

Microbiolização de sementes de arroz com *Bacillus* spp. na redução de patógenos
Microbiolization of rice seeds with *Bacillus* spp. at pathogen reduction
Microbiolización de semillas de arroz con *Bacillus* spp. en la reducción de patógenos

Recebido: 00/09/2020 | Revisado: 00/09/2020 | Aceito: 15/09/2020 | Publicado: 17/09/2020

Ivaneide de Oliveira Nascimento

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7095-7092>

Universidade Estadual da Região Tocantina do Maranhão, Brasil

E-mail: ivaneide@uemasul.edu.br

Antônia Alice Costa Rodrigues

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9084-0868>

Universidade Estadual do Maranhão, Brasil

E-mail: aacrodrigues@outlook.com

Kele Sousa Pires Andrade

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7083-3962>

Universidade Estadual da Região Tocantina do Maranhão, Brasil

E-mail: kelesousapires@gmail.com

Wanderson Lima Cunha

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5639-5377>

Universidade Estadual da Região Tocantina do Maranhão, Brasil

E-mail: Lwanderson8c@gmail.com

Flávio Henrique Reis Moraes

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7765-4278>

Universidade CEUMA, Brasil

E-mail: fhmoraes@yahoo.com.br

Flávia Arruda de Sousa

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6726-5984>

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Maranhão, Brasil

E-mail: flaviaarruda@ifma.edu.br

Resumo

As sementes são componentes essenciais da economia, nelas está contida a vida e a possibilidade de disseminação de doenças, sendo a sanidade importante para o

desenvolvimento sadio de plantas com altos rendimentos. O trabalho objetivou-se avaliar a qualidade sanitária de sementes de arroz da variedade Bonança e a redução de fitopatógenos, utilizando a microbiolização de sementes com *Bacillus macerans*, *B. polymyxa*, *B. pentothenticus*, *B. lentus*, *B. pumilus*, *B. stearothermophilus* e *Bacillus* sp.. A sanidade das sementes foi avaliada pelo método *Blotter Test*. A redução da incidência dos fitopatógenos nas sementes foi analisada por microbiolização para cada isolado e posteriormente, as sementes foram semeadas em solo esterilizado. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado nos experimentos em laboratório e em casa de vegetação. Avaliou-se a incidência e redução dos fitopatógenos em sementes e plantas de arroz aos sete e quatorze dias após a semeadura. As sementes foram avaliadas em lupa para identificar colônias de fungos. Quanto às plantas, em cada época retirou-se 100 plantas e realizou-se a assepsia usual. Os resultados do teste *in vitro* as sementes de arroz variedade Bonança, microbiolizadas com os *Bacillus* spp., reduziram a incidência de *Curvularia oryzae* e *Aspergillus niger*. Nas plantas originadas das sementes microbiolizadas com os *Bacillus* spp., observou-se a redução da incidência de *Curvularia oryzae*, *Aspergillus niger* e *Scopulariopsis* sp. A ação dos isolados foi diferenciada quanto ao patógeno e o tempo após a microbiolização das sementes.

Palavras-chave: Controle biológico; Fitopatógenos de semente; Arroz.

Abstract

Seeds are essential components of the economy, they contain life and the possibility of spreading diseases, and sanity is important for obtaining healthy plants with high yields. This work aimed to evaluate the sanitary quality of rice seeds of the Bonança variety and the reduction of phytopathogens, using seed microbiolization with *Bacillus macerans*, *B. polymyxa*, *B. pentothenticus*, *B. lentus*, *B. pumilus*, *B. stearothermophilus* e *Bacillus* sp.. For the seed health test, the *Blotter Test* method was used. In order to evaluate the reduction of the incidence of phytopathogens in the seeds, the microbiolization procedure was performed for each isolate and later the seeds were sown in sterile soil. The experimental design used was completely randomized in the laboratory and greenhouse experiments. The incidence and reduction of phytopathogens in rice seeds and plants was evaluated at seven and fourteen days after sowing. The seeds were evaluated using a magnifying glass to identify colonies of fungi. As for plants, 100 plants were removed in each season and the usual asepsis was performed. The results of the *in vitro* test of Bonança rice seeds, microbiolized with *Bacillus* spp., Reduced the incidence of *Curvularia oryzae* and *Aspergillus niger*. In plants originated from

microbiolized seeds with *Bacillus* spp. a reduction in the incidence of the pathogens *Curvularia oryzae*, *Aspergillus niger* and *Scopulariopsis* sp. The action of the isolates was differentiated as to the pathogen and the time after microbiolization of the seeds.

Keywords: Biological control; Seed plant pathogen; Rice.

