

TRATAMENTO DE SEMENTES DE ARROZ, TRIGO, FEIJÃO E SOJA COM UM PRODUTO FORMULADO À BASE DE CÉLULAS E DE METABÓLITOS DE *Bacillus subtilis*

E. LAZZARETTI¹; W. BETTIOL^{2,3}

¹Doutorando em Microbiologia Aplicada da UNESP/Rio Claro, SP.

²EMBRAPA/CNPMA - CP. 69, CEP: 13820-000 - Jaguariúna, SP.

³Bolsista do CNPq.

RESUMO: Um produto constituído de pó-molhável (PBBS) formulado à base de células (60g) e de metabólitos (60g) de *Bacillus subtilis*, argila (480g), espalhante (7,92g) e água (2400ml), moído e seco, mostrou-se semelhante aos tratamentos com fungicidas recomendados para o controle de *Rhizoctonia solani*, *Aspergillus* sp. e *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de feijão; *Pyricularia oryzae* e *Rhynchospirium sativum* em sementes de arroz; e *Cercospora kikuchii*, *Phomopsis phaseoli* e *Fusarium* spp. em sementes de soja. Para *Dreschlera oryzae* em arroz e *Bipolaris sorokiniana*, *P. oryzae* e *Alternaria tenuis* em sementes de trigo, o tratamento com o PBBS, embora não tenha se igualado ao tratamento com o fungicida padrão, diferiu estatisticamente do tratamento testemunha. A nodulação das raízes de feijão e soja por bactérias simbióticas, fixadoras de nitrogênio, não foi influenciada quando o PBBS foi aplicado simultaneamente ao inoculante contendo *Rhizobium* sp. e *Bradyrhizobium japonicum*, respectivamente. O PBBS também não afetou a emergência das plântulas das culturas testadas.

Descritores: controle biológico, microbiolização de sementes, patologia de sementes, arroz, feijão, soja e trigo

TREATMENT OF RICE, BEAN, WHEAT AND SOYBEAN SEEDS WITH A PRODUCT CONSISTING OF CELLS AND METABOLITES OF *BACILLUS SUBTILIS*

ABSTRACT: A biological fungicide product containing *B. subtilis* cells (60 g) and metabolites (60g) was transformed into a wettable powder formulated with, clay (480 g), surfactant (7,92 g) and water (2400 ml). The product showed to be similar to the conventional fungicides used in the control of *Rhizoctonia solani*, *Aspergillus* sp. and *Sclerotinia sclerotiorum* in bean seeds. The control of *Pyricularia oryzae* and *Rhynchospirium sativum* in rice seeds and *Cercospora kikuchii*, *Phomopsis phaseoli* and *Fusarium* spp. in soybean seeds was also as efficient as the commercial fungicides. For *Dreschlera oryzae* in rice seeds and *Bipolaris sorokiniana*, *P. oryzae* and *Alternaria tenuis* in wheat seeds, the treatment with the product, although not as efficient as the chemical treatment, was statistically distinct from the control. The root nodulation of bean and soybean by nitrogen fixing bacteria, was not affected when the product was simultaneously applied with bacteria (*Rhizobium* and *Bradyrhizobium japonicum*). The product did not affect seedling emergence in any of the tested crops.

Key Words: biological control, seed microbiolization, seed pathology, rice, bean, soybean, wheat

INTRODUÇÃO

O emprego de microrganismos para o controle de fitopatógenos pode ser direto, quando esses são utilizados vivos; ou indireto, através da aplicação de seus metabólitos. Em ambos os casos necessita-se obter produtos que mantenham as características dos microrganismos ou de seus metabólitos. Dessa forma, esses produtos precisam ser adequadamente formulados para facilitar a comercialização, o transporte, a aplicação e o armazenamento, sem que ocorram grandes alterações em suas características.

