

Eficiência de rizobactérias *Bacillus* spp. no controle in vitro de *Macrophomina phaseolina* agente etiológico da podridão de tronco da mamona (*Ricinus communis* L)

Efficiency of rhizobacteria *Bacillus* spp. in the control of *Macrophomina phaseolina* in vitro agent of stem rot of castor bean (*Ricinus communis* L)

MARRONI, Igor Villela ¹; GERMANI, José Carlos ²

1 Aluno de doutorado do Programa de Pós-Graduação de Microbiologia Agrícola e do Ambiente/PPGMAA - UFRGS, Porto Alegre/RS, Brasil, igorvm11@yahoo.com.br; 2 Professor Doutor do PPGMAA - UFRGS, Porto Alegre/RS, Brasil, germani@ufrgs.br.

RESUMO: O presente trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência no controle do fungo *Macrophomina phaseolina*, através de isolados de bactérias do gênero *Bacillus*, isoladas da rizosfera e do rizoplane de mamonas selvagens e da cultivar (não identificada). Os isolados foram avaliadas em pareamento com o patógeno *Macrophomina phaseolinae*: seu efeito por antibiose, produção de metabólitos voláteis e inibição de bactérias de mesmo gênero. Os isolados selvagens mostraram-se mais eficientes para o controle da *Macrophomina phaseolina*. A cepa RZ 1, isolada de mamoneira selvagem inibiu o desenvolvimento do fungo em 9%, por meio do pareamento. A cepa RZ 2, também isolado selvagem, conseguiu inibir o crescimento do fungo em 24%, por meio de seus metabólitos não voláteis, bactérias isoladas da cultivar mostraram 23% e 21% de inibição com os isolados RZE 4 e RP 2, respectivamente. A produção de metabólitos voláteis mostrou-se eficiente com o isolado RP 5, sendo fungistático, os microrganismos RPE 4, RZE 4 e RPE 5 pela redução na produção de conídios. Apenas as cepas RP1, a RZ 2 e a RPE 9 mostraram inibir isolados do mesmo gênero, o presente trabalho mostra que bactérias selvagens são melhores antagonista que as obtidas de cultivar.

PALAVRAS-CHAVE: Pareamento, antibiose e metabólitos voláteis.

ABSTRACT: This study aimed to evaluate the efficiency in controlling the fungus *Macrophomina phaseolina* by *Bacillus* strains isolated from the rhizosphere and rhizoplane of wild and cultivate castor bean. The strains were evaluated in pairing with the pathogen *Macrophomina phaseolina* isolated in Pelotas (RS), and also antibiosis, and inhibition of bacteria of the same gender. Wild strains were more effective for control of the pathogen in paired isolates from wild castor bean inhibited fungal growth more efficiently and RZ 1 a strain that could further inhibit the fungus, decreasing by 9% its development, other strains of proved niche with similar efficiency. The strain RZ 2, another isolate wild, managed through its metabolites inhibit the growth of the fungus in 24%, in this test strains isolated from cultivar had satisfactory results by inhibiting the fungus in 23 and 21% of the strains RZE 4 RP2 respectively. The isolates obtained good results for the production of volatile metabolites and strains RP 5 was fungistatic and strains as RPE 4, and RZE 4, RZE 5 reduced the number of conidia. Few bacteria were able to inhibit the indicator microorganism of the same gender, like RP1, RZ 2 and RPE 9. As the results show bacteria of the genus *Bacillus* are effective in controlling this pathogen mainly when isoled fron wild environment.

KEY WORDS: Pairing, antibiosis, volatile metabolites.

Correspondências para: igorvm11@yahoo.com.br

Aceito para publicação em 25/05/2011

Introdução

O fungo *Macrophomina phaseolina* é responsável por doenças em mais de 500 culturas diferentes (VIANA et al., 2002), conhecida como podridão de tronco e raízes. Seu controle é feito através de medidas de exclusão e erradicação, destacando-se a utilização de sementes sadias, provenientes de campos de produção ainda isentos, e plantio em áreas livres do patógeno (SILVA 2005). Trabalhos realizados por Lima et al. (1997) comprovaram a eficiência do uso de benomyl e do herbicida alachlor no controle da doença. Entretanto, este procedimento não tem sido muito utilizado, em razão das consequências negativas que acarreta à microbiota local e por ser um método de controle com pouca praticidade.

