seleção dos microrganismos antagônicos a *P. oryzae* como durante a realização dos testes para selecionar os mais eficientes em inibir o

crescimento micelial do patógeno, *in vitro* (Apêndices 9 a 21), foi demonstrado que todos antagonistas a *P. oryzae* agiam através do mecanismo de antibiose, isto é, pela produção de antibióticos, pois sempre ocorria formação de intenso halo de inibição (COOK & BAKER, 1983). Os dados dos testes para verificar o efeito do período de incubação de *B. subtilis*, em meio líquido, sobre o crescimento micelial de *P. oryzae* também confirmam este mecanismo de ação nos meios em que o antagonico foi multiplicado por 1 a 15 dias o crescimento do agente causal da Brusone foi nulo. Outros ensaios realizados no transcorrer dos trabalhos dão sustentação à afirmação.

Todos os antagonistas selecionados quanto a maior eficiência em inibir o crescimento micelial de *P. oryzae*, *in vitro*, pertencem à mesma espécie: *Bacillus subtilis* (Tabela 1). A identificação foi baseada nas características usadas para tipos de espécie de *Bacillus* apresentadas por BERDY (1974), BUCHANAN & GIBBONS (1975) e NORRIS et alii (1981). Isto pode ser devido a metodologia de isolamento e seleção ou ser característica da própria planta hospedeira, em apresentar esses microrganismos como residentes. Para demonstrar qual hipótese é verdadeira há necessidade de realizar nova seleção baseada em outros princípios, outros meios, etc. Como não foram encontrados relatos de levantamentos de microrganismos residentes em arroz não é possível comparar os dados. No entanto, diferem dos trabalhos mais

recentes com controle biológico de *P. oryzae* desenvolvidos por SY et alii (1978ab), SY et alii (1983ab) e SY et alii (1984) que são baseados sobre os antagonistas *Trichoderma* spp., *T. roseum*, *Chaetomium globosum*, *Myrothecium verrucaria*, *Micromonospora* spp., *Aspergillus niger* e duas bactérias não identificadas. Os desenvolvidos por RIBEIRO (1987) são baseados em *Trichoderma*, *Trichotecium* e *Nigrospora*. Tal diferença pode ser devida ao fato de que muitos trabalhos de controle biológico não têm como base a seleção ampla dos possíveis antagonistas que ocorrem na cultura, mas sim a utilização de espécies reconhecidamente com potencial antagônico geral (ANDREWS, 1985).

O fato de todos os antagonistas selecionados pertencerem à espécie *B. subtilis* não é surpreendente porque essa espécie é reconhecidamente produtora de inúmeros antibióticos como demonstrado por BERDY (1974), BUCHANAN & GIBBONS (1975), KATZ & DEMAINS (1977) e NORRIS et alii (1981). Além de produzir inúmeros antibióticos, há vários relatos do potencial inibidor desta espécie para diversos patógenos: *Rhizoctonia solani*, *R. bataticola*, *Alternaria solani*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium udum* e *Colletotrichum falcatum* (VASUDEVA & CHAKRAVARTH, 1954); *R. solani* (DUNLEAVY, 1955); *Erwinia amylovora* (ABO-EL-DAHAB & GOORANI, 1964); *Fusarium roseum* f. sp. *cerealis* (KOMMENDAHL & NEW, 1974); *Colletotrichum gloeosporioides* (BASTOS & FIGUEIREDO, 1976); *Nectria galligena* (SWINBURNE et alii, 1975); *Macrophomina phaseoli-*

na e *Botryodiplodia solani-tuberosi* (THIRUMALACHAR & O'BRIEN, 1977); *C. pernicioso* (BASTOS, 1978); *Phytophthora palmivora* (OIDIGIE & IKOTUN, 1981); *Uromyces phaseoli* (STAVELY et alii, 1981; BAKER et alii, 1983; BAKER et alii, 1985); *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* (YVENETALII, 1985); *Phomopsis* sp. (CUBETA et alii, 1985); *Verticillium dahliae* (HALL et alii, 1986); *Monilinia fructicola* (PUSEY & WILSON, 1984 e MACKEEN et alii, 1986); *Alternaria* sp., *Fusarium moniliformae*, *Pestalotia* sp., *Phomopsis* sp., *Dothiorella gregaria*, *R. solani*, *Sclerotium rolfsii* e *Sordaria* sp. (MEDINA, 1986); *H. oryzae* (NUNES et alii, 1986 ab) e *Cylindrocladium* sp. (BETTIOL, 1986), confirmando a amplitude de ação de *B. subtilis*. Nos testes de patologia de sementes foi verificado inibição de *P. oryzae*, *H. oryzae*, *Epicoccum* sp., *Cladosporium* sp., *Nigrospora* sp., *Curvularia* sp. e *Aspergillus* sp., entre outras (Tabelas 8 e 9). Essas observações sugerem que os antibióticos produzidos por *B. subtilis* podem ser explorados, como os produzidos por *Streptomyces*, para controle da Brusone. No entanto, há necessidade de mais estudos para tornar prática a utilização deste antagonista.

As características dos antagonistas selecionados são boas para agentes de controle biológico, pois além de rápido desenvolvimento tanto em meio de cultura quanto na natureza, produzem endosporo e antibióticos, crescem em larga faixa de temperatura e adaptam-se a várias condições ambientes (BUCHANAN & GIBBONS, 1975; KATZ & DEMAIN;

1977 e ANDREWS, 1985). A característica de produção de endosporo, altamente resistente às condições adversas, (NORRIS et alii, 1981) é excelente para a preservação desses organismos. *B. subtilis* manteve a viabilidade quando preservado em solo estéril e água destilada, pelo menos, por 1 e 2 anos, respectivamente. Deve, no entanto, permanecer viável por tempo superior. Essa observação será feita no transcorrer dos anos durante realização dos futuros trabalhos com controle biológico da Brusone do arroz. Além desses dois métodos o da repicagem sucessiva também se mostrou altamente interessante, pois mesmo com a secagem do meio de cultura a viabilidade das células foi grande.

B. subtilis apresenta grande antagonismo a *P. oryzae*, pois quando multiplicado em meio líquido por 1 dia, produz antibióticos suficientes para impedir completamente o crescimento do patógeno. ABO-EL-DAHAB & GOORANI (1964) demonstraram que com o aumento no período de incubação de *B. subtilis* ocorreu aumento na inibição de *Erwinia amylovora*. Contudo, nesse trabalho não foi possível essa detecção porque o crescimento de *P. oryzae* foi completamente inibido quando a incubação de *B. subtilis* foi superior a 1 dia. Foi verificado ainda, que quando o antagonista é transferido para o meio de cultura sólido antes que *P. oryzae*, o crescimento deste é nulo. Os antibióticos produzidos por *B. subtilis* inibem o crescimento micelial (Apêndices 9 a 21) e a germinação dos conídios de *P. oryzae* (Tabela 5), sendo que muitos dos conídios germinados exibem o tubo germinativo mal

formado. Resultados semelhantes foram obtidos por VASUDEVA & CHAKRAVARTHI (1954) com *Alternaria solani*; SWINBURNE et alii (1975) com *Nectria galligena*; THIRUMALACHAR & O'BRIEN (1977) com *Macrophomina phaseolina*; FRAVEL & SPURR (1977) com *Alternaria alternata*; BAKER et alii (1983) com *Uromyces phaseoli*; PUSEY & WILSON (1984) com *Monilinia fructicola*.

Foi demonstrada a termoestabilidade dos metabólitos produzidos por *B. subtilis* que controlam *P. oryzae* (Tabelas 2, 4, 5 e 6). Esta característica coincide com a verificada por LANDY et alii (1948), DUNLEAVY (1955), BAKER et alii (1983), PUSEY & WILSON (1984), BAKER et alii (1985) e MEDINA (1986). A termoestabilidade juntamente com a estabilidade das substâncias antagônicas na forma seca e no armazenamento observadas por LANDY et alii (1948) e SWINBURNE et alii (1975) são importantes para sua industrialização. Nos estudos para verificar o efeito da luz sobre *B. subtilis* foi verificado que quando incubado em meio líquido iluminado com luz próxima do ultravioleta (NUV), os caldos onde os antagonistas foram multiplicados inibiram o crescimento micelial de *P. oryzae* em menor grau que quando incubado com luz fluorescente ou escuro (Tabelas 6 e 7). Mesmo os incubados em NUV sendo pouco aerados e permanecendo sob temperatura inferior aos outros, esses efeitos são minimizados quando observado os obtidos no item 4.5.

No estudo, não foi possível determinar se NUV inibe a multiplicação de *B. subtilis* ou se inibe a produção de antibióticos ou se destrói as substâncias produzidas. Esta possível sensibilidade à luz ultravioleta poderá ser vencida através de seleção dos isolados mais adaptados, pois o comportamento em relação ao NUV foi diferencial (Tabelas 6 e 7) ou do melhoramento dos microrganismos em relação a essa característica ou ainda através de uma adequada formulação do produto.

A inibição de *P. oryzae* com os metabólitos produzidos por *B. subtilis* ocorre em baixas concentrações, haja visto que 1,0% do caldo onde os AP-3, AP-49, AP-51, AP-94, AP-332 foram multiplicados por 10 dias inibiu 54, 59, 82, 73 e 72%, do crescimento micelial do fungo, respectivamente. Faz-se necessário salientar que foi 1,0% do caldo onde *B. subtilis* foi multiplicado, sendo que a quantidade de metabólito no caldo é desconhecida, mas devendo ser baixa, mostrando que produzem substâncias altamente efetivas em inibir *P. oryzae*. Assim, há necessidade de estudar meios de culturas mais apropriados para multiplicação dos antagonistas e produção de substâncias inibidoras, condições de incubação e purificação da toxina e sua efetividade. Na Tabela 4 é interessante observar que os valores do ED₅₀, ED₉₀ e ED₉₅ apresentados pelos caldos onde *B. subtilis* foi multiplicado são diferenciais. Assim, cálculos desta natu-

reza podem ser utilizados para seleção dos ... antagonistas mais eficientes.