Resumen

Las semillas son componentes esenciales de la economía, contienen la vida y la posibilidad de propagar enfermedades, y su salubridad es importante para obtener plantas sanas con altos rendimientos. Este trabajo tuvo como objetivo evaluar la calidad sanitaria de las semillas de arroz de la variedad bonança y la reducción de fitopatógenos, utilizando microbiolización de semillas con *Bacillus macerans*, *B. polymyxa*, *B. pentotheticus*, *B. lentus*, *B. pumilus*, *B. stearothermophilus* e *Bacillus* spp. Para la prueba de salud de semillas, se usó el método de prueba de transferencia. Para evaluar la reducción de la incidencia de fitopatógenos en las semillas, se realizó el procedimiento de microbiolización para cada aislado y luego se sembraron las semillas en suelo estéril. El diseño experimental utilizado fue completamente al azar en los experimentos de laboratorio e invernadero. La incidencia y reducción de fitopatógenos en semillas y plantas de arroz se evaluó a los siete y catorce días después de la siembra. Las semillas se evaluaron usando una lupa para identificar colonias de hongos. En cuanto a las plantas, se eliminaron 100 plantas en cada estación y se realizó la asepsia habitual. Los resultados de la prueba in vitro de semillas de arroz bonança, microbiolizadas con *bacillus* spp. Redujeron la incidencia de *Curvularia oryzae* y *Aspergillus niger* en plantas originadas a partir de semillas microbiolizadas con *Bacillus* spp. Se observó una reducción en la incidencia de los patógenos *Curvularia oryzae*, *Aspergillus niger* y *Scopulariopsis* sp. La acción de los aislamientos fue diferenciada en cuanto al patógeno y el tiempo después de la microbiolización de las semillas.

Palabras clave: Control biológico; Fitopatógenos de semillas; Arroz.

1. Introdução

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

tempos coloniais, alcançando a condição de maior produtor no hemisfério ocidental (Pereira, 2002).

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

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

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

No manejo integrado de doenças, o tratamento sanitário das sementes é recomendado e têm como principal função minimizar a incidência de doenças na fase de pré-plantio, o que reduz o uso de defensivos químicos e evita sérios problemas de poluição (Machado et al., 2000). Portanto, a busca do manejo de fitopatógenos por meio de medidas que não afetem o equilíbrio do ambiente e nem causem danos à saúde humana e animal, se faz fundamental como mais uma alternativa para o controle de doença de plantas na busca de uma agricultura sustentável e com menor impacto ambiental.

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

2. Metodologia

A metodologia adotada no presente artigo foi de cunho quantitativo, pois conforme Pereira et al., (2018), fez-se a coleta de dados quantitativos ou numéricos, por meio do uso de medições de grandezas, e obteve-se através da metrologia, números com suas respectivas unidades. Desta forma, gerou-se um conjunto de dados que foram analisados por meio de programa estatístico, onde se realizou a análise de variância dos dados e a comparação das médias pelo teste de Tukey ao nível de 10% de probabilidade.

2.1 Localização do experimento

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Fitopatologia e em casa de vegetação da Universidade Estadual do Maranhão – UEMA. As sementes utilizadas são da variedade Bonança e os isolados B6 (*Bacillus* sp.), B16 (*B. macerans*), B22 (*B. polymyxa*), B22' (*B. pentothenticus*), B25 (*B. pumilus*), B31 (*B. cereus*), B32 (*B. stearothermophilus*), B33 (*B. polymyxa*), B35 (*B. pumilus*) e B41 (*B. cereus*) extraídos de folhas de arroz.

2.2 Sanidade de sementes

O teste de sanidade de sementes foi realizado pelo método do papel de filtro (*Blotter Test*) com a utilização de 400 sementes, de acordo com as regras de análise de sementes (Brasil, 1992). Antes da realização deste teste, desinfestou-se as sementes com uma solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 1,5 % de cloro ativo por cinco minutos e, após, efetuou-se dupla lavagem com água esterilizada. Em seguida, as sementes foram colocadas em placas de petri, sendo 20 sementes por recipiente, previamente esterilizadas por autoclavagem a 1 atm por 20 minutos e por exposição à luz ultravioleta (UV), durante 20 minutos, contendo três camadas de papel de filtro esterilizado e umedecido com água destilada e esterilizada. As sementes foram incubadas em condições de fotoperíodo de 12 horas, à temperatura de aproximadamente $26\pm 5^{\circ}\text{C}$, durante sete dias.

O levantamento da população fúngica das sementes não germinadas e plântulas foi realizado com auxílio de microscópio estereoscópico (Zeiss com aumento de 50x), após sete dias do plaqueamento. As colônias desenvolvidas sobre as sementes e plântulas foram transferidas para meio de cultivo BDA (batata-dextrose-ágar), para viabilizar sua identificação.

