

SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS ANTAGÔNICOS À *PYRICULARIA ORYZAE* PARA O CONTROLE DA BRUSONE DO ARROZ*

W. BETTIOL¹ e H. KIMATI²

¹ EMBRAPA/Centro Nacional de Pesquisa de Defesa da Agricultura, Caixa Postal 69, 13820 – Jaguariúna, SP, Brasil. Bolsista do CNPq.

² ESALQ/USP, Departamento de Fitopatologia, Caixa Postal 09, 13400 – Piracicaba, SP, Brasil.

* Parte da tese de doutoramento do primeiro autor. Financiado pela FINEP e FAPESP.

Aceito para publicação em: 16/06/1989.

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 alta frequência de antagonistas a *Pyricularia oryzae* 348 de um total de 472 isolados. A maior frequência foi obtida de folhas, seguida de raízes, sementes e solos. Em todas as localidades amostradas foram isolados antagonistas.

Utilizando a técnica de cultura dupla (antagonistas 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, assim denominados: AP-3, AP-12, AP-42, AP-48, AP-49, AP-51, AP-85, AP-91, AP-94, AP-105, AP-114, AP-115, 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 esterilizado mantendo a viabilidade e a capacidade antagonística por, pelo menos, 6 meses, 2 anos e um ano, respectivamente.

Para estabelecer a posição sistemática dos 27 isolados selecionados, foram determinados 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 à ordem Eubacteriales, família Bacillaceae, gênero *Bacillus* e espécie *Bacillus subtilis*.

ABSTRACT

SELECTION OF ANTAGONISTIC MICROORGANISMS TO *PYRICULARIA ORYZAE* FOR CONTROLLING RICE BLAST

A survey of microorganisms, most from soil and various parts of the rice plant, was carried out to test for antagonism against *Pyricularia oryzae*. The technique used was isolation and an *in vitro* qualitative test using potato-dextrose-agar as substrate. A high was shown. 348 out of 472 frequency of antagonists tested. The majority was obtained from leaves, but roots, seeds and soils also yielded antagonists. All localities surveyed showed occurrence of antagonists.

Twenty-seven isolates of bacteria 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: a) by successive sub-culturing, b) in distilled water (Castellani technique) and c) in sterilized soil, where they remained viable for at least six months, 2 and 1 years, respectively.

All antagonistic isolates belong to the species Bacillus subtilis, as determined by cellular morphology, cell dimensions, cultural characteristics, growth at different temperatures, reaction to stain methods plus selective media and biochemical tests.

INTRODUÇÃO

Todos os métodos de seleção de antagonistas são baseados em evidências de que estes afetam de algum modo o desenvolvimento do patógeno ou da doença. Interferência implica em algumas formas de destruição ou inibição e pode ser avaliada *in vitro* ou *in vivo* (ANDREWS, 1985).

In vitro são utilizados principalmente métodos em placa de Petri com meio agarizado, lâminas com ágar ou com gotas de diferentes suspensões de microrganismos e exames microscópicos de cortes de folhas (ANDREWS et al., 1983; ANDREWS, 1985).

Testes para antagonismo na superfície foliar de plantas crescendo sob condições controladas são chaves para selecionar potenciais agentes de controle biológico (ANDREWS, 1985). Microrganismos, que falham em inibir patógenos *in vitro*, podem ser detectados por este método (FOKKEMA, 1976), sendo particularmente importante para selecionar leveduras (LUZ, 1985; FOKKEMA & VAN DER MEULEN, 1976).

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.

Uma seqüência lógica com relação à seleção de antagonistas para controle biológico deve seguir vários estádios, e em teoria, é de *in vitro* para *in vivo*. 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 nas condições em que os antagonistas serão utilizados.

Esta seqüência foi utilizada com sucesso por BASTOS (1978), BASTOS (1979), BASTOS et al. (1981), BASTOS (1984) e BASTOS et al. (1986) culminado na seleção de *Cladobotryum amazonense*, hiperparasita do agente causal da Vassoura de Bruxa do cacauzeiro, *Crinipellis perniciosa*.

STESSEL et al. (1953) sugerem os seguintes passos para seleção de microrganismos antagonistas, se a principal meta for encontrar produtores de antibióticos: 1. seleção de microrganismos antagonísticos, 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.