A não constatação de diferenças entre os tratamentos nos ensaios de campo nos anos agrícolas 85/86 e 86/87, provavelmente, deve-se à utilização de uma variedade extremamente suscetível como é o caso da Agulha Precoce e às condições oferecidas durante o transcorrer dos ensaios, como: alta densidade populacional, adubação nitrogenada, semeadura tardia, condições de sequeiro, que de acordo com CARDOSO & KIMATI (1980); RIBEIRO (1981), PRABHU (1983), OU (1985) e SCHINITLER (s.d.) são apropriadas para ocorrência da doença. Outros fatores precisam ser considerados como a aplica-ção tardia dos produtos (antagonistas e fungicidas) e o ho-rário das pulverizações que foi das 07:00 às 18:00 horas. Além desses fatores, os problemas com delineamento experi-mental também colaboraram para a não constatação de diferen-ças entre os tratamentos como: a interferência entre parce-las, pois as mesmas foram pequenas devido a problemas com disponibilidade de área e a amostragem, aparentemente pequena. Entretanto, mesmo com esses problemas e não apresentando diferença estatisticamente significativa, o AP-150 com e sem açúcar apresentou comportamento superior aos trata-mentos padrões (kasugamicina e benomyl) no controle da Brusone nos dois anos agrícolas (Tabelas 10 e 11). Este fato indica que há possibilidade de controlar *P. oryzae* em condições de campo, com *B. subtilis*, necessitando: encon-

trar meios de cultura onde a produção de antibióticos seja maior, adequar a sua aplicação e formular adequadamente o produto, entre outros.

Nos ensaios de campo, não foi possível verificar se ocorreu degradação dos metabólitos e ou a morte das células de *B. subtilis* pulverizadas nas plantas. Contudo, considerando o efeito da luz NUV sobre a incubação do antagonista, há necessidade de avaliar esses parâmetros.

A purificação e a identificação das substâncias inibidoras de *P. oryzae* produzidas por *B. subtilis* são necessárias para entendimento do completo mecanismo de controle expresso no patossistema. Uma vez realizado este trabalho, modificação da sua estrutura poderia levar a um produto mais eficiente e conduzir o controle para um método mais seguro e eficaz.

Além do controle biológico, um dos objetivos da obtenção de microrganismos antagonísticos a diversos patógenos é a implementação do controle integrado e *B. subtilis* apresenta mais uma característica importante que é a compatibilidade com fungicidas, como demonstrado por PUSEY et alii (1986).

6. CONCLUSÕES

- Na superfície das plantas de arroz (folhas, sementes e raízes) e no solo onde essas plantas se desenvolvem existe uma grande quantidade de microrganismos antagônicos a *Pyricularia oryzae*;
- Dos microrganismos isolados das plantas de arroz os mais eficientes em inibir *P. oryzae* são todas da espécie *Bacillus subtilis*, sendo que atuam através da antibiose, isto é, produção de antibióticos;
- Os isolados de *B. subtilis* selecionados mantiveram a viabilidade por, pelo menos, 1 e 2 anos, quando preservados em solo e água estéril, respectivamente;
- Os antibióticos produzidos por *B. subtilis* inibem *in vitro* tanto o crescimento micelial como a germinação dos conídios de *P. oryzae*, sendo que muitos tubos germinativos são deformados;
- A multiplicação de *B. subtilis* em meio líquido (BD) com e sem agitação constante, libera metabólitos em concentração suficiente para inibir completamente o crescimento micelial de *P. oryzae*, após um dia de incubação;

- A capacidade de *B. subtilis* em inibir o crescimento micelial de *P. oryzae* é influenciada pelas condições de luminosidade, sendo a luz fluorescente e o escuro mais apropriadas e a próximo do ultravioleta prejudicial;
- As substâncias antagônicas liberadas por *B. subtilis* apresentam termoestabilidade e alta eficiência em inibir *P. oryzae* **in vitro**;
- O conjunto dos resultados permite concluir que as perspectivas de controle biológico da Brusone do arroz com *B. subtilis* e/ou seus metabólitos antagônicos são promissoras.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABO-EL-DAHAB, M.K. & EL-GOORANI, M.A. Antagonistic effect of a *Bacillus subtilis* strain upon *Erwinia amylovora*. *Phytopathology*, St. Paul, **54**: 1285-6, 1964.
- ANDREWS, J.H. Strategies for selecting antagonistic microorganisms from the phylloplane. In: WINDELS, C.E. & LINDOW, S.E. Coord. *Biological control on the phylloplane*. St. Paul, The American Phytopathological Society, 1985. p. 31-44.
- ANDREWS, J.H. & KENERLY, C.M. The effects of a pesticide program on non-target epiphytic microbial populations of apple leaves. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, **24**: 1058-72, 1978.
- ANDREWS, J.H.; BERBEE, F.M.; NORDHEIM, E.U. Microbial antagonism to the imperfect stage of the apple scab pathogen, *Venturia inaequalis*. *Phytopathology*, St. Paul, **73**: 228-34, 1983.
- ANNUAIRE FAO DE LA PRODUCTION - 1981. Roma, FAO, 1981. v.35, p. 96-102.
- ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL - 1985. Rio de Janeiro, Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 1985. v. 46, 759p.

- ASUYAMA, H. Morfology, taxonomy, host range, and life cycle of *Piricularia oryzae*. In: *The rice blast disease: Proceedings of a Symposium at IRRI, July, 1963*. Baltimore, MD, Johns Hopkins Press, 1965. p.9-22.
- BAKER, K.F. & COOK, R.J. *Biological control of plant pathogens*. San Francisco, W.H. Freeman, 1974. 433p.
- BAKER, C.J.; STANVELY, J.R.; THOMAS, C.A.; SASSER, M.; MACFALL, J.S. Inhibitory effect of *Bacillus subtilis* on *Uromyces phaseoli* and on development of rust pustules on bean leaves. *Phytopathology*, St. Paul, **73**: 1148-52, 1983.
- BAKER, C.J.; STANVELY, J.R.; MOCK, N. Biocontrol of bean rust by *Bacillus subtilis* under field conditions. *Plant Disease*, St. Paul, **69**: 770-2, 1985.
- BARNETT, H.L. & HUNTER, B.B. *Illustrated genera of imperfect fungi*. Mineapolis, Burgess, 1972. 241p.
- BASTOS, C.N. Antagonismo ao fungo *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer, causador da vassoura-de-bruxa do cacau-eiro. *Revista Theobroma*, Itabuna, **8**: 147-50, 1978.
- BASTOS, C.N. Hiperparasitismo do fungo *Dactylium* sp. a *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer em "vassoura-de-bruxa" do cacau-eiro. *Revista Theobroma*, Itabuna, **9**: 197-200, 1979.
- BASTOS, C.N. Efeito de filtrado de cultura de *Cladobotryum amazonense* sobre *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer e outros patógenos. *Revista Theobroma*, Itabuna, **14**: 263-9, 1984.

- BASTOS, C.N. & FIGUEIREDO, J.M. Inibição *in vitro* de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz., agente causal da antracnose do cajueiro, por uma substância produzida por *Bacillus* sp. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 9, Campinas, 1976. *Anais*. Campinas, Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 1976. p.26.
- BASTOS, C.N. & FIGUEIREDO, J.M. Efeitos do filtrado de *Cladobotryum amazonense* Bastos, Evans e Samson sobre três espécies de *Phytophthora* isolados do cacauzeiro. *Revista Theobroma*, Itabuna, 13: 113-7, 1983.
- BASTOS, C.N.; EVANS, H.C.; SAMSON, R.A. A new hyperparasitic fungus, *Cladobotryum amazonense*, with potential for control of fungal pathogens of cocoa. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, London, 77 (2): 273-8, 1981.
- BASTOS, C.N.; NEILL, S.J.; HORGAN, R. A metabolite from *Cladobotryum amazonense* with antibiotic activity. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, London, 86: 571-8, 1986.
- BELL, D.H.; WELLS, H.D.; MARKHAM, C.R. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology*, St. Paul, 72: 379-82, 1982.
- BERDY, J. Recent development of antibiotic research and classification of antibiotics according to chemical structure. *Advanced Applied Microbiology*, Madison, 18: 309-406, 1974.
- 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*, Jaguariuna, (no prelo).

- BLAKEMAN, J.P. Ecological sucession of leaf surface microorganisms in relation to biological control. In: WINDELS, C.E. & LINDOW, S.E. Coord. **Biological control on the phylloplane**. St. Paul, The American Phytopathological Society, 1985. p.6-30.
- BLAKEMAN, J.P. & FOKKEMA, N.J. Potential for biological control of plant diseases on the phylloplane. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, **20**: 167-92, 1982.
- BOOSALIS, M.G. Hyperparasitism. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, **2**: 363-76, 1964.
- BREED, R.S.; MURRAY, G.G.D.; SMITH, N.R. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 7.ed. Baltimore, The Williams & Wilkins, 1957. 1094p.
- BUCHANAN, R.E. & GIBBONS, N.G. **Bergey's manual of determinative bactereology**. 8.ed. Baltimore, The Williams & Wilkins, 1975. 1268p.
- CARDOSO, C.O.N. & KIMATI, H. Doenças do arroz - *Oryza sativa* L. In: GALLI, F. Coord. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo, Ceres, 1980. p.75-86.
- CHANDLER JR., R.F. **Rice in the tropics: a guide to the development of national programs**. Boulder, Westview Press, 1979. 256p.
- CHANG, T.T. Rice. *Oryza sativa* and *Oryza glaberrima*. In: SIMMONDS, N.W. Coord. **Evolution of crop plants**. London, Longman, 1976. p.98-104.