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

Para avaliar a redução da incidência de fitopatógenos nas sementes de arroz foi utilizada a metodologia de Ludwig et al. (2004) com modificações, a qual consiste em microbiolizar as sementes com os isolados de *Bacillus* na forma de suspensão, com adição solução salina (NaCl 0,85%) a cada um dos *Bacillus* e concentração ajustada para OD₅₄₀=0,5. Desse modo, as sementes foram imersas nesta suspensão, agitadas durante 30 minutos à 25 °C, usando-se em cada recipiente 100 sementes. Em seguida, as sementes foram colocadas em placas de petri, usando-se 100 sementes/*Bacillus* pelo método do papel de filtro em placas de Petri (Brasil, 1992), incubadas à 26,5° C, sob regime de fotoperíodo de 12 h. Após esse período, a avaliação da incidência fúngica foi realizada após sete dias, examinando individualmente as sementes em um microscópio estereoscópico no aumento de 40 x.

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

2.4 Microbiolização de sementes de arroz variedade bonança com *Bacillus* spp. Para instalação de experimento em casa de vegetação

No tratamento das sementes foi utilizada a metodologia de Ludwig et al. (2004). Após o tratamento com dez espécies de *Bacillus* spp., as sementes foram semeadas em 22 bandejas contendo solo autoclavado. Em cada recipiente semeou-se 200 sementes, distribuídas em quatro repetições, no delineamento inteiramente casualizado. As avaliações foram realizadas em duas épocas, aos 7 e 14 dias após a semeadura, coletando-se 100 plantas ao acaso, cuidadosamente, de modo a causar o mínimo de danos em seus órgãos. As plantas foram lavadas em água corrente para retirada do excesso de solo aderido ao sistema

radicular e levadas ao laboratório. De cada planta, destacaram-se as glumas, raízes, colo, caule e folhas, em seguida fez-se assepsia do material em hipoclorito de sódio (1 %) por 3 min, seguido de lavagem com água esterilizada, e o plaqueamento das partes da planta em meio de cultura de Batata-Dextrose-Ágar (BDA), acrescido de antibiótico. O material foi incubado durante sete dias em condições ambiente do laboratório e fotoperíodo de 12 h. Foi considerado infectado o órgão que possibilitava identificar colônia e/ou estruturas do fungo sob microscópio estereoscópico no aumento de 40x.

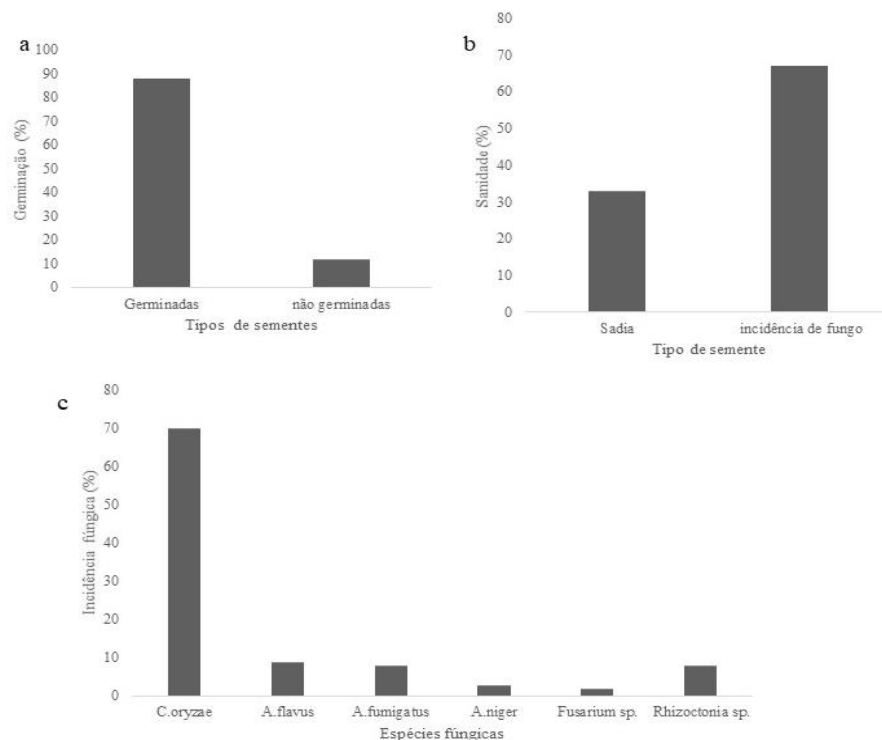
Os dados foram expressos em percentagem de controle do fungo em função da incidência na planta, quando comparado à testemunha.

3. Resultados e Discussão

3.1 Germinação e sanidade

As sementes de arroz, cultivar Bonança, obtiveram um percentual de germinação de 88 % e 32,75 % de sementes sadias (Figura 1).

Figura 1. Percentagem de germinação de sementes de arroz Bonança (a) e incidência de patógenos nas sementes infestadas naturalmente e sem tratamento no blotter test (b), além da incidência fúngica das espécies presentes (c).



Fonte: Autores (2020).