Para Brusone do arroz, o primeiro relato de controle biológico de *Pyricularia oryzae*, é de Ioshii (1949), 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. kasugaiensis* produtores, respectivamente, de blasticidina S (primeiro antibiótico usado exclusivamente para fins agrícolas) e kasugamicina (FUKUNAGA, 1965; UMEZAWA et al., 1965 e Okamoto, 1972, citado por OU, 1985) produtos esses utilizados até hoje. Mais recentemente, SY et al. (1978a, b); LINDBERG (1981); SY et al. (1983a, b); SY et al. (1984) e RIBEIRO (1987), entre outros, encontraram microrganismos antagonistas de *P. oryzae*.

Considerando que a seleção de microrganismos antagonísticos sustenta virtualmente todo o programa de controle biológico, o presente trabalho teve por objetivo: realizar levantamento de microrganismos antagonísticos a *P. oryzae*; selecionar e identificar a nível de espécie os antagonistas mais eficientes em inibir *P. oryzae in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Coleta de material para isolamento de antagonistas

As coletas de plantas de arroz foram realizadas nos municípios de Boa Esperança do Sul/SP, Jaboticabal/SP, Matão/SP, Rio Claro/SP, Piracicaba/SP, Campinas/SP, Goiânia/GO e Ribeirão Preto/SP e transportadas para laboratório em embalagens de papel.

2. Isolamento dos possíveis antagonistas a *Pyricularia oryzae*

A primeira etapa consistiu no isolamento de microrganismos antagonísticos que apareciam como contaminantes nos trabalhos do laboratório de microbiologia do Departamento de Fitopatologia da ESALQ/USP. Todos os isolados, assim obtidos, foram repicados para tubo de cultura com BDA inclinado. Em seguida foram isolados microrganismos que apareciam no filoplano

e rizoplano das plantas de arroz coletadas nas diversas localidades.

Para isolamento de microrganismos do solo foi utilizada a técnica de diluição sucessiva até 10^{-4} . Das plantas, fragmentos de folhas, hastes, raízes e sementes foram transferidos, sem prévia desinfestação superficial, para placas de Petri com BDA. Após 24 horas de incubação, sob luz constante, fornecida por três lâmpadas de 40 watts, luz do dia, marca Philips, colocadas a 30cm de altura e temperatura variando de 26-28°C, todas as colônias que apareceram foram transferidas para tubos de cultura com BDA.

3. Avaliação da capacidade dos microrganismos isolados causarem antibiose a *Pyricularia oryzae*.

Discos de BDA de 0,5cm de diâmetro contendo *P. oryzae*, em pleno desenvolvimento, foram transferidos para o centro de placas de Petri com BDA, permanecendo incubados sob condições já citadas. Transcorridas 48 horas, fragmentos do meio com células dos possíveis antagonistas foram transferidos para dois pontos distanciados 3,5cm do centro da placa de Petri com *P. oryzae* em pleno crescimento. Em seguida, foram novamente colocadas para incubação. A avaliação foi realizada entre 48 e 72 horas, tomando como base a capacidade ou não de inibir o crescimento micelial de *P. oryzae*.

4. Seleção dos antagonistas mais eficientes na inibição do crescimento micelial de *Pyricularia oryzae in vitro*

Os testes foram realizados em placas de Petri contendo BDA em cujos fundos foram previamente marcados dois pontos distanciados de 7cm. Um disco de 7mm de diâmetro de uma cultura ativa de *P. oryzae* foi transferido para um dos pontos. Decorridas 72 horas de incubação, um disco do isolado do antagonista a ser estudado, foi transferido para outra extremidade da placa

retornando-a as 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. Por impossibilidade de ensaiar simultaneamente todos os antagonistas, os testes foram realizados em grupos de isolados.

5. Identificação dos microrganismos antagonísticos 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 al. (1957), BUCHANAN & GIBSONS (1975) e NORRIS et al. (1981).

RESULTADOS

1. Avaliação da capacidade dos microrganismos isolados em 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; 58,4% dos microrganismos isolados em cada localidade.

2. Seleção dos antagonistas mais eficientes na inibição do crescimento micelial de *Pyricularia oryzae in vitro*

Dos 348 isolados que se comportaram como antagonistas a *P. oryzae*, a seleção dos mais eficientes foi baseada na porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIP) e na relação entre a porcentagem de inibição e o crescimento do antagonista (PIP/CA) para cada grupo de antagonistas testado.

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, AP-471. Dados da PIP e da PIP/CA e origem dos isolados são apresentados no Quadro 1.