- COOK, R.J. Biological control of plant pathogens: theory to application. *Phytopathology*, St. Paul, 75:25-9, 1985.
- COOK, R.J. & BAKER, K.F. The nature and practice of biological control of plant pathogens. St. Paul, The American Phytopathological Society, 1983. 539p.
- CORK, A.T.K. & RISHBETH, J. Use of microorganisms to control plant diseases. In: BURGESS, H.D. Coord. *Microbial control of pests and plant diseases, 1970-1980*. London, Academic Press, 1980. p.717-36.
- CUBETA, M.A.; HARTMAN, G.L.; SINCLAIR, J.B. Interaction between *Bacillus subtilis* and fungi associated with soybean seeds. *Plant Diseases*, St. Paul, 69: 506 - 9, 1985.
- CULLEN, D. & ANDREWS, J.H. Epiphytic microbes as biological control agents. In: KOSUGE, T. & NESTER, E.W., Coord. *Plant microbe interactions*. New York, Macmillan 1984. p.381-99.
- CULLEN, D.; BERBEE, F.M.; ANDREWS, J.H. *Chaetomium globosum* antagonizes the apple scab pathogen, *Venturia inaequalis*, under field conditions. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, 62: 1814-8, 1984.
- DICKINSON, C.H. & PREECE, T.F. *Microbiology of aerial plant surfaces*. London, Academic Press, 1976. 669p.
- DUNLEAVY, J. Control of damping-off of sugar beet by *Bacillus subtilis*. *Phytopathology*, St. Paul, 45: 252-8, 1955.

- FAGERIA, N.K. Adubação e nutrição mineral da cultura de arroz. Rio de Janeiro, Campus; Goiânia, EMBRAPA, 1984. 341p.
- FIGUEIREDO, M.B. Estudo sobre a aplicação do método de Castellani para conservação de fungos patógenos em plantas. *O Biológico*, São Paulo, 33: 9-13, 1967.
- FINNEY, D.J. Probit analysis. Cambridge, University Press, 1971.
- FOKKEMA, N.J. Antagonism between fungal saprophytes and pathogens and aerial plant surfaces. In: DICKINSON, C.H. & PREECE, T.F., Coord. *Microbiology of aerial plant surfaces*. London, Academic Press, 1976. p.487-506.
- FOKKEMA, N.J. & VAN DER MEULEN, F. Antagonism of yeast like phyllosphere fungi against *Septoria nodorum* on wheat leaves. *Neth. J. Pl. Path.*, Wageningen, 82: 13-16, 1976.
- FOREIGN AGRICULTURE CIRCULAR, 1982. Washington, DC, USA. nº 82, 1982.
- FRATINI, J.A. & SOAVE, J. Tentativa de avaliação das perdas causadas pela brusone nas culturas de arroz do Estado de São Paulo. *Revista da Agricultura*, Piracicaba, 49: 101-8, 1974.
- FRAVEL, D.R. & SPURR JR., H.W. Biocontrol of tobacco brown spot disease by *Bacillus cereus* subsp. *mycoides* in a controlled environment. *Phytopathology*, St. Paul, 67: 930-2, 1977.

- FUKUNAGA, K. Fungicide development for blast control. In: **The rice blast disease.** Proceedings of a Symposium at the International Rice Research Institute, July, 1963. Baltimore, MD, The International Rice Research Institute, Johns Hopkins Press, 1965. p.409-14.
- GOTO, K. Estimating losses from rice blast in Japan. In: **The rice blast disease:** Proceedings of a Symposium at the International Rice Research Institute, July, 1963. Baltimore, MD, The International Rice Research Institute, Johns Hopkins Press, 1965. p.195-202.
- HALL, T.J.; SCHREIBER, L.R.; LEBEN, C. Effects of xylem-colonizing *Bacillus* spp. on *Verticillium* wilt in maples. **Plant Disease**, St. Paul, 70: 521-4, 1986.
- HENIS, Y.; ELAD, Y.; CHET, J.; HADAR, Y.; HADAR, E. Control of soilborne plant pathogenic fungi in carnation straw berry and tomato by *Trichoderma harzianum*. **Phytopathology**, St. Paul, 69: 1031, 1979.
- HENRY, B.W. & ANDERSON, A.L. Sporulation by *Piricularia oryzae*. **Phytopathology**, St. Paul, 38(4): 265-78, 1948.
- HO, W.C. & KO, W.H. Alkalized water agar as a selective medium for enumerating soil actinomycetes. **Phytopathology**, St. Paul, 69:1031, 1979.
- JENKINS, P.T. A method to determine the frequency of airborne bacteria antagonistic to *Sclerotinia fructicola*. **Austr. Exp. Agric. Anim. Husbandry**, 8: 434-5, 1968.
- JOHNSON, L.F. & CURL, E.A. **Methods for research on the ecology of soilborne plant pathogens.** Minneapolis, Burgess, 1972. 247p.

- JOHNSON, L.F.; PAPAIVIZAS, G.C.; DAVEY, S.B.; FREEMAN, T.E.; HERR, L.J.; LEBEN, C.; TSAO, P.N. Naturally occurring soil actinomycetes antagonistic to plant pathogenic fungi. In: CHAIRMAN, A.K. et alii, Coord. Sourcebook of laboratory exercises in plant pathology. San Francisco, W. Freeman, 1967. p.285-7.
- KATZ, E. & DEMAIN, A.L. The peptide antibiotics of *Bacillus*: chemistry, biogenesis and possible functions. *Bacteriological Reviews*, Washington, **41**: 449-74, 1977.
- KOMMENDAHL, T. & MEW, J.C. Biocontrol of corn root infection in the field by seed treatment with antagonist. *Phytopathology*, St. Paul, **65**: 296-300, 1974.
- LANDY, M.; WARREN, G.N.; ROSENMAN, S.B.; COLIO, L.G. Bacillomycin: an antibiotic from *Bacillus subtilis* active against pathogenic fungi. *Society for Experimental Biology and Medicine. Proceedings*, New York, **67**: 539 - 41, 1948.
- LEBEN, C. Influence of bacteria isolated from healthy cucumber leaves on two leaf diseases of cucumber. *Phytopathology*, St. Paul, **54**: 405-8, 1964.
- LEBEN, C.; DAFT, G.C.; WILSON, J.D.; WINTER, H.F. Field tests for disease control by an epiphytic bacterium. *Phytopathology*, St. Paul, **55**: 1375-6, 1965.
- LINDBERG, G.D. An antibiotic lethal to fungi. *Plant Disease*, St. Paul, **65**: 680-3, 1981.

- LOCH, L.C. Exigências nutricionais e ambientais do fungo entomôgeno *Nomuria relej* (Farlow) Samson e seu comportamento na presença de defensivos agrícolas. Piracicaba, 1978. 65p. (Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz/USP).
- LOPES, C.A. Biological control of *Pseudomonas avenae* with epiphytic bacteria isolated from corn plants. Miami, University of Florida, 1986. 103p. (Ph.D. Thesis).
- LUZ, W.C. Efeito dos microrganismos do filoplano sobre as manchas fungicas foliares do trigo. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, **10**: 79-85, 1985.
- MATALLO, M.R.V. & LASCA, C.C. Doenças transmitidas pela semente. Campinas, CATI, 1978. 15p. (CATI. Boletim Técnico, 130).
- MCKEEN, C.D.; REILLY, C.C.; PUSEY, P.L. Production and partial characterization of antifungal substances antagonistic to *Monilinia fructicola* from *Bacillus subtilis*. *Phytopathology*, St. Paul, **76**: 136-9, 1986.
- MEDINA, R.A.A.D. Isolamento e caracterização de um produto metabólico de *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn. T 41, com atividade antibiótica a fungos fitopatogênicos. Brasília, 1986. p. (Mestrado-Universidade de Brasília)
- MEINHARDT, F. Biological control of plant pathogenic fungi. *Progress in Botany*, Berlin, **46**: 241-7, 1984.
- MORGAN, F.L. Infection inhibition and germ tube lysis of three cereal rust by *Bacillus pumilus*. *Phytopathology*, St. Paul, **53**: 1346-8, 1963.

- NEERGAARD, P. *Seed pathology*. London, Macmillan 1977. 1187p.
- NORRIS, J.R.; BERKELEY, R.C.W.; LOGAN, N.A.; O'DONELL, A.G. The genera *Bacillus* and *Sporolactobacillus*. In: STAN, M.P., Coord. *The prokaryotes*. Berlin, Springer-Verlag, 1981. p.1711-42.
- NUNES, M.E.T.; BETTIOL, W.; KIMATI, H. Influência de isolados de *Bacillus* no crescimento micelial de *Helminthosporium oryzae*, causador da mancha parda foliar do arroz (*Oryza sativa* L.). In: REUNIÃO SOBRE CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS DE PLANTAS, 1., Piracicaba, 1986. *Anais. Campinas, Fundação Cargill*, 1986a. p.59
- NUNES, M.E.T.; BETTIOL, W.; KIMATI, H. Seleção de microrganismos antagonísticos a *Helminthosporium oryzae* para controle de mancha parda do arroz. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, 11: 336, 1986b.
- ODIGIE, E.E. & IHOTUM, T. *In vitro* and *in vivo* inhibition of growth of *Phytophthora palmivora* (Butl.) Butl. by antagonistic microorganisms. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, 7: 157-67, 1982.
- OU, S.H. *Rice diseases*. London, Commonwealth Mycological Institute, 1972. 368p.
- OU, S.H. *Rice diseases*. London, Commonwealth Mycological Institute, 1985. 380p.