No teste de sanidade foi detectado maior incidência de *Curvularia oryzae* (70,20 %), seguida de *Aspergillus flavus* (8,87 %), *Rhizoctonia* spp. (8,25 %), *Aspergillus fumigatus* (7,76 %), *Aspergillus niger* (3,33 %), e menor ocorrência de *Fusarium* spp. (1,60 %) (Figura 1). Esses dados confirmam a potencialidade das sementes como transportadoras e transmissoras de um grande número de agentes fitopatogênicos. Em teste de sanidade com essa mesma variedade, Silva (2008) observou resultados semelhantes aos encontrados neste trabalho para a incidência de *Aspergillus* spp. e maior ocorrência de *Fusarium* spp. (29,25 %). A grande incidência de fitopatógenos em sementes de arroz também foi encontrada por Marassi et al., (2008) que observaram em trezentos e sessenta e cinco amostras representativas de diferentes variedades de arroz, oriundas de diversos municípios maranhenses, a contaminação de 100 % das amostras, sendo o gênero *Aspergillus* e teleomorfos, o mais frequente na microbiota isolada (68 %). Os mesmos autores citam que a grande incidência de fitopatógenos em sementes está relacionada às condições do clima tropical que apresenta altas temperaturas e níveis de umidade relativa do ar o que acelera a colonização dos grãos por fungos. Aliada a essa condição, há também o armazenamento inadequado dos grãos que são utilizados para o consumo humano ou para plantios da próxima safra.

Segundo Reddy (2008), um dos grandes problemas da cultura do arroz é a presença de fungos produtores em potencial de micotoxinas, como espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. Em consequência do número e das espécies de patógenos encontradas nas sementes de arroz, nesta cultura podem ser encontradas uma série de micotoxinas, como as alatoxinas, aflatoxinas, ácido fusárico, ocratoxinas, citrinina e fumonisinas (Diniz, 2002; Park et al., 2005; Hinojo et al., 2006; Nguyen et al., 2007), que podem representar um risco em potencial para o consumo dos grãos tanto para animais quanto para humanos. O fungo *Penicillium citreonigrum* produz a Citreoviridina, considerada uma micotoxina neurotóxica (Stubblefield et al., 1988), que interfere no metabolismo do tecido nervoso e muscular, competindo com a absorção de tiamina (vitamina B1) pelas células destes tecidos provocando deficiência desta vitamina, doença denominada beribéri (Brasil, 2007).

As micotoxinas apresentam, entre outras, propriedades carcinogênicas, mutagênicas e teratogênicas (Santos et al., 2001). As porcentagens de contaminação ou infecção de sementes podem ocorrer a níveis de 1 até 100 %, com ou sem consequências drásticas para a cultura (Anselme, 1985). Contudo, os riscos estão sempre presentes, pois a probabilidade de transmissão, a partir de uma baixa porcentagem, pode ser compensada pela taxa de reprodução do patógeno (Faiad et al., 1994). Outros problemas apontados por Bergamin

Filho (2005) em relação à contaminação das sementes por patógenos são perdas na colheita e aumento dos custos de produção das lavouras em razão do controle das doenças, que, por sua vez, vão contribuir para a contaminação do solo e da água, tendo em vista a necessidade de aplicação de agroquímicos para controlar as doenças surgidas.

3.2 Avaliação da incidência e controle de fitopatógenos em teste *in vitro*

Conforme os resultados obtidos, nas sementes microbiolizadas com *Bacillus* spp. houve diferença significativa na incidência de *Curvularia oryza*, *Fusarium* sp e *Rhizoctonia* sp. quando comparada com a testemunha. Em relação aos fungos *Aspergillus niger* e *Rhizopus stolonifer* não ocorreu diferença significativa na incidência entre a testemunha e os tratamentos com os *Bacillus* (Tabela 1), porém observou-se que as médias do número de colônias de *A. niger* em todos os tratamentos foram menores que na testemunha.

Os resultados indicaram que a microbiolização das sementes com os isolados de *Bacillus* spp. controlou a incidência de *C. oryzae*, com destaque para as espécies *B. pentothenicus* (B22'), *B. stearothermophilus* (B32) e *B. pumilus* (B35) com 69,00 %, 61,57 % e 61,57 % de controle, respectivamente. Os patógenos *Fusarium* sp., *Rhizoctonia* sp. e *R. stolonifer* não foram controlados pela maioria dos *Bacillus* spp. Em relação ao *A. niger*, todos os tratamentos controlaram o patógeno, mesmo não apresentando estatisticamente diferença significativa na incidência (Tabela 1 e 2). A partir desses resultados, foi possível inferir que, apenas uma parcela das bactérias do filoplano teve papel no controle de fitopatógenos em sementes de arroz. Corroborando com os resultados apresentados os autores Romeiro et al. (2000); Halfeld-Vieira et al. (2004); Macagnan (2001), demonstraram que a maioria dos *Bacillus* obtidos de filoplano não apresenta efeito contra os patógenos desafiadores e, em alguns casos podem até acentuar a severidade da doença.