Restrições ao uso de fungicidas e preocupações com a preservação do meio ambiente mostram, claramente, que é preciso encontrar formas alternativas de controle. A microbiolização de sementes vem sendo enfatizada, por vários pesquisadores, como bioprotetores em diferentes culturas (LUZ, 2001) (CORRÊA et al. 2008).

Bacillus formam estruturas de resistência chamada endósporos (Freitas et al., 1997) podendo permanecendo por anos mesmo em ambientes adversos. Além disso, constituem-se em uma das rizobactérias mais abundantes no solo. Sendo eles, portanto, bons antagonistas contra vários patógenos (Santos et al., 2006); Santos et al. (2006), foi mostrado que a produção de antibiose é o principal mecanismo de ação do antagonismo de bactérias do gênero *Bacillus* (SANTOS et al. 2006).

Este trabalho objetivou identificar locais de maior ocorrência de biocontroladores do fungo *Macrophomina phaseolina*, e sua eficácia no controle do patógeno, bem como os mecanismos envolvidos.

Este trabalho desenvolveu-se nas dependências do Laboratório de Tecnologia Bioquímica, da Faculdade de Farmácia da

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, localizado em Porto Alegre, RS. O trabalho consistiu nos seguintes ensaios: a) Isolamento das cepas; b) Pareamento em placas; c) Antibiose: metabólitos não voláteis; d) Antibiose: avaliação de metabólitos voláteis; e) Avaliação da produção de metabólitos nocivos a bactérias do mesmo gênero.

Metodologia

a) Isolamento das cepas

Para o isolamento de *Bacillus*, foram coletadas, em um campo, 10 gramas de solo rizosférico (solo aderente a raiz) e 10 gramas de raízes de plantas de mamona selvagem. Coletou-se, também, 10 gramas de substrato, onde se desenvolveu uma planta de mamona (cultivar não identificada), cedida pelo programa de pós-graduação em Ecologia (UFRGS), assim como 10 gramas de raiz dessa mesma planta. Misturou-se, então, 10 gramas de cada solo (rizosférico da mamona selvagem) a 90 mL de água esterilizada de torneira, colocando-os em um agitador por 30 min. O mesmo procedimento foi feito com o substrato que estava ao entorno da raiz da planta de mamona domesticada. Procedeu-se, então, diluição seriada dessas soluções. A mesma metodologia foi adotada para isolar microrganismos do rizoplano, porém se utilizou raízes das respectivas plantas, em vez de solo. Feitas as diluições, os tubos foram colocados em banho Maria, a 80° por 10 min, seguindo método proposto por Melo (1999) para isolamento de *Bacillus*. A seguir, foram plaqueadas, 5 vezes, as maiores diluições -6; -5; -4. Passados 3 dias, isolou-se as bactérias que apresentavam características morfológicas diferentes entre si. Também se fez uso de discos de micélio de *Macrophomina phaseolina* (retirados de lesões da mamona e cultivados em meio BDA, gentilmente

fornecidos pelo Departamento de Pós-Graduação em Fitossanidade, da Universidade Federal de Pelotas, localizado em Pelotas, RS), nas placas onde cresceu UFCs. Após 7 dias, surgiram halos produzidos por algumas bactérias. Se a bactéria que produziu o halo não tivesse sido isolada em razão de sua semelhança à outra, agora ela seria isolada.

As cepas isoladas da rizosfera da mamona foram identificadas no presente artigo pelas letras RZ e os isolados do rizoplano foram identificados por RP. Se junto a essas letras constasse a letra E, esse isolado teria sido obtido da planta fornecida pelo programa de Pós-Graduação em Ecologia da UFRGS e seria um isolado com origem em uma cultivar (não identificada). Não havendo a terceira letra, é porque se trata do isolado de uma mamona selvagem.

b) Pareamento em placas

Em placas de Petri, contendo, aproximadamente, 10mL do meio 523, (Kado & Heskett), as bactérias que produziram halos e que, morfológicamente, assemelhavam-se a bactérias do gênero *Bacillus*, foram purificadas para, posteriormente, serem isoladas em tubos de ensaio, contendo 10 mL de 523. Após o isolamento, fez-se um *screening* dos isolados, através do método de pareamento em placas, desafiando-se, cada um deles, contra o patógeno (isolado em campos de Pelotas, RS) (UENO & SILVA, 2007). Os isolados, que visualmente produziram os maiores halos, foram separados para o teste de pareamento com repetição, medindo-se os halos produzidos em mm e os resultados obtidos em relação à porcentagem do fungo que foi inibida, em comparação com um fungo que não possuía antagonistas em sua placa.