- PADMANABHAN, S.Y. Estimating losses from rice blast in India. In: *The rice blast disease; Proceedings of a Symposium at the International Rice Research Institute, July, 1963.* Baltimore, MD, The International Rice Research Institute, Johns Hopkins Press, 1965. p.203-21.
- PAPAVIZAS, G.C. & LEWIS, J.A. Physiological and biocontrol characteristics of stable mutants of *Trichoderma viride* resistant to MBC fungicides. *Phytopathology*, St. Paul, 73: 407-11, 1983.
- PRABHU, A.S. Sistema de produção de arroz de sequeiro visando o controle de brusone. Goiânia, EMBRAPA-CNPAP, 1980. 15p. (EMBRAPA-CNPAP - Circular Técnica, 1).
- PRABHU, A.S. Brusone. In: SIMPÓSIO SOBRE A CULTURA DO ARROZ DE SEQUEIRO, Jaboticabal, 1983. Anais, Jaboticabal, FCAV, 1983. p.204-23.
- PRABHU, A.S. Sistema de produção de arroz de sequeiro visando diminuir o risco devido a brusone. Goiânia, EMBRAPA/CNPAP, 1984. 20p.
- PRABHU, A.S. & BEDENDO, I.P. Principais doenças do arroz no Brasil. Goiânia, EMBRAPA-CNPAP, 1982. 31p.
- PRABHU, A.S.; BEDENDO, I.P.; FARIA, J.C.; SOUZA, D.M.; SOAVE, J.; AMARAL, R.E.M. Fontes de resistência vertical a *Pyricularia oryzae* em arroz. *Summa Phytopathologica*, Piracicaba, 8(1/2): 78-90, 1982.
- PREECE, T.F. & DICKINSON, C.H. Ecology of leaf surface micro-organisms. London, Academic Press, 1971. 639p.

- PUSEY, P.L. & WILSON, C.L. Postharvest biological control of stone fruit brown rot by *Bacillus subtilis*. **Plant Disease**, St. Paul, 68: 753-6, 1984.
- RIBEIRO, A.S. Doenças do arroz no Rio Grande do Sul. **Lavoura Arrozeira**, Porto Alegre, 296: 35-65, 1976.
- RIBEIRO, A.S. Influência da época de semeadura do arroz sobre os danos da brusone. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, 6: 604, 1981
- RIBEIRO, A.S. Controle integrado das doenças do arroz irrigado: relatório do Projeto nº 039-85001/1. Brasília, EMBRAPA-CPATB/CNPDA, 1987.
- RICHARDSON, M.J. An annotated list of seed borne-diseases. 3. ed. ISTA, CAB, 1979. 210p.
- ROMEIRO, R.S. Identificação de bactérias fitopatogênicas. Viçosa, UFV, 1976. 91p. (mimeografado).
- SAS, User's Guide: Statistics; SAS Institute, Cary, 1985.
- SCHNITZLER, W.H. Arroz: enfermidades, plagas, malezas. y trastornos nutritivos. Alemana, Basf Aktiengesellschaft, s.d. 173p.
- SCHROTH, M.N. & HANCOCK, J.G. Selected topics in biological control. **Annual Review Mycrobiology**, Palo Alto, 35: 453-76, 1981.
- SIVAN, A.; ELAD, Y.; CHET, I. Biological control effect of a new isolated of *Trichoderma harzianum* on *Pythium aphanidermatum*. **Phytopathology**, St. Paul, 74: 498-501, 1984.

- SOUZA, A.J.; BRIGNANI NETO, F.; SOAVE, J. Principais doenças da cultura do arroz. Campinas, CATI, 1984. 8p. (CATI. Boletim Técnico, 182).
- STAVELY, J.R.; THOMAS, C.A.; BAKER, C.J.; MACFALL, J.S. Greenhouse control of bean rust with *Bacillus subtilis*. *Phytopathology*, St. Paul, 71: 771, 1981
- STESSEL, G.J.; LEBEN, C.; KEITT, G.W. Screening tests designed to discover antibiotics suitable for plant disease control. *Mycologia*, New York, 45: 325-34, 1953.
- SWINBURNE, T.R.; BARR, J.G.; BROWN, A.E. Production of antibiotics by *Bacillus subtilis* by their effect on fungal colonists of apple leaf scabes. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, London, 65: 211-7, 1975.
- SY, A.A.; ALBERTINI, L.; HAMANT, C. Recherches sur la lutte biologique contre le *Pyricularia oryzae* Cav. I. Action *in vitro* d'antagonistes fongiques sur la croissance mycélienne du parasite. *Rev. Gen. Bot.*, Paris, 85: 63-81, 1978a.
- SY, A.A.; ALBERTINI, L.; HAMANT, C. Recherches sur la lutte biologique contre le *Pyricularia oryzae* Cav. II. Action *in vitro* d'antagonistes fongiques sur la germination des conidies du parasite. *Rev. Gen. Bot.*, Paris, 85: 83-90, 1978b.
- SY, A.A.; ALBERTINI, L.; ZOHOURI, P.; NORNG, K. Lutte biologique contre *Pyricularia oryzae* Cav. parasite du riz par application de microorganismes antagonistes: premiers résultats *in vitro*. In: Les antagonismes microbiens; 24^e Colloque de la Société Française de Phytopathologie. Bordeaux (France), 1983a. p.137-44.

SY, A.A.; NORNG, K.; ALBERTINI, L.; BARRAULT, G. [Research on biological control of *Pyricularia oryzae* Cav. III. Effect of temperature on the capacity of antagonistic microorganisms to inhibit mycelial growth of the parasite in vitro]. Recherches sur la lutte biologique contre *Pyricularia oryzae* Cav. III. Influence de la température sur l'aptitude de germes antagonistes à inhiber in vitro la croissance mycelienne du parasite. *Cryptogamie Mycologie*, Paris, 4: 245-9, 1983b.

SY, A.A.; NORNG, K. ALBERTINI, L.; PETITPREZ, M. [Research on biological control of *Pyricularia oryzae* Cav. IV. Effect of pH on the ability of antagonistic microorganisms to inhibit mycelial growth of the parasite in vitro]. Recherche sur la lutte biologique contre *Pyricularia oryzae* Cav. IV. Influence du pH sur l'aptitude de germes antagonistes à inhiber in vitro la croissance mycelienne du parasite. *Cryptogamie Mycologie*, Paris, 3: 59-65, 1984.

THIRUMALACHAR, M.J. & O'BRIEN, M.J. Suppression of charcoal rot in potato with a bacterial antagonist. *Plant Disease Reporter*, Beltsville, 61: 543-6, 1977.

TOLEDO, A.C.D. & CARDOSO, E.J.B.N. Antagonismo de alguns fungos do solo ao *Fusarium moniliforme* S.H. *Summa Phytopathologica*, Piracicaba, 1: 164-8, 1975.

TOLEDO, A.C.D.; IYAMAMOTO, T.; UYENO, M.N.; OLIVEIRA, D.A. Comparação de fungicidas no controle da "brusone" do arroz. *Summa Phytopathologica*, Piracicaba, 1: 295-8, 1975.

- UMEZAWA, H.; OKAMI, Y.; SUHARA, Y.; HAMADA, M.; TAKENCHI, T.
A new antibiotic, Kasugamicin. *The Journal of Antibiotics*, Tokyo, 18: 101-3, 1965.
- UTKHEDE, R.S. & RAHE, J.G. Biological control of onion white rot. *Soil Biology & Biochemistry*, Oxford, 12: 101-4, 1980.
- UTKHEDE, R.S. & RAHE, J.G. Interactions of antagonist and pathogen in biological control of onion white rot. *Phytopathology*, St. Paul, 73: 890-3, 1983.
- VASUDEVA, R.S. & CHAKRAVARTHI, B.P. The antibiotic action of *Bacillus subtilis* in relation to certain parasitic fungi, with special reference to *Alternaria solani* (Eff. & Mart.) Jones & Grout. *Ann. Appl. Biol.*, Cambridge, 41: 612-8, 1954.
- WALLA, W. Rice diseases atlas. s.l.p. Texas Agricultural Extension Service, s.d. (Bulletin 1181). 12p.
- WOOD, R.K.S. & TVEIT, M. Control of plant diseases by use of antagonistic organisms. *The Botanical Review*, Bronx, 21: 441-92, 1955.
- YVEN, G.Y.; SCHROTH, M.N.; MACCAIN, A.H. Reduction of *Fusarium* wilt of carnation with suppression soils and antagonistic bacteria. *Plant Disease*, St. Paul, 69:1071 - 5, 1985.

8. APÊNDICES

APÊNDICE 1. Código, origem e capacidade dos microrganismos antagônicos que apareceram ao acaso nos diversos trabalhos de Laboratório do Departamento de Fitopatologia da ESALQ/USP, em causar antibiose a *Pyricularia oryzae*.

Isolado ²		Antibiose ¹
Código	Origem	
AP-1	Junto a <i>P. oryzae</i> em testes de esporulação	+
AP-2	Folha de eucalipto com <i>Cylindrocladium</i>	+
AP-3	Folha de eucalipto com <i>Cylindrocladium</i>	+
AP-4	Semente de feijão com <i>Macrophomina phaseolina</i>	+
AP-5	Semente de feijão com <i>M. phaseolina</i>	+
AP-6	Junto a <i>P. oryzae</i> em testes de esporulação	+
AP-7	Junto a <i>Rhizoctonia solani</i>	+
AP-8	Junto a <i>P. oryzae</i> em testes de esporulação	+
AP-9	Folha de eucalipto com <i>Cylindrocladium</i>	-
AP-10	Folha de eucalipto com <i>Cylindrocladium</i>	-
AP-11	Folha de eucalipto com <i>Cylindrocladium</i>	+
AP-12	Semente de feijão com <i>M. phaseolina</i>	+
AP-13	Semente de feijão com <i>M. phaseolina</i>	+
AP-14	Folha de eucalipto com <i>Cylindrocladium</i>	+
AP-15	Junto a <i>P. oryzae</i> em testes de esporulação	+
AP-16	Junto a <i>P. oryzae</i> em testes de esporulação	+
AP-17	Junto a <i>P. oryzae</i> em testes de esporulação	+
AP-18	Semente de feijão com <i>M. phaseolina</i>	+
AP-19	Junto a <i>Trichoderma</i>	+
AP-20	Folha de milho com <i>Helminthosporium</i>	+
AP-21	Junto a <i>P. oryzae</i> em testes de esporulação	+
AP-22	Junto a <i>P. oryzae</i> em testes de esporulação	-
AP-23	Folha de milho com <i>Helminthosporium</i>	+
AP-24	Junto a <i>P. oryzae</i> em testes de esporulação	+
AP-25	Junto a <i>P. oryzae</i> em testes de esporulação	+
AP-26	Folha de eucalipto com <i>Cylindrocladium</i>	-
AP-27	Junto a <i>P. oryzae</i> em testes de esporulação	+

continua...