Produtos formulados a partir de *Bacillus subtilis* vêm sendo utilizados, desde 1983, nos EUA para o tratamento de sementes de amendoim, entre outras culturas, contra vários fitopatógenos (Weller, 1988). A eficácia de *B. subtilis* no controle de patógenos associados às sementes foi demonstrada por Merriman *et al.* (1974), Venkatasubbaiah (1985), Reedy & Rahe (1989), Jindal & Thind (1990), Turner & Backman (1991), Lazzaretti (1993) e Luz (1993). Segundo Backman (1995), o isolado GB03 de *B. subtilis* foi utilizado para inoculação de mais de 2 milhões de hectares de diversas culturas em 1994. O produto é

comercializado tanto para proteção das raízes quanto para estimular o desenvolvimento das plantas. Por suas características, esse isolado de *B. subtilis* coloniza tanto monocotiledôneas como dicotiledôneas. Backman (1995) apresenta estimativa de que em 1995, mais de 80% do algodão plantado nos USA seriam tratados com esse isolado.

A resistência dos metabólitos produzidos por *B. subtilis* ao calor, os quais permanecem ativos após autoclavagem do meio a 121°C/20 min. (Baker *et al.*, 1983; Bettiol & Kimati, 1990; Lazzaretti, 1993), e a formação de endosporos altamente resistentes ao calor (Buchanan & Gibbons, 1975; Norris *et al.*, 1981) são características excelentes para o desenvolvimento comercial de formulações desta bactéria.

Assim no presente trabalho foi estudado o uso de uma formulação pó-molhável, à base de metabólitos e de células de *B. subtilis* (PBBS), para o tratamento de sementes de arroz, feijão, soja e trigo, visando a redução dos patógenos associados às sementes. Também foram estudados os efeitos desse tratamento no desenvolvimento e na nodulação das raízes de feijão e de soja, por bactérias fixadoras de nitrogênio; e na emergência das sementes.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Formulação de *B. subtilis* (PBBS): Para formular um produto pó-molhável à base de *B. subtilis* (PBBS), isolado AP-3 (Bettiol & Kimati, 1989), foram misturados 480 g de argila A-50 (Sintermor Mineração Ltda), 60 g de células e 60 g de metabólitos de *B. subtilis* obtidos através da centrifugação e precipitação ácida com HCl 1N, respectivamente, do meio de cultura onde foi fermentado por 7 dias (Bettiol *et al.*, 1992). A essa mistura foi adicionado 7,92 g de espalhante Surfon 950PM (nonil fenol etoxilado - 9,5 moles absorvido, ULTRAQUÍMICA) e 2400 ml de água. A mistura foi colocada em moinho de esferas (ERWEKA AR400) onde permaneceu por 30 minutos, para reduzir o diâmetro das partículas. Após a moagem, a mistura foi passada por peneira de 0,210 mm, duas vezes. O material peneirado foi seco em "mini Spray-Dryer" (BÜCHI 190) (a temperatura de entrada foi de 101°C $\pm$ 1 e a de saída foi de 62°C, com vazão de 9 ml/minuto); com rendimento de 47%. O produto (PBBS) obtido possuía $2,57 \times 10^8$ UFC/g. Após 8 meses de armazenamento em condições ambiente o PBBS manteve a mesma

concentração de células. Tanto para a determinação do número de células no produto recém preparado, como com 8 meses de armazenamento, foi utilizada a técnica de diluição em série e plaqueamento em nutriente ágar.

2. Tratamento e patologia de sementes: Obtido o produto (PBBS), procedeu-se ao tratamento das sementes para avaliação da sanidade e da emergência de plântulas de arroz (IAC-4440), feijão (Carioquinha IT-185), soja (BR 4) e trigo (Anahuac). Nas culturas de feijão e de soja também foi avaliado o efeito do produto sobre a nodulação das raízes por bactérias fixadoras de nitrogênio (*Rhizobium* sp. e *Bradyrhizobium japonicum*, respectivamente).

A quantidade de PBBS para o tratamento de sementes foi baseada na dose de ingrediente ativo por 100 kg de sementes de um fungicida utilizado para cada cultura (feijão - 50 g de benomyl; arroz e soja - 225 g de quintozene; e trigo - 50 g de iprodione + 150 g de thiram). Além da dose igual ao produto químico, foram utilizadas metade e o dobro da dosagem. Para as sementes de feijão, além do PBBS, foram utilizados separadamente células e metabólitos de *B. subtilis*. Como testemunha foram utilizadas sementes sem tratamento. O tratamento consistiu em misturar as sementes com os produtos através de uma molhagem rápida, isto é, com acréscimo de pequenas quantidades de água.