Os resultados positivos de controle de fitopatógenos observados neste trabalho foram similares aos encontrados por Lazzaretti & Bettiol (1997) em que observaram redução significativa nas populações de *D. oryza*, *P. oryza* e *Rhizosporium sativum* em sementes de arroz, tratadas com um produto formulado à base de células e de metabólitos de *Bacillus subtilis*. sete dias após a semeadura.

Tabela 1. Incidência de fungos patogênicos em sementes de arroz microbiolizadas com *Bacillus* com período de 7 dias após a semeadura, observação dos efeitos do *Bacillus* sobre incidências dos fungos.

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

*T= testemunha; B6= *Bacillus* sp.; B16= *B. Macerans*; B22, B33= *B. Polymyxa*; B22'= *B.pentothenticus*; B25, B31, B35= *B. Pumilus*; B32= *B. Stearothermophilus*; B41= *B.cereus*. Valores seguidos da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% valores transformados para $\sqrt{X+0,5}$. CV = 55,23. Fonte: Autores (2020).

Destaca-se na Tabela 1 acima no controle da *C. oryza* os tratamento B22', B32 e B35 que obtiveram diferença significativa, ademais no patógeno *Rhizoctonia* sp. o tratamento com B35, foi diferente estatisticamente e outros tratamentos se diferenciarem entre eles sem o controle, sendo que o B35 teve incidência elevado, além disso, observado que o na coluna o B35 obteve resultado elevado apenas em *Rhizoctonia* sp. sendo diferente estatisticamente dos demais.

Tabela 2. Observação da percentagem do controle de patógenos em semente de arroz variedade Bonança microbiolizadas com *Bacillus*, com sete dias após o plaqueamento.

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

*T= testemunha; B6= *Bacillus* sp.; B16= *B. macerans*; B22, B33= *B. polymyxa*; B22'= *B. pentothenticus*; B25, B31, B35= *B. pumilus*; B32= *B. stearothersophilus*; B41= *B.cereus*. NC =não controlou. Fonte: Autores (2020).

No *C. oryzae* destacaram os tratamentos B22', B32 e B35 com 69,00 %, 61,57 % e 61,57 % de controle, respectivamente, e no *Fusarium* sp. os com destaque foram B6, B22 e B22', em *A. niger* do B6 a B32 e B41 tiveram resultado iguais, já no *Rhizoctonia* sp. o B32, B33 e B41 com mesmo valor foram os que obtiveram melhor destaque, e no *Rhizopus stolonifer* não contolaram e os demais tiveram resultado iguais.

3.3 Avaliação da incidência e controle de fitopatógenos em plantas de arroz

Nas plantas, provenientes de sementes tratadas com *Bacillus* aos sete dias houve diferença significativa entre a testemunha e os tratamentos na incidência de *Curvularia oryzae*, *A. niger* e *Scopulariopsis* sp., sendo a média de incidência menor nos tratamentos com os *Bacillus* quando comparado com a testemunha, com exceção dos tratamentos com os isolados B6 para *C. oryzae*, B31 para *A. niger* e *Scopulariopsis* sp. e B33 para *A. niger*. Não ocorreu diferença significativa entre a testemunha e os tratamentos na incidência de *A. flavus* e *Penicillium* sp. Os isolados que proporcionaram menor incidência de fitopatógenos

foram B31 para *C. oryzae*, B35 para *Scopulariopsis* sp., ambos da espécie *B. pumilus* e B22' (*B. pentothenticus*), B41 (*B. cereus*) para *A. niger* (Tabela 3). Nas plantas, aos 14 dias após a semeadura, a incidência de *C. oryzae*, *A. niger*, *A. flavus* e *Penicillium* não foi diferente entre a testemunha e os tratamentos com os *Bacillus*, com exceção dos tratamentos B22' e B35 para *C. oryzae*. Nesse período o fungo *Scopulariopsis* sp., apresentou diferença significativa entre os tratamentos e a testemunha, os *Bacillus* que promoveram menor incidência desses fitopatógeno foram *B. macerans* (B16) e *B. polymyxa* (B33) (Tabela 04).

O fungo *Scopulariopsis* sp. de maior ocorrência nas plantas não ocorreu nas sementes em condições de laboratório, o que leva a crer que o cultivo no solo proporcionou condições favoráveis para a manifestação desse fungo, pois de acordo com Dhingra (2005) a umidade do solo, individualmente ou em combinação com a temperatura, é um fator igualmente importante que determina a transmissão dos patógenos de sementes para a planta. A umidade do solo influencia a germinação dos esporos, que é muito importante no caso de esporos veiculados externamente.

Tabela 3. Incidência de patógenos fúngicos em plantas de arroz variedade bonança, no período de sete dias após a semeadura, em sementes microbiolizadas com *Bacillus*.