Para o teste com repetição, discos de micélio com meio foram transferidos para o meio 523. Como algumas bactérias cresciam rapidamente,

optou-se por transferi-las, após 2 dias de crescimento micelial do fungo de 3 dias. Findo o tempo necessário para que o fungo começasse a se desenvolver, os antagonistas foram dispostos em pontos equidistantes e a 1 cm da borda da placa de Petri - 5 em uma placa, 5 em outra, mais 5 numa terceira e 4 em outra, totalizando 19 rizobactérias. Houve 4 repetições para avaliar o pareamento em placas. A variância foi analisado por anova e as médias comparadas pelo teste de agrupamento Scott- Knott 5% analisado pelo programa Assistat

c) Antibiose: metabólitos não voláteis

A avaliação dos isolados deu-se em relação a sua antibiose, por meio de sua produção de metabólitos não voláteis. Para isso, os isolados foram inoculados em meio 523, líquido, pelo tempo de três dias.

Foram, também, vertidos, aproximadamente, 10 mL de meio 523 em placas de petri e, após a solidificação, retiraram-se discos do meio, tendo o auxílio de um furador com 5 mm de diâmetro.

Para descartar a biomassa, fez-se uso de filtro Millipore Sartorius Stedium® Minisart, com 0,20 µm. Então, uma alíquota de 250 µL de cada metabólito separado foi posta em cada poço. Após, discos de micélio do fungo, com crescimento de 7 dias e, aproximadamente 5 mm, foram dispostos no centro da placa. O experimento foi arranjado tal como o de pareamento. A testemunha consistiu da aplicação de 250 µL de água destilada em um dos poços. A eficiência da inibição foi feita através da porcentagem do fungo, que ficou inibida por meio da ação do antibiótico, quando comparada com a testemunha que consistia em placas sem líquidos metabólitos. O experimento constituiu-se de 4 repetições. A variância foi analisado por anova e as médias comparadas pelo teste de agrupamento Scott-Knott 5% analisado pelo programa Assistat.

d) Antibiose: avaliação de metabólitos voláteis

Utilizou-se metodologia semelhante à apresentada por Bharath et al. (1980). Para isso, discos de micélio do patógeno foram tirados e colocados em placas de Petri com, aproximadamente, 10 mL do meio BDA para crescimento de 3 dias, fazendo com que o micélio do fungo aderisse ao seu substrato. Paralelamente, inoculou-se o antagonista através de riscas em placas, contendo o meio 523.

Aderido o patógeno no substrato, as tampas, tanto dos antagonistas quanto do patógeno foram retiradas, e as placas do antagonista e do fungo foram opostas e vedadas com plásticos de Polietileno, para evitar a perda dos metabólitos voláteis, deixando, assim, o fungo diretamente em contato com eles.

Nesse experimento, foram utilizadas 3 repetições. O controle negativo consistiu em colocar uma placa com crescimento fúngico junto a uma placa com meio de cultura que não tinha presença do antagonista.

Após 14 dias as placas foram retiradas. Procedeu-se, então, a avaliação da eficiência do controle através da contagem de conídios, que o fungo apresentava. Tendo o auxílio da câmara de Neubauer. A variância foi analisada por anova e as médias comparadas pelo teste de agrupamento Scott- Knott 5% analisado pelo programa Assistat.

e) Avaliação da produção de metabólitos nocivos a bactérias do mesmo gênero

A avaliação do uso de possíveis bacteriocinas por parte dos isolados teve início, deixando os antagonistas crescerem em caldo 523 por 3 dias. Após esse período, uma alíquota 3 mL foi retirada e centrifugada a 10000 rpm por 30 min. Isso feito, as alíquotas foram filtradas em filtros Millipore Sartorius Stedium® Minisart, com 0,20 µm, para, então, uma quantidade de 250 µL ser distribuída em cada placa, totalizando 3 repetições por

isolado. A testemunha não teve quantidade alguma de metabólito, ao contrário, 250 µL de água destilada foi distribuída. Após, uma cepa de *Bacillus* foi inoculada por estrias, no meio já solidificado.