Os testes de sanidade de sementes foram feitos em placas de Petri plásticas, contendo discos de papel de filtro, previamente umedecidos em água destilada. As sementes foram incubadas a 21°C $\pm$ 0,5 por 7 dias sob regime luminoso de 12 horas de luz/ 12 horas de escuro. As sementes de feijão e trigo, após 24 horas de incubação, foram transferidas para "freezer" a -18°C por 24 horas, retornando em seguida às condições iniciais. As sementes de feijão foram incubadas por 15 dias, a 25°C, para observar o crescimento de *Sclerotinia sclerotiorum*.

Após a incubação as sementes foram avaliadas com auxílio de um microscópio estereoscópico, examinando-se todas as sementes individualmente, para detectar a presença de fungos fitopatogênicos. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com 4 repetições de 100 sementes cada tratamento. Para análise estatística os dados foram transformados em $\arcsen$ da raiz quadrada de $x/100+0,5$ e as médias comparadas pelo teste Duncan ao nível de 5% de probabilidade.

3. Testes em casa de vegetação e campo: Para observar o efeito do PBBS sobre a emergência das plântulas e sobre a nodulação de raízes de feijoeiro e de soja por *Rhizobium* sp. e *Bradyrhizobium japonicum*, respectivamente, foram realizados teste em casa de vegetação e campo.

Sementes de trigo tratadas com o PBBS (100 g i.a./100kg de sementes) e fungicida (iprodione + thiram 50+150 g/100kg sem.), foram semeadas em caixas plásticas contendo solo (Podzólico vermelho amarelo, fase terraço) peneirado e mantidas em casa de vegetação por 15 dias, quando procedeu-se a avaliação do número de plântulas emergidas.

Sementes de arroz, após tratamento com fungicida (quintozene 225 g/100kg sem.) e com o PBBS (450 g ia/100 kg sementes) foram semeadas em solo Podzólico vermelho amarelo, fase terraço, no campo experimental do CNPMA, e após 15 dias avaliado o número de plântulas emergidas.

As sementes de feijão e de soja foram, previamente inoculadas com bactérias fixadoras de nitrogênio dos gêneros *Rhizobium* sp. e *B. japonicum*, respectivamente, (inoculantes fornecidos pela TURFAL Ltda, Curitiba, PR) e, posteriormente tratadas com o PBBS (450 g i.a./100 kg de sementes para soja e 100 g ia/100 kg de sementes para feijão) e com fungicida (benomyl 50 g/100 kg de sementes para feijão e quintozene 225 g/100 kg de sementes para soja). As sementes foram inoculadas conforme recomendação do produtor do inoculante (200 g de inoculante/60 kg de sementes). Após os tratamentos, as sementes foram semeadas no campo experimental do CNPMA/EMBRAPA de Jaguariúna/SP, em solo Podzólico vermelho amarelo. Aos 15 dias da semeadura foi avaliado o número de plântulas emergidas e aos 50 dias as plantas foram cuidadosamente arrancadas e as raízes lavadas em água corrente para proceder a contagem do número de nódulos presentes. Além do número de nódulos, foram avaliados os pesos secos da parte aérea e das raízes. Para comparação, sementes sem tratamento, sementes inoculadas com as bactérias fixadoras de nitrogênio e sementes tratadas somente com o PBBS nas mesmas dosagens, anteriormente citadas, foram utilizadas.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com 4 repetições de 100 sementes para as culturas de feijão, soja e trigo e 4 repetições de 50 sementes para a cultura do arroz.

RESULTADOS

A aplicação isolada de células ou de extrato de *B. subtilis* em sementes de feijão não diferiu estatisticamente dos resultados obtidos no tratamento testemunha sendo por isso eliminado nos ensaios subseqüentes. O PBBS quando aplicado na concentração de 100g i.a./100kg de sementes de feijão comportou-se estatisticamente semelhante ao fungicida benomyl (50g i.a./100kg sementes) no controle de *S. sclerotiorum*, *Aspergillus* sp. e *Rhizoctonia solani*. Para *R. solani* todos os tratamentos (benomyl-50g; PBBS-50g e 100g; células - 50g e metabólitos de *B. subtilis* 50g por 100 kg de sementes) foram eficientes em reduzir a sua incidência nas sementes. Dos produtos acima citados apenas o benomyl reduziu a incidência de *Fusarium* e nenhum apresentou efeito significativo em *Alternaria* (TABELA 1). Em relação ao *Penicillium* spp. apenas o benomyl reduziu significativamente a sua presença.