APÊNDICE 1. Continuação

Isolado ²		Antibiose ¹
Código ³	Origem	
AP-28	Folha de eucalipto com <i>Cylindrocladium</i>	+
AP-29	Junto a <i>P. oryzae</i> em testes de esporulação	+
AP-30	Junto a <i>P. oryzae</i> em testes de esporulação	+
AP-31	Junto a <i>P. oryzae</i> em testes de esporulação	+
AP-32	Folha de eucalipto com <i>Cylindrocladium</i>	+
AP-33	Folha de eucalipto com <i>Cylindrocladium</i>	+
AP-34	Folha de eucalipto com <i>Cylindrocladium</i>	+
AP-35	Junto a <i>P. oryzae</i> em testes de esporulação	+

¹ (+) presença de antibiose a *P. oryzae*

(-) ausência de antibiose a *P. oryzae*

² Microrganismos isolados e testados quanto à antibiose a *P. oryzae* entre 06/08/84 e 20/11/84

³ AP - Antagonista a *P. oryzae*

APÊNDICE 2. Código, origem e capacidade dos microrganismos isolados de plantas de arroz coletadas no município de Boa Esperança do Sul-SP e de sementes da variedade Agulha Precoce originárias do município de Campinas-SP, em causar antibiose a *Pyricularia oryzae*.

Isolado ²		Antibiose ¹
Código ³	Origem	
AP-36	Folha de arroz	+
AP-37	Folha de arroz	+
AP-38	Folha de arroz	+
AP-39	Folha de arroz	+
AP-40	Folha de arroz	+
AP-41	Folha de arroz	+
AP-42	Folha de arroz	+
AP-43	Folha de arroz	+
AP-44	Folha de arroz	+
AP-45	Folha de arroz	+
AP-46	Folha de arroz	+
AP-47	Folha de arroz	+
AP-48	Folha de arroz	+
AP-49	Folha de arroz	+
AP-50	Folha de arroz	+
AP-51	Folha de arroz	+
AP-52	Folha de arroz	+
AP-53	Folha de arroz	+
AP-54	Raiz de arroz	+
AP-55	Raiz de arroz	+
AP-56	Raiz de arroz	+
AP-57	Folha de arroz	+
AP-58	Folha de arroz	+
AP-59	Folha de arroz	+
AP-60	Folha de arroz	+
AP-61	Folha de arroz	+

Continua...

APÊNDICE 2. Continuação

Isolado ²		Antibiose ¹
Código ³	Origem	
AP-62	Raiz de arroz	-
AP-63	Raiz de arroz	+
AP-64	Raiz de arroz	+
AP-65	Raiz de arroz	+
AP-66	Raiz de arroz	+
AP-67	Folha de arroz	+
AP-68	Folha de arroz	+
AP-69	Folha de arroz	+
AP-70	Folha de arroz	+
AP-71	Folha de arroz	+
AP-72	Raiz de arroz	+
AP-73	Semente de arroz da variedade Agulha Precoce	+
AP-74	Raiz de arroz	+
AP-75	Semente de arroz da variedade Agulha Precoce	+
AP-76	Semente de arroz da variedade Agulha Precoce	+
AP-77	Semente de arroz da variedade Agulha Precoce	+
AP-78	Semente de arroz da variedade Agulha Precoce	+
AP-79	Semente de arroz da variedade Agulha Precoce	+
AP-80	Semente de arroz da variedade Agulha Precoce	+
AP-81	Folha de arroz	+
AP-82	Folha de arroz	+
AP-83	Folha de arroz	+
AP-84	Folha de arroz	+
AP-85	Folha de arroz	+
AP-86	Folha de arroz	+
AP-87	Folha de arroz	+
AP-88	Folha de arroz	+

Continua...

APÊNDICE 2. Continuação.

Isolado ²		Antibiose ¹
Código ³	Origem	
AP-89	Folha de arroz	+
AP-90	Folha de arroz	+
AP-91	Folha de arroz	+

¹ (+) presença de antibiose a *P. oryzae*

(-) ausência de antibiose a *P. oryzae*

² Microrganismos isolados e testados quanto à antibiose a *P. oryzae* entre 20/11/84 e 29/12/84.

³ AP - Antagonista a *P. oryzae*

APÊNDICE 3. Código, origem e capacidade dos microrganismos isolados de plantas de arroz coletadas no município de Jaboticabal-SP, em causar antibiose a *Pyricularia oryzae*.

Código ³	Isolado ²	Origem	Antibiose ¹
AP-92		Folha de arroz	+
AP-93		Folha de arroz	+
AP-94		Folha de arroz	+
AP-95		Folha de arroz	+
AP-96		Folha de arroz	+
AP-97		Folha de arroz	+
AP-98		Folha de arroz	-
AP-99		Folha de arroz	+
AP-100		Folha de arroz	+
AP-101		Folha de arroz	+
AP-102		Folha de arroz	-
AP-103		Folha de arroz	-
AP-104		Folha de arroz	+
AP-105		Folha de arroz	+
AP-106		Folha de arroz	+
AP-107		Folha de arroz	+
AP-108		Folha de arroz	+
AP-109		Folha de arroz	+
AP-110		Folha de arroz	+
AP-111		Folha de arroz	+
AP-112		Folha de arroz	+
AP-113		Folha de arroz	+
AP-114		Folha de arroz	+
AP-115		Folha de arroz	+
AP-116		Folha de arroz	+
AP-117		Folha de arroz	+
AP-118		Folha de arroz	+

Continua...

APÊNDICE 3. Continuação.

Isolado ²		Antibiose ¹
Código	Origem	
AP-119	Folha de arroz	+
AP-120	Folha de arroz	+
AP-121	Folha de arroz	+
AP-122	Folha de arroz	-
AP-123	Folha de arroz	+
AP-124	Folha de arroz	+
AP-125	Folha de arroz	-
AP-126	Raiz de arroz	+
AP-127	Folha de arroz	-
AP-128	Folha de arroz	+
AP-129	Raiz de arroz	-
AP-130	Raiz de arroz	+
AP-131	Folha de arroz	+
AP-132	Folha de arroz	+
AP-133	Folha de arroz	+
AP-134	Folha de arroz	+
AP-135	Folha de arroz	+

¹ (+) presença de antibiose a *P. oryzae*

(-) ausência de antibiose a *P. oryzae*

² Microrganismos isolados e testados quanto à antibiose a *P. oryzae* entre 08/01/85 a 21/01/85.

³ AP = Antagonista a *P. oryzae*.

APÊNDICE 4. Código, origem e capacidade dos microrganismos isolados de plantas de arroz coletadas no município de Matão-SP, em causar antibiose a *Pyricularia oryzae*.

Isolado ²		Antibiose ¹
Código ³	Origem	
AP-136	Folha de arroz	+
AP-137	Folha de arroz	+
AP-138	Folha de arroz	+
AP-139	Folha de arroz	+
AP-140	Folha de arroz	+
AP-141	Folha de arroz	+
AP-142	Folha de arroz	+
AP-143	Folha de arroz	+
AP-144	Folha de arroz	+
AP-145	Folha de arroz	+
AP-146	Folha de arroz	+
AP-147	Folha de arroz	+
AP-148	Folha de arroz	+
AP-149	Folha de arroz	+
AP-150	Folha de arroz	+
AP-151	Folha de arroz	+
AP-152	Raiz de arroz	+
AP-153	Raiz de arroz	+
AP-154	Raiz de arroz	-
AP-155	Raiz de arroz	+
AP-156	Raiz de arroz	+
AP-157	Raiz de arroz	+
AP-158	Raiz de arroz	+
AP-159	Raiz de arroz	+
AP-160	Raiz de arroz	+
AP-161	Raiz de arroz	+
AP-162	Raiz de arroz	+

Continua ...

APÊNDICE 4. Continuação.

Isolado ²		Antibiose ¹
Código ³	Origem	
AP-163	Raiz de arroz	+
AP-164	Raiz de arroz	+
AP-165	Raiz de arroz	+
AP-166	Raiz de arroz	+
AP-167	Raiz de arroz	+
AP-168	Raiz de arroz	+
AP-169	Raiz de arroz	-
AP-170	Raiz de arroz	+

¹ (+) presença de antibiose a *P. oryzae*
 (-) ausência de antibiose a *P. oryzae*

² Microrganismos isolados e testados quanto a antibiose a *P. oryzae* entre 08/01/85 e 21/01/85.

³ AP = Antagonista a *P. oryzae*

APÊNDICE 5. Código, origem e capacidade dos microrganismos isolados de plantas de arroz coletadas no município de Rio Claro-SP, em causar antibiose a *Pyricularia oryzae*.

Isolado ²		Antibiose ¹
Código	Origem	
AP-171	Folha de arroz	-
AP-172	Folha de arroz	-
AP-173	Folha de arroz	+
AP-174	Raiz de arroz	-
AP-175	Folha de arroz	+
AP-176	Folha de arroz	-
AP-177	Folha de arroz	-
AP-178	Folha de arroz	+
AP-179	Folha de arroz	-
AP-180	Folha de arroz	-
AP-181	Folha de arroz	+
AP-182	Folha de arroz	+
AP-183	Folha de arroz	+
AP-184	Folha de arroz	+
AP-185	Folha de arroz	-
AP-186	Folha de arroz	-
AP-187	Folha de arroz	+
AP-188	Raiz de arroz	+
AP-189	Raiz de arroz	+
AP-190	Raiz de arroz	+
AP-191	Raiz de arroz	+
AP-192	Raiz de arroz	+
AP-193	Raiz de arroz	+
AP-194	Raiz de arroz	-
AP-195	Raiz de arroz	+
AP-196	Raiz de arroz	+
AP-197	Folha de arroz	-

Continua ...