Passados os três dias de incubação, em temperatura de 28° C, a eficiência dos metabólitos das bactérias foi medida, para verificar se a cepa de controle crescia ou não no meio, ou seja, havendo crescimento (+) em duas repetições e não (-) em outra, aquela bactéria seria positiva para a produção desses metabólitos.

Resultados e discussão

Bactérias do gênero *Bacillus* isolados de plantas selvagens são melhores antagonistas que isolados de plantas cultivadas. O estudo vai de acordo com pesquisas desse microrganismo (SILVA et al., 2004; BERNARDES et al., 2010). Em avaliação por culturas pareadas, os isolados que conseguiram melhor redução do crescimento do fungo foram todos de mamonas selvagens. Amorim et al. (2004) também conseguiram antagonizar, eficientemente, um parasito de solo *Phytophthora parasítica* com rizobactérias. No teste de metabólitos não voláteis, apesar de isolados de plantas domésticas terem inibido o desenvolvimento do *Macrophomina phaseolina*, os isolados que conseguiram melhor desempenho foram da mamona selvagem, indo de encontro com resultados obtidos por Freitas et al. (2004) em que rizobactérias do gênero *Pseudomonas* e *Bacillus* promoveram o crescimento de plantas cítricas, sendo *Bacillus subtilis* eficiente, no controle de fitobactérias (CUNHA, et al. 2006). Para o teste de metabólitos voláteis, ainda que os isolados da mamona domesticada tenham sido superiores aos demais, o único que conseguiu ser fungistático foi o isolado da mamona selvagem. Além do mais, alguns isolados produzem metabólitos que inibem o crescimento de bactérias que compartilham o mesmo parentesco, dando a

Eficiência de rizobactérias

elas características fundamentais para disputarem espaço em seus nichos.

Como mostrado na Tabela 1, poucas bactérias produziram metabólitos inibidores do crescimento de microrganismos do mesmo gênero. Somente os isolados RP 1, RZ 2 e RPE 9. Esses valores confirmam os resultados de Bromberg (2004), em que, apenas, 15,7% das cepas apresentaram produção de bacteriocinas. O trabalho elaborado por Bonini et al. (2007) mostrou resultado contrário,

em que os Isolados de *Xanthomonas axonopodis* Pv. *Passiflorae* foram inibidos por metabólitos produzidos pelas bactérias usadas no artigo. A inibição, no presente trabalho, ocorreu, porque bactérias do gênero *Bacillus* são reconhecidas por produzir metabólitos muito agressivos, como relatado por Praça et al. (2004), em que metabólitos de cepas de *Bacillus thuringiensis* foram usadas para inibição de insetos como *Spodoptera frugiperda*. Por outro lado, o baixo

Tabela 1: a) Porcentagem de inibição do crescimento por meio do pareamento do fungo contra diferentes isolados de *Bacillus* e b) produção de metabólitos que inibem o crescimento de microrganismos que compartilham parentesco, (1;2;3) nº de repetições; (+) Metabólitos produzidos inibem o crescimento da bactéria indicadora, (-) cepa indicadora não é afetada pelos metabólitos ou por água destilada no caso da testemunha. se inibiu em duas, repetições considerou-se positiva para essa característica. Tratamentos seguidos pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

Isolados ³	Pareamento		Crescimento da cepa indicadora		
	Média (mm)		1	2	3
RZ 1	9 ^a	a	- ^b	-	-
RP 5	7,5	a	-	-	-
RZE 9	6,5	a	+	-	-
RZ 3	4,3	b	-	-	-
RZE 3	4	b	-	-	-
RZ 2	3	b	+	+	+
RP 1	2,8	c	+	+	-
RP 4	2,25	c	-	-	-
RP 3	1,6	c	-	-	-
RPE 13	1,5	c	-	-	-
RPE 5	1,5	c	-	-	-
RPE 10	1,5	c	-	-	-
RPE 9	0,5	c	-	+	+
RPE 3	0,5	c	-	-	-
RPE 12	0,25	c	-	-	-
RPE 4	0	c	-	-	-
RPE 7	0	c	-	-	-
RZE 4	0	c	-	-	-
RZE 5	0	c	-	-	-

* Porto Alegre, 2011. Laboratório de tecnologia bioquímica, UFRGS.