Para as sementes de arroz, com exceção do PBBS aplicado em meia dosagem (110 g i.a./100 kg de sementes) para *Dreschlera oryzae* e *Pyricularia oryzae*, todos os tratamentos (quintozene 225g ia.; PBBS 225 e 450 g ia. por 100 kg de sementes) reduziram significativamente as populações de *D. oryzae*, *P. oryzae* e *Rhizosporium sativum* das sementes, quando comparado com a testemunha. Em relação à incidência de *P. oryzae* e *R. sativum*, o PBBS (225 e 450g ia.) apresentou comportamento estatisticamente semelhante ao fungicida quintozene (225g/100 kg de sementes) (TABELA 2).

Para sementes de soja, o PBBS (110, 225 e 450 g ia./100 kg de sementes) mostrou-se estatisticamente semelhante ao fungicida quintozene (225g/100 kg de sementes) no controle de *Cercospora kikuchii*, *Phomopsis phaseoli* e *Fusarium* spp. (TABELA 2).

O tratamento das sementes de trigo com o PBBS (25, 50 e 100 g/100 kg de sementes) foi estatisticamente inferior ao tratamento com iprodione + thiram em relação ao controle de *B. sorokiniana*, *P. oryzae* e *A. tenuis*. Entretanto, ocorreu acentuada redução na incidência desses três patógenos, quando o PBBS foi comparado ao tratamento testemunha. Foi observado ainda que o PBBS, nas concentrações de 50 e 100 g ia/100kg de sementes, diferiu estatisticamente da testemunha quanto à incidência de *B. sorokiniana*, *P. oryzae* e *A. tenuis* (TABELA 3).

TABELA 1 - Efeito do tratamento de sementes de feijão com um produto formulado com células e com metabólitos de *Bacillus subtilis* (PBBS), sobre a incidência de patógenos.

Tratamento	<i>Fusarium</i> spp.	<i>Alternaria</i> spp.	<i>Penicillium</i> spp.	<i>Sclerotinia</i> <i>sclerotiorum</i>	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>Rhizoctonia</i> <i>solani</i>
Testemunha	38,84 ¹ a ²	1,33 a	5,31 ab	4,98 a	2,65 a	3,65 a
Benomyl (50 g/100 kg de sementes)	15,60 b	1,33 a	0,33 c	0,00 c	0,00 b	0,00 b
PBBS ³ (50 g ia./100 kg de sementes)	39,76 a	0,66 a	3,98 ab	4,31 a	2,32 a	0,33 b
PBBS (100 g ia./100 kg de sementes)	44,15 a	1,66 a	3,32 b	0,99 bc	0,66 ab	0,99 ab
Células de <i>B. subtilis</i> (50 g/100 kg de sementes)	46,15 a	1,99 a	6,97 a	4,98 a	2,65 a	0,66 b
Metabólitos de <i>B. subtilis</i> (50 g/100 kg de sementes)	41,17 a	0,33 a	4,98 ab	2,98 ab	0,99 ab	0,00 b

¹Média de 400 sementes.²Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si (Duncan 5%). Para análise estatística os dados foram transformados em arc.sen. da raiz quadrada de $x/100 + 0,5$.³PBBS - produto à base de *B. subtilis* (10% de células e 10% de metabólitos do isolado AP3).TABELA 2 - Efeito do tratamento de sementes de arroz e de soja com um produto formulado com células e com metabólitos de *Bacillus subtilis* (PBBS), sobre a incidência de patógenos.