Tratamentos	Incidência (média n° Colônia)				
	<i>C. oryzae</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. flavus</i>	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Scopulariopsis</i> sp.
T	3,2 aB	1,5 abC	1,3 aC	1,1 aC	5,9 aA
B6	3,4 aBC	2,4 aCD	0,7 aE	0,9 aE	4,7 abcA
B16	2,5 abC	1,1 abD	0,7 aD	0,7 aD	4,1 bcdAB
B22	2,1 abcC	1,2 abCD	0,7 aD	0,7 aD	3,5 deB c
B22'	1,6 bcC	0,7 bC	1,5 aC	0,7 aC	3,4 cdeB
B25	2,1 abcBC	1,5 abCD	1,5 aCD	0,7 aD	3,1 deAB
B31	0,9 cC	1,9 abC	1,5 aC	0,7 aC	6,2 aA
B32	2,5 abBC	1,3 abCD	0,7 aD	0,9 aD	2,7 eB
B33	1,1 bcB	1,3 abB	1,0 aB	0,9 aB	5,5 abA
B35	2,1 abcB	0,9 bBC	1,0 aBC	0,7 aC	0,7 fC
B41	2,1 abcC	0,7 bD	0,7 Ad	0,9 aCD	4,1 cdeB
Média	2,15	1,32	0,96	0,81	3,99
Incidência (%)	23,37	14,37	10,43	8,80	43,37

*T= testemunha; B6= *Bacillus* sp.; B16= *B. macerans*; B22, B33= *B. polymyxa*; B22'= *B. pentothenticus*; B25, B31, B35= *B. pumilus*; B32= *B. stearothermophilus*; B41= *B. cereus*. Valores seguidos da mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade (< 0,01). Valores transformados para $\sqrt{x+0,5}$. CV (%) = 20,80. Fonte: Autores, (2020).

Os melhores resultados indicados na Tabela 3 da incidência de fitopatógenos nos 7 dias foram B31 para *C. oryzae*, B35 para *Scopulariopsis* sp., ambos da espécie *B. pumilus* e B22' (*B. pentothenticus*), B41 (*B. cereus*) para *A. niger*, e os demais resultados não diferenciaram estatisticamente do tratamento controle.

Tabela 4. Incidência de patógenos fúngicos em plantas de arroz ‘bonança’, aos quatorze dias após a semeadura, a partir de sementes microbiolizadas com *Bacillus*.

Tratamentos	Incidência (média n° Colônia)				
	<i>C. oryzae</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. flavus</i>	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Scopulariopsis</i> sp.
T	3,9 abCD	2,1 aDE	1,7 aE	1,8 aDE	8,0 aA
B6	3,7 abCD	1,9 aDE	0,8 aE	2,3 aDE	8,0 aA
B16	3,2 abBC	1,6 aC	1,7 aBC	1,3 aC	5,5 bA
B22	3,8 abB	1,6 aC	1,3 aC	1,3 aC	8,9 aA
B22'	2,2 bCD	1,5 aD	1,1 aD	1,6 aD	9,1 aA
B25	3,3 abB	1,4 aBC	0,7 aC	1,5 aBC	8,0 aA
B31	4,3 abBC	1,4 aD	0,7 aD	2,0 aD	7,2 abA
B32	3,5 abB	1,7 aBC	1,1 aC	1,1 aC	7,5 abA
B33	4,1 abA	1,3 aB	1,1 aB	1,4 aB	5,5 bA
B35	4,6 aB	2,6 aBC	0,9 aC	2,7 aBC	7,9 aA
B41	3,8 abB	1,4 aC	1,2 aC	1,7 aBC	7,7 abA
Média	3,67	1,68	1,12	1,70	7,65
Incidência (%)	23,20	10,62	7,08	10,75	48,36

*T= testemunha; B6= *Bacillus* sp.; B16= *B. macerans*; B22, B33= *B. polymyxa*; B22'= *B. pentothenicus*; B25, B31, B35= *B. pumilus*; B32= *B. stearothermophilus*; B41= *B. cereus*. Valores seguidos da mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade (< 0,01). Valores transformados para $\sqrt{x+0,5}$. CV (%) = 25,53. Fonte: Autores (2020).

Nas incidências fúngicas da tabela 4 acima desta no controle do *Scopulariopsis* sp. os tratamentos B16 e B33 com diferença estatística do controle.

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

Tabela 5. Observação da Percentagem do controle de patógenos fúngicos em plantas de arroz ‘bonança’, aos 7 e 14 dias após a semeadura, a partir de sementes microbiolizadas com *Bacillus*.

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

*T= testemunha; B6= *Bacillus* sp.; B16= *B. macerans*; B22, B33= *B. polymyxa*; B22'= *B. pentothenicus*; B25, B31, B35= *B. pumilus*; B32= *B. stearothermophilus*; B41= *B. cereus*.
 Fonte: Autores (2020).

Observado na Tabela 5 que houve uma mudança nos tratamentos em relação ao controle dos patógenos, sendo que nos 7 dias os com melhores desempenho foram nos *C. oryza*, *Penicillium* sp. e *Scopulariopsis*, e com 14 dias melhoram os resultados do controle dos *A. niger* e *A. flavus*.