³RZ Bactéria isolada na rizosfera da planta, RP Isolado no rizoplane da planta. E isolado de planta doméstica. Isolado de planta selvagem.

número de inibidores de microrganismos do mesmo gênero originou resultado negativo, pois cepas que produzem esses metabólitos são capazes de inibir o crescimento de bactérias do mesmo gênero, que, geralmente, dividem o mesmo nicho e, por isso, são importantes para que o microrganismo possa se estabelecer, como já visto em estudos (TOGASHY et al. 1996; NAPOLEÃO et al., 1998), por outro lado, a baixa eficiência dos metabólitos para combater o crescimento da cepa indicadora, deveu-se, principalmente, ao tipo de bactérias produtoras de Endósporos (FREITAS et al., 1997). Trata-se de estruturas de resistência, que dificultam lidar com essas bactérias.

A Tabela 1 mostra, também, para o teste de pareamento, 3 grupos, estatisticamente distintos.

Cepas que não impediram crescimento do fungo, como os isolados RPE 7, RPE 4 e RZE 4, bem como cepas que criaram grandes halos de inibição, caso da cepa RZ 1, que inibiu o crescimento do fungo em 9 %, mas que não diferiu, estatisticamente, das cepas RP 5 e RZE 9. Os maiores resultados para a produção de halos foi equivalente ao encontrado por MARRONI et al. (2007), quando nenhum dos 27 isolados conseguiu produzir halo de 9 mm, em cepa isolada da rizosfera de uma mamoneira selvagem (RZ1).

Os metabólitos não voláteis, produzidos pelos antagonistas, apresentaram eficiência no controle do fitopatógeno, como demonstra a Tabela 2. De 19 isolados, 6 bactérias conseguiram inibir o crescimento do fungo em mais de 15%. O

Tabela 2: Porcentagem de inibição do crescimento do fungo através de diferentes antagonistas, por meio de antibiose. Tratamentos seguidos pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade

Isolados ⁴	Médias (mm)	
RZ 2	24	a
RZE 4	23	a
RP 2	21	a
RPE 4	20	a
RPE 5	17	a
RPE 6	17	a
RPE 10	11	b
RP 3	11	b
RP 4	10	b
RZ 1	3	c
RP 5	2	c
RZ 3	0	c
RPE 12	0	c
RPE 9	0	c
RZ 4	0	c
RP 1	0	c
RPE 13	0	c
RPE 3	0	c
RZE 9	0	c
TESTEMUNHA	0	c

* Porto Alegre, 2011. Laboratório de tecnologia bioquímica, UFRGS

⁴RZ Bactéria isolada na rizosfera da planta, RP Isolado no rizoplano da planta. E isolado de planta doméstica. Isolado de planta selvagem.

Eficiência de rizobactérias

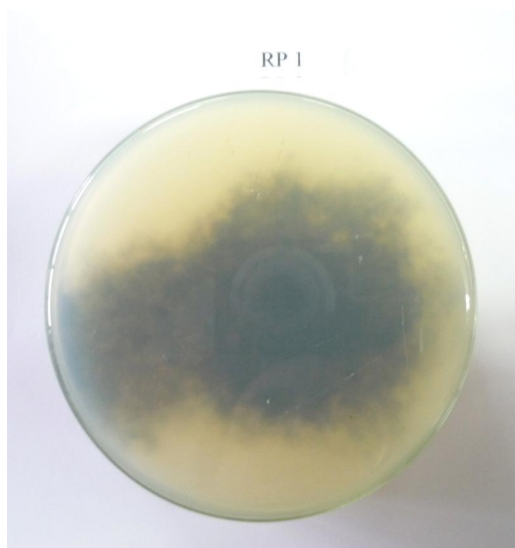


Figura 1: Demonstração do crescimento assimétrico do fitopatógeno (*Macrophomina phaseolina*) quando em contato com metabólitos voláteis do isolado RP

presente trabalho confirmou Remuska et al. (2007), em que amostras de *Bacillus thuringiensis* foram eficientes para o controle de importantes patógenos, como *Sclerotium rolfsii* e *Rhizoctonia solani*. Cinco isolados não produziram halo contra o fungo, conforme verifica-se na Tabela 2.

Como já demonstrado em trabalhos anteriores, (Martins-Corder, 1998) metabólitos voláteis têm grande importância para o biocontrolador, pois esse tipo de metabólito se propaga melhor no solo do que os metabólitos não voláteis, desempenhando um papel fundamental para o controle do patógeno. No presente trabalho, isolou-se cepas que desenvolvem muito essa característica. Caso da cepa RP 5, em que foi fungistático para a *Macrophomina* (Tabela 3).