Tratamento	Arroz			Soja		
	<i>Dreschelera</i> <i>oryzae</i>	<i>Pyricularia</i> <i>oryzae</i>	<i>Rhizosporium</i> <i>sativum</i>	<i>Cercospora</i> <i>kikuchii</i>	<i>Phomopsis</i> <i>phaseoli</i>	<i>Fusarium</i> spp.
Testemunha	12,75 ¹ a ²	14,25 a	7,00 a	21,5 a	4,0 a	29,0 a
Quintozene (225 g/100 kg de sementes)	0,25 c	0,50 b	0,25 b	9,0 b	1,0 b	8,5 c
PBBS ³ (450 g ia/100 kg de sementes)	4,74 b	1,00 b	0,50 b	5,0 b	0,0 b	11,5 bc
PBBS (225 g ia/100kg de sementes)	5,00 b	1,75 b	1,25 b	6,0 b	0,0 b	16,5 b
PBBS (110 g ia/100 kg de sementes)	8,75 ab	6,50 a	1,00 b	10,0 b	1,0 b	17,0 b

¹Média de 400 sementes.²Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem entre si (Duncan 5%). Para análise estatística os dados foram transformados em arc.sen. da raiz quadrada de $x/100 + 0,5$.³PBBS - produto à base de *B. subtilis* (10% de células e 10 % de metabólitos, do isolado AP3).

TABELA 3 - Efeito do tratamento de sementes de trigo com produto formulado com células e com metabólitos de *Bacillus subtilis* (PBBS), sobre a incidência de patógenos.

Tratamento	<i>Bipolaris sorokiniana</i>	<i>Pyricularia oryzae</i>	<i>Alternaria tenuis</i>
Testemunha	12,00 ¹ a ²	18,00 a	31,00 a
Iprodione + thiram (50 g + 150g/100 kg de sem)	1,25 c	0,75 c	6,50 c
PBBS ³ (25 g ia/100 kg de sementes)	7,25 ab	13,00 ab	15,75 b
PBBS (50 g ia/100 kg de sementes)	5,75 b	13,50 ab	17,50 b
PBBS (100 g ia/100 kg de sementes)	6,75 b	10,50 b	15,75 b

¹Média de 400 sementes.²Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem entre si (Duncan 5%). Para análise estatística os dados foram transformados em arc.sen. da raiz quadrada de $x/100 + 0,5$.³PBBS - produto à base de *B. subtilis* (10% de células e 10% de metabólitos, do isolado AP3).

Quanto ao efeito sobre a emergência das plântulas, foi verificado que o PBBS não afetou a qualidade fisiológica das sementes, mesmo quando utilizado em grandes quantidades (Figura 1). Para feijão, soja e trigo, a porcentagem de emergência não diferiu estatisticamente das testemunhas, quando realizado tratamento de sementes com o PBBS e fungicidas. Para arroz, verificou-se que o tratamento com quintozene foi superior à testemunha, mas não diferiu do PBBS (Figura 1).

Quanto ao efeito do PBBS sobre a nodulação, pesos secos da parte aérea e das raízes de soja e de feijão, não foram observadas diferenças estatísticas entre os tratamentos, com exceção do tratamento com fungicida quintozene para a soja que diferiu da testemunha quando avaliado o número de nódulos e a relação número de nódulos por grama de raiz (TABELAS 4 e 5).

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

O número de unidades formadoras de colônia obtido no PBBS ($2,57 \times 10^8$) foi próximo ao número de esporos do produto Quantum-4000 a base de *B. subtilis* comercializado nos E.U.A que foi determinado por Turner & Backman (1991) em $1,13 \times 10^8$. Este resultado indica que o PBBS está dentro de um padrão aceitável. A quantidade de ufc, 8 meses após o armazenamento à temperatura ambiente, demonstrou que o PBBS mantém a viabilidade das células por longos períodos o que é desejável em formulações comerciais.

No tratamento de sementes, os melhores resultados foram obtidos quando o PBBS foi aplicado nas maiores concentrações como observa-se, principalmente, para as sementes de arroz e soja, onde os tratamentos na maior dosagem foram estatisticamente semelhantes ao tratamento

TABELA 4 - Efeito do produto à base de células e de metabólitos de *Bacillus subtilis* (PBBS) sobre a nodulação de raízes de soja por *Bradyrhizobium japonicum* (BRh).