A faixa de porcentagem de inibição do crescimento micelial de *P. oryzae* por microrganismos antagonísticos ficou entre 7,53 e 33,73% para AP-24 e AP-471, respectivamente. Há necessidade de lembrar que sempre *P. oryzae* desenvolveu-se durante 72 horas na ausência do antagonista, visto que, transferindo o antagonístico antes ou junto com *P. oryzae* no meio de cultura, o agente causal da Brusone praticamente não cresce.

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 antagonística, apresentaram respostas positivas.

A preservação dos antagonistas em água esterilizada (método de Castellani) mostrou-se efetiva até pelo menos 2 anos, pois quando recuperados os antagonistas de código AP-335, AP-374, AP-393, AP-413 e AP-422 em 01/09/87, que tinham sido preservados em 09/85, mantiveram a viabilidade.

4. Identificação dos microrganismos antagonísticos 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,

Quadro 1. 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.

Código	Isolado Origem	Inibição de <i>P. oryzae</i> (%)*	Porcentagem de inibição/ crescimento do antagonista
AP-3	Folha de Eucalipto com <i>Cylindrocladum</i>	29,08	0,79
AP-12	Semente de feijão	27,28	0,99
AP-42	Folha de arroz	23,52	0,57
AP-48	Folha de arroz	20,89	0,67
AP-49	Folha de arroz	25,44	0,84
AP-51	Folha de arroz	26,32	0,84
AP-85	Folha de arroz	18,93	0,65
AP-91	Folha de arroz	19,70	0,91
AP-94	Folha de arroz	23,77	0,79
AP-105	Folha de arroz	23,45	0,61
AP-114	Folha de arroz	26,01	0,74
AP-115	Folha de arroz	23,44	0,65
AP-137	Folha de arroz	23,32	0,88
AP-150	Folha de arroz	24,88	0,90
AP-165	Raiz de arroz	20,03	0,61
AP-181	Folha de arroz	19,19	0,64
AP-183	Folha de arroz	26,72	0,83
AP-203	Folha de arroz	14,51	0,99
AP-323	Raiz de arroz	25,00	0,83
AP-332	Folha de arroz	26,47	0,74
AP-339	Folha de arroz	26,47	0,82
AP-365	Semente de arroz	28,61	0,89
AP-366	Folha de arroz	27,14	0,90
AP-401	Folha de arroz	25,08	1,85
AP-420	Folha de arroz	30,39	1,28
AP-429	Folha de arroz	24,31	1,59
AP-471	Folha de arroz	33,73	1,34

* *P. oryzae* colocado para desenvolver no meio de cultura dois dias antes que o antagonista.

das reações a meios seletivos e das reações bioquímicas, foi verificado que todos os microrganismos antagonísticos selecionados por apresentarem maior eficiência em inibir *P. oryzae*, *in vitro*, comportaram-se de forma semelhante nos testes. Assim, são apre-

sentados de forma global, os resultados obtidos (Quadro 2). Com auxílio do "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" 7ª e 8ª edição, respectivamente editadas por BREED et al. (1957) e BUCHANAN & GIBBONS (1975) e de NORRIS et

Quadro 2. Resultados dos testes para identificação dos microrganismos antagonísticos a *Pyricularia oryzae*, selecionados por apresentarem maior eficiência na inibição do patógeno *in vitro*⁽¹⁾

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: 2,1µm; largura: 0,78µm
XIII.	Forma, elevação e bordo da colônia em placa de Petri:	
	Forma:	Filamentosa-rizóide
	Elevação:	achatada
	Bordo:	Erosado - filamentosos
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

al. (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*

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 blastocidina S e kasugamicina (FUKUNAGA, 1965; UMEZAWA et al., 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 e dos solos onde essas plantas se desenvolviam, demonstrando que existe na natureza um enorme potencial antagonístico. O importante é que em todos os locais de coleta de arroz foram obtidos inúmeros isolados de antagonistas a *P. oryzae*. Este fato indica a possibilidade de se obter antagonistas eficientes 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.

Tanto durante a fase de seleção dos microrganismos antagonísticos a *P. oryzae* como durante a realização dos testes para selecionar os mais eficientes em inibir o crescimento micelial do patógeno, *in vitro*, 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).

Todos os antagonistas selecionados quanto a maior eficiência em inibir o crescimento micelial de *P. oryzae*, *in vitro*, pertencem à mesma espécie: *Bacillus subtilis* (Quadro 2). 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 de cultura, 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 al. (1978a, b), SY et al. (1983a, b) e SY et al. (1984) que são baseados sobre os antagonistas *Trichoderma* spp., *Trichotecium roseum*, *Chaetomium globosum*, *Myrothecium verrucaria*, *Microspora* 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 reconhe-

cidamente com potencial antagonístico geral (ANDREWS, 1985).