Um expressivo número de cepas de *Bacillus*, através de seus metabólitos voláteis, conseguiu

Tabela 3: Avaliação da influência dos metabólitos voláteis, produzidos por cepas do gênero *Bacillus*, no número de conídios de *Macrophomina phaseolina*. Tratamentos seguidos pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade

Isolados ⁵	Número de conídios	
RP 5	0 *	a
RPE 5	1,7x10 ⁴	a
RPE 12	1,3x10 ⁴	a
RPE 7	2x10 ⁴	a
RZE 4	3,3x10 ⁴	a
RZE 9	3,3x10 ⁴	a
RP 4	1,4x10 ⁵	a
RZE 3	1,7x10 ⁵	a
RZ 3	1,8x10 ⁵	a
RZ 2	1,8x10 ⁵	a
RPE 4	2,3x10 ⁵	a
RPE 3	2,3x10 ⁵	a
RPE 10	1x10 ⁶	a
RPE 9	1,4x10 ⁶	a
RZE 5	2,1x10 ⁶	a
RZ 1	2,3x10 ⁶	a
RP 3	3,1x10 ⁶	a

⁵RZ bactéria isolada na rizosfera da planta, RP Isolado no rizoplane da planta. E isolado de planta doméstica. () Isolado de planta selvagem.

que o fungo reduzisse a produção de conídios, como demonstra a Tabela nº3.

E, como se pôde observar na figura 1, um crescimento bastante alterado, pois o crescimento de um fungo sempre é radial e o fungo tem um crescimento assimétrico quando colocado com o biocontrolador RP1, deixando claro o efeito que esse tipo de metabólito causa no *Macrophomina phaseolina*. Portanto, pareceu-nos que, neste trabalho, pôde ser demonstrado que esses isolados, em geral, são produtores desse importante tipo metabólito sendo que os mesmos produziram tanto quanto *Bacillus subtilis* conhecida espécie com grande capacidade antagônica estudado por Leelasuphakul et al. (2008), muito pouco considerado nos atuais experimentos.

Conclusão

Bactérias do gênero *Bacillus* mostraram-se um eficiente controlador, in vitro, do fitopatógeno *Macrophomina phaseolina*. Cepas isoladas de mamonas selvagens evidenciaram ser mais agressivas do que as domesticadas.

Referências Bibliográficas

- AMORIM, E.P.R.; MELO, I S. Ação antagônica de rizobactérias contra *Phytophthora parasitica* e *p. Citrophthora* e seu efeito no desenvolvimento de plântulas de citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**. vol.24 n.2. Jaboticabal. Ago., 2002.
- BHARAT, R.; SINGH, V.N.; SINGH, D.B. *Trichoderma viride* as a mycoparasite of *Aspergillus* spp.. **Plant and Soil**, v.57, p.131-135, 1980.
- BERNARDES, F.S; PATRÍCIO F.R.A; SANTOS A S; FREITAS, S., S . Indução de resistência sistêmica por rizobactérias em cultivos hidropônicos. **Summa phytopathologica**. vol.36. n.2. Botucatu, abril./junho, 2010.
- BONINII, M; MARINGONII, A.C; NETO, J.R. Caracterização de isolados de *Xanthomonas* spp. por bacterocinas. **Summa phytopathologica**. vol.33. n.1. Botucatu, jan./mar., 2007.
- BROMBERG R; MORENO I; ZAGANINI C L; DELBONI, R R; OLIVEIRA J. Isolation of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from meat and meat products and its spectrum of inhibitory activity. **Brazilian Journal of Microbiologia**. vol.35. no.1-2. São Paulo, jan./junho, 2004.
- CORRÊA B O ; MOURA A B; DENARDIN N D'Á, SOARES V N; SCHÄFER J T; LUDWIG J. Influência da microbiolização de sementes de feijão sobre a transmissão de *colletotrichum lindemuthianum* (saac e magn.). **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 30, nº 2, p.156-163, 2008
- CUNHA J DE F, PICOLI E A DE T, ALFENAS A C E GONÇALVES R C . Efeito (in vitro) de antibióticos e rizobactérias no controle de bactérias fitopatogênicas ao *Eucalyptus* spp. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v.30, n.6, p.871-876, 2006.
- FREITAS, J.R.; BANERJEE, M.R.; GERMIDA, J.J. Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus* L.). **Biology and Fertility of Soils**, New York, 24:358-364, 1997.
- FREITAS S. S. & AGUILAR VILDOSO C. I. Rizobactérias e promoção do crescimento de plantas cítricas. **Revista Brasileira de Ciências**. Solo, 28:987-994, 2004
- LAZZARETTI E. & BETTIOL, W. 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: 89-96, 1997.
- LEELASUPHAKULAW, HEMMANEE P, CHUENCHITT . Growth inhibitory properties of *Bacillus subtilis* strains and their metabolites against the green mold pathogen (*Penicillium digitatum* Sacc.) of citrus fruit . **Postharvest Biology and Technology** Volume 48, Issue 1, April 2008, Pages 113-121
- LIMA et al. Efeito dealachlor e do benomyl do crescimento micelial e na germinação de esclerocios de *Macrophomina Phaseolina* (Tass.) Goid., in vitro. **Revista de Oleaginosas e Fibrosas**, Campina Grande, 1:73-79, 1997.
- LUZ, W.C. Efeito de bioprotetores em patógenos de sementes e na emergência e rendimento de grãos de milho. **Fitopatologia Brasileira** 26:16-20, 2001.
- MARRONI, I. V.; UENO. B.; MOURA, A, B. Avaliação de nichos para isolamento de *Bacillus* antagonistas à *Macrophomina phaseolina* - agente da podridão de tronco e raízes da mamoneira. 2007, Pelotas. **Anais da primeira**