Tratamentos	nódulos totais (nº)	peso de nódulos (g)	peso seco da parte aérea (g)	peso seco das raízes (g)	nº de nódulos/g de raiz
PBBS ³ (450 g ia/100 kg de sementes)	127,5 ¹ ab ²	0,60 a	21,93 a	4,12 a	33,41 a
PBBS (450 g ia/100 kg de sem.) + BRh	122,0 ab	0,94 a	28,51 a	5,59 a	23,57 ab
Quintozene (225 g/100 kg de sem) + BRh	89,2 b	0,63 a	28,26 a	5,23 a	17,10 b
Testemunha absoluta	124,5 ab	0,77 a	26,56 a	5,23 a	25,42 ab
Testemunha + BRh	144,5 a	0,86 a	20,87 a	3,99 a	36,86 a

¹Média de 4 repetições, com 100 sementes cada.²Médias seguidas da mesma não diferem entre si (Duncan 5%).³PBBS - produto à base de *B. subtilis* (10% de células e 10% de metabólitos, do isolado AP3).

TABELA 5 - Efeito do produto à base de células e de metabólitos de *Bacillus subtilis* sobre a nodulação de raízes de feijão por *Rhizobium* sp. (Rhi)

Tratamento	nódulos totais (n°)	peso seco da parte aérea (g)	peso seco das raízes (g)	n° nódulos/g de raiz
PBBS ³ (450 g ia/100 kg de sementes)	312 ¹ a ²	17,62 a	2,84 a	115,72 a
PBBS (450 g ia/100 kg de sem.) + Rhi.	316 a	16,26 a	2,63 a	154,06 a
Benomyl (50 g/100 kg de sem.) + Rhi.	356 a	18,16 a	2,81 a	126,30 a
Testemunha absoluta	301 a	17,88 a	3,05 a	100,88 a
Testemunha + Rhi	377 a	15,59 a	2,64 a	146,17 a

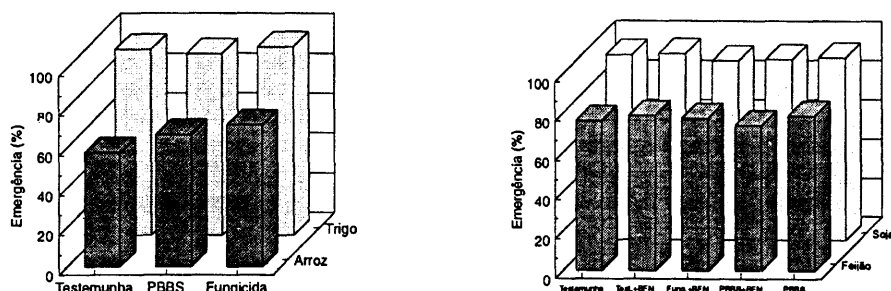
¹Média de 4 repetições com 100 sementes.²Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si (Duncan 5%).³PBBS - produto à base de *B. subtilis* (10% de células e 10% de metabólitos, do isolado AP3).

Figura 1 - Efeito do produto à base de células e de metabólitos de *Bacillus subtilis* sobre a emergência de plântulas de arroz, trigo, feijão e soja avaliada aos 15 dias da semeadura. PBBS - produto à base de *B. subtilis* (10% de células e 10% de metabólitos, do isolado AP3), sendo 450 g ia/100 kg de sementes de arroz e soja; e 100 kg ia/100 kg de sementes de trigo e feijão. BFN - bactérias fixadoras de nitrogênio (*Bradyrhizobium japonicum* e *Rhizobium* sp. para soja e feijão, respectivamente). Fungicida - 50 g de iprodione + 150 g de thiram/100 kg de sementes de trigo; 225 g de quintozene/100 kg de sementes de soja e de arroz; 50 g de benomyl/100 kg de sementes de feijão. Os tratamentos dentro das culturas de soja, feijão e trigo não diferem entre si (Duncan 5%). Para a cultura de arroz, os tratamentos contendo as mesmas letras sobre as barras não diferem entre si (Duncan 5%).

fungicida. Este efeito também foi observado por Lazzaretti (1993) em tratamentos de sementes de trigo, o qual observou que o aumento na concentração de bactéria no meio ao qual as sementes foram mergulhadas, resultava em um maior controle de patógenos.