APÊNDICE 5. Continuação

Isolado ²		Antibiose ¹
Código ³	Origem	
AP-198	Raiz de arroz	+
AP-199	Folha de arroz	+
AP-200	Folha de arroz	+
AP-201	Raiz de arroz	-
AP-202	Folha de arroz	+
AP-203	Folha de arroz	+
AP-204	Folha de arroz	+
AP-205	Folha de arroz	+
AP-206	Folha de arroz	+
AP-207	Folha de arroz	+
AP-208	Folha de arroz	-
AP-209	Folha de arroz	+
AP-210	Folha de arroz	+
AP-211	Folha de arroz	-
AP-212	Folha de arroz	+
AP-213	Raiz de arroz	+
AP-214	Folha de arroz	+
AP-215	Folha de arroz	+
AP-216	Folha de arroz	+
AP-217	Folha de arroz	-
AP-218	Folha de arroz	-
AP-219	Folha de arroz	+
AP-220	Folha de arroz	+
AP-221	Folha de arroz	-
AP-222	Solo de arroz	-
AP-223	Solo de arroz	-
AP-224	Solo de arroz	-
AP-225	Solo de arroz	-
AP-226	Solo de arroz	-

Continua...

APÊNDICE 5. Continuação.

Código ³	Isolado ²	Origem	Antibiose ¹
AP-227		Solo de arroz	+
AP-228		Solo de arroz	-
AP-229		Solo de arroz	+
AP-230		Solo de arroz	+
AP-231		Solo de arroz	-
AP-232		Semente de arroz	-
AP-233		Semente de arroz	+
AP-234		Semente de arroz	-
AP-235		Semente de arroz	-
AP-236		Semente de arroz	-
AP-237		Semente de arroz	-
AP-238		Semente de arroz	-
AP-239		Semente de arroz	-
AP-240		Semente de arroz	-
AP-241		Semente de arroz	-
AP-242		Semente de arroz	-
AP-243		Semente de arroz	-
AP-244		Semente de arroz	+
AP-245		Semente de arroz	-
AP-246		Semente de arroz	+
AP-247		Semente de arroz	-
AP-248		Raiz de arroz	+
AP-249		Raiz de arroz	+
AP-250		Raiz de arroz	+
AP-251		Raiz de arroz	+
AP-252		Raiz de arroz	+
AP-253		Raiz de arroz	-
AP-254		Raiz de arroz	+
AP-255		Raiz de arroz	+

Continua...

APÊNDICE 5. Continuação.

Código ³	Isolado ²	Origem	Antibiose ¹
AP-256		Folha de arroz	-
AP-257		Raiz de arroz	+
AP-258		Folha de arroz	-
AP-259		Raiz de arroz	-
AP-260		Raiz de arroz	-
AP-261		Folha de arroz	+
AP-262		Raiz de arroz	+
AP-263		Folha de arroz	-
AP-264		Raiz de arroz	+
AP-265		Folha de arroz	+
AP-266		Folha de arroz	+
AP-267		Folha de arroz	-
AP-268		Raiz de arroz	+
AP-269		Raiz de arroz	-
AP-270		Folha de arroz	+
AP-271		Raiz de arroz	+
AP-272		Raiz de arroz	-
AP-273		Raiz de arroz	+
AP-274		Raiz de arroz	-
AP-275		Raiz de arroz	+
AP-276		Raiz de arroz	+
AP-277		Raiz de arroz	+
AP-278		Raiz de arroz	+
AP-279		Raiz de arroz	+
AP-280		Folha de arroz	-
AP-281		Folha de arroz	+
AP-282		Folha de arroz	-
AP-283		Folha de arroz	-
AP-284		Folha de arroz	+

Continua...

APÊNDICE 5. Continuação.

Código ³	Trisolado ² Origem	Antibiose ¹
AP-285	Folha de arroz	-
AP-286	Folha de arroz	+
AP-287	Folha de arroz	+
AP-288	Folha de arroz	-
AP-289	Folha de arroz	-
AP-290	Folha de arroz	+
AP-291	Folha de arroz	-
AP-292	Folha de arroz	+
AP-293	Semente de arroz	+
AP-294	Folha de arroz	+
AP-295	Folha de arroz	+
AP-296	Folha de arroz	+
AP-297	Folha de arroz	+
AP-298	Folha de arroz	+
AP-299	Folha de arroz	+
AP-300	Folha de arroz	+
AP-301	Folha de arroz	+
AP-302	Folha de arroz	+
AP-303	Folha de arroz	-
AP-304	Folha de arroz	-
AP-305	Folha de arroz	-
AP-306	Folha de arroz	+
AP-307	Folha de arroz	-
AP-308	Raiz de arroz	-
AP-309	Raiz de arroz	-
AP-310	Raiz de arroz	-
AP-311	Raiz de arroz	-
AP-312	Raiz de arroz	+
AP-313	Raiz de arroz	+

Continua...

APÊNDICE 5. Continuação.

Código ³	Isolado ²	Origem	Antibiose ¹
AP-314		Raiz de arroz	-
AP-315		Raiz de arroz	-
AP-316		Raiz de arroz	-
AP-317		Raiz de arroz	+
AP-318		Raiz de arroz	-
AP-319		Raiz de arroz	+
AP-320		Raiz de arroz	-
AP-321		Raiz de arroz	+
AP-322		Raiz de arroz	+
AP-323		Raiz de arroz	+
AP-324		Folha de arroz	+
AP-325		Folha de arroz	+
AP-326		Folha de arroz	+
AP-327		Raiz de arroz	-
AP-328		Folha de arroz	+
AP-329		Folha de arroz	+
AP-330		Folha de arroz	-
AP-331		Folha de arroz	+
AP-332		Folha de arroz	+
AP-333		Folha de arroz	+
AP-334		Folha de arroz	+
AP-335		Raiz de arroz	+
AP-336		Raiz de arroz	+
AP-337		Folha de arroz	-
AP-338		Folha de arroz	+
AP-339		Folha de arroz	+
AP-340		Folha de arroz	+
AP-341		Folha de arroz	-

Continua ...

APÊNDICE 5. Continuação.

Código ³	Isolado ²	Origem	Antibiose ¹
AP-342		Folha de arroz	+
AP-343		Folha de arroz	+
AP-344		Folha de arroz	+
AP-345		Folha de arroz	+
AP-346		Folha de arroz	+
AP-347		Folha de arroz	-
AP-348		Folha de arroz	+
AP-349		Folha de arroz	+

¹ (+) presença de antibiose a *P. oryzae*
 (-) ausência de antibiose *P. oryzae*

² Microrganismos isolados e testados quanto à antibiose a *P. oryzae*
 entre 14/01/85 a 31/01/85

³ AP = Antagonista a *P. oryzae*

APÊNDICE 6. Código, origem e capacidade dos microrganismos isolados de plantas de arroz coletadas no município de Piracicaba-SP, em causar antibiose a *Pyricularia oryzae*.

Isolado ²		Antibiose ¹
Código ³	Origem	
AP-350	Semente de arroz	+
AP-351	Semente de arroz	+
AP-352	Semente de arroz	+
AP-353	Semente de arroz	+
AP-354	Semente de arroz	+
AP-355	Semente de arroz	+
AP-356	Semente de arroz	+
AP-357	Semente de arroz	+
AP-358	Semente de arroz	+
AP-359	Semente de arroz	+
AP-360	Semente de arroz	-
AP-361	Semente de arroz	+
AP-362	Semente de arroz	+
AP-363	Semente de arroz	+
AP-364	Semente de arroz	+
AP-365	Semente de arroz	+
AP-366	Folha de arroz	+
AP-367	Folha de arroz	-
AP-368	Folha de arroz	-
AP-369	Folha de arroz	-
AP-370	Folha de arroz	+
AP-371	Folha de arroz	-
AP-372	Folha de arroz	+
AP-373	Folha de arroz	+
AP-374	Folha de arroz	+
AP-375	Folha de arroz	-
AP-376	Folha de arroz	-

Continua ...

APÊNDICE 6. Continuação.

Isolado ²		Antibiose ¹
Código ³	Origem	
AP-377	Folha de arroz	-
AP-378	Raiz de arroz	+
AP-379	Raiz de arroz	+
AP-380	Raiz de arroz	+
AP-381	Raiz de arroz	+
AP-382	Raiz de arroz	-
AP-383	Raiz de arroz	-
AP-384	Raiz de arroz	-
AP-385	Raiz de arroz	+
AP-386	Raiz de arroz	+

¹ (+) presença de antibiose a *P. oryzae*
 (-) ausência de antibiose a *P. oryzae*

² Microrganismos isolados e testados quanto à antibiose a *P. oryzae*
 entre 06/02/85 e 14/03/85

³ AP = Anatagonista a *P. oryzae*

APÊNDICE 7. Código, origem e capacidade dos microrganismos isolados de plantas de arroz coletadas no município de Goiânia-GO, em causar antibiose a *Pyricularia oryzae*.

Isolado ²		Antibiose ¹
Código ³	Origem	
AP-387	Folha de arroz	+
AP-388	Folha de arroz	+
AP-389	Folha de arroz	+
AP-390	Folha de arroz	+
AP-391	Folha de arroz	+
AP-392	Folha de arroz	+
AP-393	Folha de arroz	+
AP-394	Folha de arroz	+
AP-395	Folha de arroz	+
AP-396	Folha de arroz	+
AP-397	Folha de arroz	+
AP-398	Folha de arroz	+
AP-399	Folha de arroz	-
AP-400	Folha de arroz	+
AP-401	Folha de arroz	+
AP-402	Folha de arroz	+
AP-403	Folha de arroz	-
AP-404	Folha de arroz	+
AP-405	Folha de arroz	+
AP-406	Folha de arroz	+
AP-407	Folha de arroz	+
AP-408	Folha de arroz	-
AP-409	Folha de arroz	+
AP-410	Folha de arroz	-
AP-411	Folha de arroz	+
AP-412	Folha de arroz	-
AP-413	Folha de arroz	+
AP-414	Folha de arroz	+

Continua ...

APÊNDICE 7. Continuação.