- reunião técnica anual de agroenergia-RS. CD-ROM.
- MARTINS-CORDER, M.P.; MELO, I.S. Antagonismo in vitro de *Trichoderma* spp. a *Verticillium dahliae*. **Sci. agric.** vol. 55. n. 1. Piracicaba, jan./abril, 1998.
- MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. **Controle Biológico**. vol.3. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 1999. 308p.
- NAPOLEÃO, R.L., ROMEIRO, R.S., BERIAM, L.O.S.; BARBOSA, J.G. A bioassay for rapid screening of bacteria antagonistic to *Agrobacterium tumefaciens*. **Fitopatologia Brasileira**, 23: 27-29, 1998.
- PRAÇA, L.B.; BATISTA A.C.; MARTINS, E.S.; SIQUEIRA, C.B; DIAS, D.G de S; GOMES, A.C.M.M., FALCÃO, R; MONNERAT, R. Estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Díptera. **Pesquisa agropecuária. brasileira.**, Brasília, v.39, n.1, p.11-16, jan. 2004
- REMUSKA, A C; PRIA, M., DALLA. Efeito de *Bacillus thuringiensis* e *Trichoderma* sp. No crescimento de fungos fitopatogênicos. **Publicações. UEPG Ciências. Exatas Terra**, Ci. Agr. Eng., Ponta Grossa, 13 (3): 31-36, dez. 2007 .
- SANTOS et al. Controle biológico da mancha aquosa do melão por compostos bioativos produzidos por *Bacillus* spp. **Summa Phytopathologica** 32: 376-378, 2006.
- SILVA, S.D.A. (Org.). **A Cultura da Mamona na Região de Clima Temperado**: informações preliminares. Documentos 149. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2005. Disponível em:
http://www.cpact.embrapa.br/publicacoes/download/documentos/documento_149.pdf. Acesso em: 10 nov. 2006
- SILVA, H.S.A. Isolamento e seleção massal de rizobactérias indutoras de resistência sistêmica à mancha bacteriana pequena do tomateiro. **Revista Ceres**. São Paulo. Vol. LI, N° 295, 2004
- TOGASHI, J.; SUZUKI, T.; NAMAI, T. An attempt to control of the soft rot of Chinese cabbages with avirulent strain of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. **Journal of the Yamagata Agriculture and Forestry Society**, 25-30, 1996.
- UENO, B; SILVA, S. D. A. Primeiro relato de podridão do colmo causado por *Macrophomina phaseolina* em mamoneira (*Ricinus communis*) no Rio Grande do Sul. 2008, Maringá. **Anais do XLI congresso de fitopatologia-PR**. IMPRESSO.
- VIANA F M. P. & DE SOUZA N L. Efeito da interação temperatura-tensão de água sobre a germinação de microescleródios de *Macrophomina phaseolina*. **Fitopatologia brasileira**. vol.27 no.3 Brasília May/June 2002