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

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

4. Considerações Finais

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

- Em sementes de arroz variedade Bonança, tratadas e não tratadas, o patógeno de maior ocorrência é o fungo *Curvularia oryzae*, sendo a taxa menor nas sementes microbiolizadas com *Bacillus* spp.
- Nas plantas originadas de sementes microbiolizadas com as bactérias ocorre redução da incidência de *C. oryzae*, *A. niger* e *Scopulariopsis* sp.
- A microbiolização das sementes de arroz, variedade Bonança, com *B. macerans*, *B. polymyxa*, *B. pentotheticus*, *B. lentus*, *B. pumilus*, *B. stearothermophilus*, *B. cereus* e

Bacillus sp., proporciona controle de *C. oryzae* e *A. niger* em ensaios *in vitro*. Em testes *in vivo* o controle de *C. oryzae*, *Penicilium* sp. e *Scopulariopsis* nas plantas é eficaz aos sete dias após o tratamento das sementes. Para os fungos *A. niger* e *A. flavus* o tratamento é eficiente aos quatorze dias.

As espécies de *Bacillus* estudadas apresentam potencial de uso para o biocontrole de patógenos do arroz e podem ser recomendadas para a aplicação em futuras pesquisas de campo para que possam fundamentar o uso na agricultura.

Referências

Alonço, A. S., Santos, A. B., & Gomes, A. S. (2005). Cultivo do arroz irrigado no Brasil. *Embrapa Clima Temperado – Documentos (INFOTECA –E)*.

Amaral, H. M., Furlan, S. H., & Mentem, J. O. (1985). Localização de *Drechslera oryzae*, *Rhizosporium oryzae* e *Trichoconiella padwickii* em sementes de arroz *Oryza sativa* L.) [Resumos]. In: Congresso Brasileiro de Sementes (p. 4). Brasília, Brasil: Associação Brasileira de Tecnologia de Sementes.

Anselme, C. (1985). Mecanisme de la transmission des parasites par les semences et quelques aspects physiologique de la pathologie des semences. In: Curso de Patologia de Sementes, 3. Fortaleza,. 8 p. (mimeografado).

Assis S. M. P., Mariano R. L. R., Michereff S. J., & Coelho R. S. B. (1997). Survival and redistribution of *Bacillus* spp., potential biocontrol agents of black rot, on kale phylloplane. In: Wenhua T, Cook RJ, Rovira A. (Ed) *Advances in Biological control of Plant Diseases*. Beijing, China. China Agricultural University Press, 374-379.

Bergamin Filho, A. (2005). Função de dano e epidemiologia de patógenos veiculados por sementes. In: Zambolim, L. (Ed.), *Sementes: qualidade fitossanitária*, 35-52. Viçosa: UFV DFP.

Bettiol, W., & Ghini, R. (1995). Controle Biológico. In: Bergamin, A. F.; Kimati, H.; Amorim, L. *Manual de Fitopatologia. Princípios e Conceitos*. (3a ed.), São Paulo: Agronômica Ceres. 717-728.

Brasil. (1992) Ministério da Agricultura e Reforma Agrária - Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. *Regras para análise de sementes*. Brasília: Departamento Nacional de Defesa Vegetal.

Brasil. (2007) Ministério da Saúde - Secretária de Vigilância Em Saúde. *Nota Técnica*. Brasília: Ministério da Saúde.

Chung, H. S., & Lee, C.U. (1983). Detection and transmission of *Pyricularia oryzae* in germinating rice seed. *Seed Science and technology*, 11, 625-637.

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

Diniz, S. S. S. (2002). *Micotoxinas*. São Paulo: Livraria e Editora Rural Ltda.

Faiad, M. G. R., Machado, J. C., Vieira, M. G. G. C., & Cornélio, V. M. O. (1994). Efeitos e transmissibilidade de *Pyricularia oryzae* cav. em sementes de arroz (*Oryza sativa* L.) sob condições controladas. *Revista Brasileira de Sementes*, 16 (1), 45-49.

Halfeld-Vieira, B. A., Romeiro, R. S., & Mizubuti, E. S. G. (2004). Métodos de isolamento de bactérias do filoplano de tomateiro visando populações específicas e implicações como agentes de biocontrole. *Fitopatologia Brasileira*, 29 (6), 638-643.

Hinojo, M. J., Medina, A., Valle-Algarra, F. M., Gimeno-Adelantado J. V., Jiménez, M., & Mateo, R. (2006). Fumonisin production in rice cultures of *Fusarium verticillioides* under different incubation conditions using an optimized analytical method. *Food Microbiology*, 23 (2), 119–127.

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

Lazzaretti, E., & Bettiol, W. (1997). Tratamento de sementes de arroz, trigo, feijão e soja com um produto formulado à base de células e de metabólitos de *Bacillus subtilis*. *Scientia Agricola*, 54 (1-2), 89-96. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0103-90161997000100013>.