Isolado ²		Antibiose ¹
Código ³	Origem	
AP-415	Folha de arroz	+
AP-416	Folha de arroz	-
AP-417	Folha de arroz	+
AP-418	Folha de arroz	+
AP-419	Folha de arroz	+
AP-420	Folha de arroz	+
AP-421	Folha de arroz	-
AP-422	Folha de arroz	+
AP-423	Folha de arroz	-
AP-424	Folha de arroz	+
AP-425	Folha de arroz	+
AP-426	Folha de arroz	+
AP-427	Folha de arroz	+
AP-428	Folha de arroz	-
AP-429	Folha de arroz	+
AP-430	Folha de arroz	-
AP-431	Folha de arroz	+
AP-432	Folha de arroz	-
AP-433	Folha de arroz	+
AP-434	Folha de arroz	-
AP-435	Folha de arroz	-
AP-436	Folha de arroz	+

¹ (+) presença de antibiose a *P. oryzae*
 (-) ausência de antibiose a *P. oryzae*

² Microrganismos isolados e testados quanto à antibiose a *P. oryzae*
 entre 07/03/85 e 23/03/85

³ AP = Antagonista a *P. oryzae*

APÊNDICE 8. Código, origem e capacidade dos microrganismos isolados de plantas de arroz coletadas no município de Ribeirão Preto- SP, em causar antibiose a *Pyricularia oryzae*.

Isolado ²		Antibiose ¹
Código ³	Origem	
AP-437	Folha de arroz	-
AP-438	Folha de arroz	+
AP-439	Folha de arroz	+
AP-440	Folha de arroz	-
AP-441	Folha de arroz	-
AP-442	Folha de arroz	+
AP-443	Folha de arroz	-
AP-444	Folha de arroz	+
AP-445	Folha de arro	-
AP-446	Folha de arroz	-
AP-447	Folha de arroz	-
AP-448	Folha de arroz	+
AP-449	Folha de arroz	-
AP-450	Folha de arroz	-
AP-451	Folha de arroz	+
AP-452	Folha de arroz	-
AP-453	Folha de arroz	-
AP-454	Folha de arroz	-
AP-455	Folha de arroz	-
AP-456	Folha de arroz	-
AP-457	Folha de arroz	+
AP-458	Folha de arroz	-
AP-459	Folha de arroz	+
AP-460	Folha de arroz	+
AP-461	Folha de arroz	+
AP-462	Folha de arroz	+
AP-463	Folha de arroz	+

Continua ...

APÊNDICE 8. Continuação.

Isolado ²		Antibiose ¹
Código ³	Origem	
AP-464	Folha de arroz	+
AP-465	Folha de arroz	+
AP-466	Folha de arroz	+
AP-467	Folha de arroz	+
AP-468	Folha de arroz	+
AP-469	Folha de arroz	+
AP-470	Folha de arroz	+
AP-471	Folha de arroz	+
AP-472	Folha de arroz	+

¹ (+) presença de antibiose a *P. oryzae*
 (-) ausência de antibiose a *P. oryzae*

² Microrganismos isolados e testados quanto à antibiose a *P. oryzae*
 entre 09/03/85 a 28/03/85

³ AP = Antagonista a *P. oryzae*

APÊNDICE 9. Efeito de antagonistas sobre o crescimento micelial de *Pyricularia oryzae*, *in vitro*, avaliado através da porcentagem de inibição e da relação entre a porcentagem de inibição e o crescimento do antagonista¹.

Isolado	Inibição de <i>P. oryzae</i> (%)	Porcentagem de inibição/ crescimento do antagonista
AP-1	24,59	0,71
AP-2	14,71	1,36
AP-3	29,08	0,79
AP-5	20,10	0,61
AP-7	15,61	0,62
AP-8	18,30	0,66
AP-11	25,49	0,86
AP-12	27,28	0,99
AP-13	24,59	0,91
AP-15	22,79	0,75
AP-16	19,20	0,66
AP-24	7,53	0,27
AP-25	25,49	0,85
AP-27	21,89	0,91
AP-28	24,59	0,68
AP-31	21,89	0,78
AP-33	28,18	0,85
AP-36	22,80	0,63
AP-37	21,90	0,58
AP-38	21,90	0,74

¹ Os isolados AP-4, AP-6, AP-14, AP-17, AP-18, AP-19, AP-20, AP-21, AP-22, AP-23, AP-29, AP-32 e AP-35, também foram incluídos nos testes, mas não apresentaram paralisação no crescimento de *P. oryzae*. Ensaio realizado entre 01/04/85 e 17/04/85.

APÊNDICE 10. Efeito de antagonistas sobre o crescimento micelial de *Pyricularia oryzae*, *in vitro*, avaliado através da porcentagem de inibição e da relação entre a porcentagem de inibição e o crescimento do antagonista ¹.

Isolado	Inibição de <i>P. oryzae</i> (%)	Porcentagem de inibição/ crescimento do antagonista
AP-39	17,37	0,71
AP-40	20,89	0,63
AP-41	14,73	0,50
AP-42	23,52	0,57
AP-43	17,37	0,57
AP-44	17,37	0,45
AP-45	17,37	0,46
AP-46	20,01	0,55
AP-47	21,77	0,62
AP-48	20,89	0,67

¹ Ensaio realizado entre 12/04/85 e 19/04/85.

APÊNDICE 11. Efeito de antagonistas sobre o crescimento micelial de *Pyricularia oryzae*, *in vitro*, avaliado através da porcentagem de inibição e da relação entre a porcentagem de inibição e o crescimento do antagonista¹.

Isolado	Inibição de <i>P. oryzae</i> (%)	Porcentagem de inibição/ crescimento do antagonista
AP-49	25,44	0,84
AP-50	22,81	0,70
AP-51	26,32	0,84
AP-53	14,63	0,55
AP-54	21,38	0,59
AP-55	18,42	0,57
AP-56	9,65	0,32
AP-57	24,39	0,53
AP-58	18,70	0,52
AP-59	19,51	0,55
AP-60	23,58	0,56
AP-61	17,07	0,41
AP-63	15,44	0,39
AP-64	21,14	0,54
AP-65	15,44	0,42
AP-66	13,82	0,36
AP-67	18,70	0,50
AP-69	18,70	0,49
AP-70	12,20	0,41
AP-71	12,19	0,37
AP-72	13,01	0,55
AP-73	17,07	0,50
AP-74	20,32	0,53
AP-75	17,07	0,51
AP-76	20,32	0,65
AP-77	17,89	0,54

¹ O isolado AP-52 foi incluído no teste não apresentando paralização no crescimento de *P. oryzae*. Ensaio realizado entre 17/04/85 e 25/04/85.

APÊNDICE 12. Efeito de antagonistas sobre o crescimento micelial de *Pyricularia oryzae*, in vitro, avaliado através da porcentagem de inibição e da relação entre a porcentagem de inibição e o crescimento do antagonista¹.

Isolado	Inibição de <i>P. oryzae</i> (%)	Porcentagem de inibição/ crescimento do antagonista
AP-68	13,52	0,49
AP-78	15,06	0,69
AP-79	18,15	0,52
AP-80	16,61	0,54
AP-81	12,75	0,37
AP-82	15,84	0,47
AP-83	18,93	0,61
AP-84	18,15	0,59
AP-85	18,93	0,65
AP-86	16,61	0,64
AP-87	16,61	0,56
AP-88	18,15	0,55
AP-89	14,29	0,44
AP-90	18,93	0,60
AP-91	19,70	0,91
AP-92	17,38	0,65
AP-93	16,61	0,59

¹ Ensaio realizado entre 19/04/85 e 28/04/85.

APÊNDICE 13. Efeito de antagonistas sobre o crescimento micelial de *Pyricularia oryzae*, in vitro, avaliado através da porcentagem de inibição e da relação entre porcentagem de inibição e o crescimento do antagonista ¹.

Isolado	Inibição de <i>P. oryzae</i> (%)	Porcentagem de inibição/ crescimento do antagonista
AP-95	13,29	0,48
AP-97	14,85	0,42
AP-99	20,32	0,64
AP-100	19,54	0,61
AP-105	23,45	0,61
AP-106	17,98	0,54
AP-108	17,98	0,52
AP-109	21,88	0,66
AP-110	23,44	0,64
AP-115	23,44	0,65

¹ O isolado AP-101 foi incluído no teste, não apresentando paralização no crescimento de *P. oryzae*. Ensaio realizado entre 25/04/85 e 04/05/85.

APÊNDICE 14. Efeito de antagonistas sobre o crescimento micelial de *Pyricularia oryzae*, *in vitro*, avaliado através da porcentagem de inibição e da relação entre a porcentagem de inibição e o crescimento do antagonista¹.

Isolado	Inibição de <i>P. oryzae</i> (%)	Porcentagem de inibição/ crescimento do antagonista
AP-111	19,41	0,76
AP-112	17,84	0,74
AP-117	19,41	0,65
AP-118	15,49	0,62
AP-119	20,97	0,81
AP-120	20,97	0,68
AP-121	20,19	0,93
AP-123	20,97	0,78
AP-124	16,27	0,81
AP-126	19,40	0,87
AP-128	21,76	0,76
AP-129	16,28	0,62
AP-130	16,27	0,62
AP-131	18,62	0,94
AP-133	17,06	0,79
AP-134	18,62	0,91
AP-135	19,41	0,87
AP-136	17,85	0,74
AP-137	23,32	0,88
AP-138	20,19	0,75
AP-139	20,19	0,74
AP-140	19,41	0,69
AP-141	19,41	0,73
AP-144	20,19	0,76
AP-145	17,06	0,67
AP-146	17,06	0,64
AP-147	19,41	0,80
AP-148	20,19	0,99

Continua

APÊNDICE 14. Continuação.

Isolado	Inibição de <i>P. oryzae</i> (%)	Porcentagem de inibição/ crescimento do antagonista
AP-149	20,19	0,86
AP-150	24,88	0,90

¹ Os isolados AP-127, AP-143 e AP-151 foram incluídos no teste, não apresentando paralisação no crescimento de *P. oryzae*. Ensaio realizado entre 29/04/85 e 08/05/85.