O fato de todos os antagonistas selecionados pertencerem à espécie *B. subtilis* não é surpreendente pois essa espécie é reconhecidamente produtora de inúmeros antibióticos como demonstrado por BERDY (1974), BUCHANAN & GIBBONS (1975), KATZ & DEMAIS (1977) e NORRIS et al. (1981). Diversos autores demonstraram que *B. subtilis* é antagonístico a diversos patógenos (PUSEY & WILSON, 1984; DUNLEAVY, 1955; THIRUMALACHAR & O'BRIEN, 1977).

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 ambientais (BUCHANAN & GIBBONS, 1975; KATZ & DEMAIS, 1977 e ANDREWS, 1985). A característica de produção de endosporo, altamente resistente às condições adversas (NORRIS et al., 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 transcórre 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.

LITERATURA CITADA

01. 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.
02. 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.
03. BASTOS, C.N. Antagonismo ao fungo *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer, causador da vassoura-de-bruxa do cacauzeiro. *Revista Theobroma*, Itabuna, 8: 147-50, 1978.
04. BASTOS, C.N. Hiperparasitismo do fungo *Dactylium* sp. a *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer em "vassoura-de-bruxa" do cacauzeiro. *Revista Theobroma*, Itabuna, 9:197-200, 1979.
05. 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.
06. 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.
07. 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.
08. BERDEY, J. A recent development of antibiotic research and classification of antibiotics according to chemical structure. *Advanced Applied Microbiology*, Madison, 18:309-406, 1974.
09. BREED, R.S.; MURRAY, G.G.D.; SMITH, N.R. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 7. ed. Baltimore, The Williams & Wilkins, 1957. 1094p.
10. BUCHANAN, R.E. & GIBBONS, N.G. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 8. ed. Baltimore, The Williams & Wilkins, 1975. 1268p.
11. COOK, R.J. & BAKER, K.F. *The nature and practice of biological control of*

- plant pathogens. St. Paul, The American Phytopathological Society, 1983. 539p.
12. DUNLEAVY, J. Control of damping-off of sugar beet by *Bacillus subtilis*. *Phytopathology*, St. Paul, 45:252-8, 1955.
 13. 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.
 14. 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.
 15. 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.
 16. KATZ, E. & DEMAIN, A.L. The peptide antibiotics of *Bacillus*: chemistry, biogenesis and possible functions. *Bacteriol. Rev.*, Washington, 41:449-74, 1977.
 17. LUZ, W.C. Efeito dos microrganismos do filoplano sobre as manchas fúngicas foliares do trigo. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, 10:79-85, 1985.
 18. LINDBERG, G.D. An antibiotic lethal to fungi. *Plant Disease*, St. Paul., 65:680-3, 1981.
 19. 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.
 20. OU, S.H. *Rice diseases*. London, Commonwealth Mycological Institute, 1985. 380p.
 21. 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.
 22. RIBEIRO, A.S. *Controle integrado das doenças do arroz irrigado: relatório do Projeto nº 039-85001/1*. Brasília, EMBRAPA-CPATB/CNPDA, 1987.
 23. STESSEL, G.L.; LEBEN, C.; KEITT, G.W. Screening tests designed to discover antibiotics suitable for plant disease control. *Mycologia*, New York, 45:325-34, 1953.
 24. 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.
 25. 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.
 26. SY, A.A.; ALBERTINI, L.; ZOHOURI, P.; NORNG, K. Lutte biologique contre *Pyricularia oryzae* Cav. parasite du riz par application de microorganismes antagonistes: premiers resultats *in vitro*. In: *Les antagonismes microbiens; 24^o* Colloque de la Societe Française de Phytopathologie Bordeaux (France), 1983a. p.137-44.
 27. 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 mycélienne du parasite. *Cryptogamie Mycologie*, Paris, 4:245-9, 1983b.
 28. 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 inhibiter in vitro la croissance mycelienne du parasite. *Cryptogamie Mycologie*, Paris, 3:59-65, 1984.

29. 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.
30. UMEZAWA, H.; OKAMI, Y.; SUHARA, Y.; HAMADA, M.; TAKENCHI, T. A new antibiotic, Kasugamicin. *The Journal of Antibiotics*, Tokyo, 18:101-3, 1965.