Lazzaretti, E., Menten, J. O. M., & Bettiol, W. (1994). *Bacillus subtilis* antagonísticos aos principais patógenos associados a sementes de feijão e trigo. *Fitopatologia Venezuelana*, 7, 42-46.

Ludwig, J., Moura, A. B., Santos, A. S., & Lorensi, J. (2004) Incidência de *Gerlachia oryzae* em lotes de sementes microbiolizadas com isolados de bactérias biocontroladoras [Resumo]. In VIII Simpósio Brasileiro de Patologia de Sementes (p. 184). João Pessoa: Brasil.

Macagnan, D. (2001). *Seleção de procariotas residentes de filoplano visando o biocontrole da vassoura-de-bruxa do cacaueteiro (Theobroma cacao L.) incitada por Crinipellis pernicioso (Stahel) Singer*. Programa de Pós Graduação em Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, Brasil.

Machado, J. C. (1988) *Patologia de sementes: fundamentos e aplicações*. Brasília, DF: MEC/ESAL/FAEPE.

Machado, J. C., Coutinho, W. M., Pereira, L. A. A., Magalhães, F. H. L., Pena, R. da C. M., & Vieira, M. das G. G. C. (2000). Qualidade fisiológica de sementes de arroz em função da ocorrência diferenciada de *Drechslera oryzae*. *Ciência e Agrotecnologia*, 24 (1). 124-129.

Marassi, A. C., Barbosa, T. S., Keller, L. A. M., Rodrigues, M. A. A., Kruger, D., & Rosa, C. A. R. (2008). Micobiota isolada de amostras de arroz provenientes do Estado do Maranhão destinadas ao consumo humano, em áreas de ocorrência de beribéri. *Revista Ciência Vida*. Seropédica, 28 (8), 150-152.

Nguyen, M. T., Tozlovanu, M.; Tran, T. L. & Pfohl-Leszkowicz, A. (2007). Occurrence of aflatoxin B1, citrinin and ochratoxin A in rice in five provinces of the central region of Vietnam. *Food Chemistry*, 105 (1), 42–47.

Park, J. W. T.; Sang-Youn, C., Hwang, H. -J., & Kim, Y. -B. (2005). Fungal mycoflora and mycotoxins in Korean polished rice destined for humans. *International Journal of Food Microbiology*, 103 (3), 305-314.

Pereira, A. S., Shitsuka, D. M., Parreira, F. J., & Shitsuka, R. (2018). Metodologia da pesquisa científica. Recuperado de https://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/15824/Lic_Computacao_Metodologia-Pesquisa-Cientifica.pdf?sequence=1

Pereira, J. A. (2002). *Cultura do arroz no Brasil: subsídios para a sua história*. Teresina, PI: Embrapa Meio – Norte.

Reddy, K. R. N., Reddy, C. S., & Muralidharan, K. (2008). Potential of botanicals and biocontrol agents on growth and aflatoxin production by *Aspergillus flavus* rice grains. *Food Control*, 20 (2), 173-178. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.03.009>.

Rollemberg, C. L. (2008). *Mancha das folhas da macieira: caracterização fisiológica dos agentes causais, controle biológico com bactérias residentes de filoplano e sensibilidade dos antagonistas a fungicidas e inseticidas*. Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, Brasil.

Romeiro, R. S., Neves, D. M. S., Carvalho, M. G., & Carrer Filho. (2000). R. Seleção de bactérias residentes de filoplano de tomateiro como agentes de biocontrole de enfermidades da parte aérea da cultura. *Summa Phytopathologica*, 26, 220-224.

Santos, C. C. M., Lopes, M. R. V., & Kosseki, S. Y. (2001). Ocorrência de aflatoxinas em amendoim e produtos de amendoim comercializados na região de São José de Rio Preto/SP. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 60 (2), 153-157.

Shah, D. A., Bergstrom, G. C., & Fernandes, J. M. C. (2000). Epidemiologia e manejo de patógenos transmitidos por sementes, com ênfase nos fungos que formam picnídios. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, 8, 339-364. 2000.

Silva, L. L. S. (2008). *Quantificação da transmissão de fungos associados às sementes de arroz*. Monografia do Curso de Agronomia, Universidade Estadual do Maranhão. São Luís, Brasil.

Stubblefield, R. D., Greer, J. I., & Shotwell, O. L. (1988). Liquid chromatographic method for determination of citreoviridin in corn and rice. *J. AOAC*, 71 (4), 721-724.

Porcentagem de contribuição de cada autor no manuscrito

Ivaneide de Oliveira Nascimento – 25%

Antônia Alice Costa Rodrigues – 20 %

Kele Sousa Pires Andrade – 10 %

Wanderson Lima Cunha – 10 %

Flávio Henrique Reis Moraes – 15 %

Flávia Arruda de Sousa – 20 %