APÊNDICE 15. Efeito de antagonistas sobre o crescimento micelial de *Pyricularia oryzae*, *in vitro*, avaliado através da porcentagem de inibição e da relação entre a porcentagem de inibição e o crescimento do antagonista ¹.

Isolado	Inibição de <i>P. oryzae</i> (%)	Porcentagem de inibição/ crescimento do antagonista
AP-152	17,67	0,54
AP-156	11,62	0,61
AP-157	19,19	0,64
AP-158	16,67	0,73
AP-159	17,51	0,61
AP-160	12,46	0,59
AP-161	13,30	0,47
AP-162	16,67	0,51
AP-164	19,19	0,55
AP-165	20,03	0,61
AP-166	14,14	0,43
AP-167	13,30	0,49
AP-168	17,51	0,65
AP-170	9,09	0,38
AP-173	16,67	0,50
AP-175	13,30	0,64
AP-176	10,77	0,45
AP-178	18,35	0,59
AP-181	19,19	0,64
AP-182	11,62	0,39

¹ O isolado AP-153 foi incluído no teste, não apresentando paralização no crescimento de *P. oryzae*. Ensaio realizado entre 02/05/85 e 12/05/85.

APÊNDICE 16. Efeito de antagonistas sobre o crescimento micelial de *Pyricularia oryzae*, *in vitro*, avaliado através da porcentagem de inibição e da relação entre a porcentagem de inibição e o crescimento do antagonista ¹.

Isolado	Inibição de <i>P. oryzae</i> (%)	Porcentagem de inibição/ crescimento do antagonista
AP-183	26,72	0,83
AP-187	21,38	0,65
AP-190	21,38	0,66
AP-192	24,43	0,85
AP-195	20,61	0,59
AP-198	19,85	1,02
AP-199	23,67	0,77
AP-200	19,85	0,74
AP-202	23,67	0,73
AP-203	14,51	0,99
AP-204	18,32	1,49
AP-205	14,51	1,05
AP-206	23,67	0,75
AP-209	19,85	0,83
AP-210	22,90	1,00
AP-212	17,56	1,03
AP-213	18,32	0,97
AP-214	21,38	0,76
AP-215	20,61	0,60
AP-216	19,85	0,66
AP-219	12,22	0,91
AP-223	26,17	0,67
AP-238	12,98	0,77
AP-239	21,38	0,66
AP-249	19,85	0,66
AP-250	19,09	1,38
AP-252	16,80	0,54
AP-255	21,38	0,70

Continua ...

APÊNDICE 16. Continuação.

Isolado	Inibição de <i>P. oryzae</i> (%)	Porcentagem de inibição/ crescimento do antagonista
AP-257	16,03	0,55
AP-262	23,67	1,53

¹ Os isolados AP-184, AP-188, AP-189, AP-193, AP-196, AP-220, AP-229, AP-230, AP-244, AP-246 e AP-264, foram incluídos no teste, não apresentando paralização no crescimento de *P. oryzae*. Ensaio realizado entre 12/05/85 e 21/05/85.

APÊNDICE 17. Efeito de antagonistas sobre o crescimento micelial de *Pyricularia oryzae*, *in vitro*, avaliado através da porcentagem de inibição e da relação entre a porcentagem de inibição e o crescimento do antagonista ¹.

Isolado	Inibição de <i>P. oryzae</i> (%)	Porcentagem de inibição/ crescimento do antagonista
AP-275	22,05	0,71
AP-276	23,52	0,80
AP-277	22,79	0,75
AP-281	22,79	0,81
AP-284	19,11	0,73
AP-286	24,99	0,77
AP-287	27,20	0,87
AP-289	21,32	0,71
AP-290	18,38	0,68
AP-292	19,85	0,65
AP-293	17,64	0,94
AP-294	13,23	0,51
AP-296	11,76	0,82
AP-297	20,58	0,56
AP-302	21,32	0,52
AP-321	24,26	0,79
AP-322	22,79	0,84
AP-323	25,00	0,83
AP-324	22,79	0,86
AP-325	25,73	0,67
AP-326	24,26	1,11
AP-328	24,99	0,84
AP-329	19,85	0,72
AP-331	22,05	2,14
AP-332	26,47	0,74
AP-338	18,37	0,62

Continua ...

APÊNDICE 17. Continuação.

Isolado	Inibição de <i>P. oryzae</i> (%)	Porcentagem de inibição/ crescimento do antagonista
AP-339	26,47	0,82
AP-340	24,99	0,83

¹ Os isolados AP-278, AP-279, AP-299, SP-300, AP-301, AP-306, AP-313, AP-317, AP-319, AP-334, AP-335 e AP-336, foram incluídos no teste, não apresentando paralização no crescimento de *P. oryzae*. Ensaio realizado entre 15/05/85 e 25/05/85.

APÊNDICE 18. Efeito de antagonistas sobre o crescimento micelial de *Pyricularia oryzae*, *in vitro*, avaliado através da porcentagem de inibição e da relação entre a porcentagem de inibição e o crescimento do antagonista ¹.

Isolado	Inibição de <i>P. oryzae</i> (%)	Porcentagem de inibição/ crescimento do antagonista
AP-343	19,78	0,65
AP-344	23,46	0,89
AP-345	21,98	0,62
AP-348	23,46	0,91
AP-349	25,66	0,86
AP-350	23,46	0,72
AP-351	24,93	0,67
AP-352	25,66	0,83
AP-353	21,98	0,80
AP-354	24,19	0,70
AP-355	16,83	0,59
AP-356	24,93	0,77
AP-357	23,46	0,68
AP-358	23,46	0,74
AP-359	23,46	0,86
AP-363	20,51	0,65
AP-364	21,25	0,92
AP-365	28,61	0,89
AP-366	27,14	0,90
AP-370	23,46	0,72
AP-372	22,72	0,67
AP-373	24,19	0,77
AP-374	21,25	2,12
AP-378	21,98	0,90
AP-381	21,98	0,66

¹ Os isolados AP-346 e AP-380 foram incluídos no teste, não apresentando paralização no crescimento de *P. oryzae*. Ensaio realizado entre 23/05/85 e 02/06/85.

APÊNDICE 19. Efeito de antagonistas sobre o crescimento micelial de *Pyricularia oryzae*, in vitro, avaliado através da porcentagem de inibição e da relação entre a porcentagem de inibição e o crescimento do antagonista¹.

Isolado	Inibição de <i>P. oryzae</i> (%)	Porcentagem de inibição/ crescimento do antagonista
AP-361	15,90	0,60
AP-386	18,19	1,07
AP-387	15,90	0,68
AP-389	22,02	0,83
AP-390	21,25	1,23
AP-391	22,02	0,82
AP-392	21,25	1,03
AP-393	23,55	1,21
AP-394	15,90	1,01
AP-395	14,37	1,18
AP-397	22,02	0,73
AP-398	14,37	0,67
AP-400	24,31	1,03
AP-402	21,25	1,34
AP-404	19,72	1,35
AP-405	18,96	1,70
AP-406	24,31	0,86
AP-407	19,72	0,99
AP-409	14,37	1,40
AP-411	22,02	0,71
AP-413	22,78	1,36
AP-415	15,90	1,50
AP-417	18,19	1,60
AP-418	18,96	0,61
AP-419	23,55	0,83
AP-422	19,72	0,78
AP-425	20,49	0,76

Continua ...

APÊNDICE 19. Continuação

Isolado	Inibição de <i>P. oryzae</i> (%)	Porcentagem de inibição/ crescimento do antagonista
AP-426	21,25	0,85
AP-427	21,25	1,18
AP-429	24,31	1,59
AP-431	23,55	1,77
AP-433	25,84	0,94
AP-436	22,02	0,91
AP-439	24,31	1,06
AP-442	18,19	1,11
AP-444	23,55	1,25
AP-448	23,55	0,84
AP-451	20,49	1,14
AP-459	23,55	0,88
AP-401	25,08	1,85

¹ Os isolados AP-375, AP-388, AP-396, AP-414, AP-438 e AP-457, foram incluídos no teste, não apresentando paralização no crescimento de *P.oryzae*. Ensaio realizado entre 30/05/85 e 09/06/86.

APÊNDICE 20. Efeito de antagonistas sobre o crescimento micelial de *Pyricularia oryzae*, in vitro, avaliado através da porcentagem de inibição e da relação entre porcentagem de inibição e o crescimento do antagonista ¹.

Isolado	Inibição de <i>P. oryzae</i> (%)	Porcentagem de inibição/ crescimento do antagonista
AP-420	30,39	1,28
AP-427	27,71	1,00
AP-461	27,71	1,04
AP-462	29,05	1,04
AP-463	29,72	1,21
AP-464	28,38	2,00
AP-466	26,37	0,90
AP-467	29,72	1,98
AP-469	27,04	0,86
AP-470	26,37	0,94
AP-471	33,73	1,34
AP-472	29,72	0,81

¹ O isolado AP-468 foi incluído no teste, não apresentando paralização no crescimento de *P. oryzae*. Ensaio realizado entre 02/06/85 e 15/06/85.

APÊNDICE 21. Efeito de antagonistas sobre o crescimento micelial de *Pyricularia oryzae*, *in vitro*, avaliado através da porcentagem de inibição e da relação entre a porcentagem de inibição e o crescimento do antagonista.

Isolado	Inibição de <i>P. oryzae</i> (%)	Porcentagem de inibição/ crescimento do antagonista
AP-94	23,77	0,79
AP-96	20,03	0,67
AP-104	21,52	0,66
AP-107	20,78	0,86
AP-114	26,01	0,74
AP-116	22,27	0,64
AP-142	22,27	0,58
AP-207	21,52	0,64
AP-333	21,42	0,70
AP-379	9,42	0,50
AP-385	17,04	0,57
AP-460	20,77	0,63
AP-113	23,77	0,73

¹ Ensaio realizado entre 20/06/85 e 02/07/85.