A alta sensibilidade de *R. solani* frente a *B. subtilis* pode ser observada nos resultados obtidos em sementes de feijão. Mesmo na menor dosagem do PBBS o patógeno mostrou-se sensível,

estando de acordo com relatos de Dunleavy (1955), Liu & Sinclair (1987), Turner & Backman (1991) e Lazzaretti *et al.* (1992).

Os resultados obtidos mostraram que o produto não afetou negativamente a emergência das plântulas das culturas testadas, como relatado por Scortichini *et al.* (1989) para soja, mas também não estimulou a emergência de plântulas como observado por Merriman *et al.* (1974) e Zaspel (1992) para sementes de trigo e Turner & Backman

(1991) para sementes de amendoim. Os dados mostraram que apenas para arroz os tratamentos com fungicida e PBBS foram melhores que a testemunha (Figura 1).

O efeito benéfico de *B. subtilis* sobre a nodulação de leguminosas observado por Li & Alexander (1988), Gaiind & Gaur (1991), Turner & Backman (1991) e Rossal & McKnight (1991) não foi verificado no presente trabalho, embora o experimento tenha mostrado que o produto não prejudica a associação. Entretanto, como o PBBS, para o controle dos patógenos associados às sementes de soja, foi estatisticamente semelhante ao fungicida quintozene e não reduziu a nodulação, seu potencial para o tratamento dessas sementes pode ser considerado e deve ser avaliado sob diversas condições. Associado a esses fatos, o *B. subtilis*, apesar de não ter sido verificado nesse trabalho, mas largamente demonstrado pela literatura (Backman, 1995; Luz, 1996), também estimula o desenvolvimento das plantas. Fato esse importante para um agente microbiano de controle de patógenos.

Outro aspecto a ser considerado no tratamento de sementes é a introdução do antagonista na área, podendo existir um efeito a longo prazo com o aumento de sua concentração, na direção de tornar o solo supressivo a diversos patógenos. Para soja, tem sido demonstrado o efeito de *B. subtilis* sobre o nematóide do cisto, causado por *Heterodera glycines* (Araujo & Silva, 1996), podendo a introdução via sementes colaborar no seu controle.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAÚJO, F.F.; SILVA, F.J.V. Controle biológico do nematóide de cisto da soja (*Heterodera glycines*) através de *Bacillus subtilis*. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 5., Foz do Iguaçu, 1996. Anais. Londrina: EMBRAPA/CNPSoja, 1996. p.126.
- BACKMAN, P.A. Development and commercialization of *Bacillus subtilis* (GBO3) as a rhizosphere inoculant. European Journal of Plant Pathology, (In: INTERNATIONAL PLANT PROTECTION CONGRESS), 13. The Hague, 1995. Kluwer Academic, Abstracts. 1995. Abstract 27.
- BAKER, C.J.; STAVELY, J.R.; THOMAS, C.A.; SASER, M.; MACFALL, J.S. Inhibitory effect of *Bacillus subtilis* on *Uromyces phaseoli* and development of rust pustules on bean leaves. *Phytopathology*, v.73, n.8, p.1148-1152, 1983.
- BETTIOL, W.; KIMATI, H. Seleção de microrganismos antagonísticos à *Pyricularia oryzae* para o controle da Brusone do arroz. *Summa Phytopathologica*, v.15, n.3/4, p.257-266, 1989.
- BETTIOL, W.; KIMATI, H. Efeito de *Bacillus subtilis* sobre *Pyricularia oryzae* agente causal da Brusone do arroz. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.25, n.8, p.1165-1174, 1990.
- BETTIOL, W.; BRANDÃO, M.S.B.; SAITO, M.L. Controle da ferrugem do feijoeiro com extrato e células formuladas de *Bacillus subtilis*. *Summa Phytopathologica*, v.18, n.2, p.153-159, 1992.
- BUCHAMAN, R.E.; GIBBONS, N.G. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 8ed. Baltimore: The Williams & Wilkens, 1975. 1268p.
- DUNLEAVY, J. Control of damping-off of sugar beet by *Bacillus subtilis*. *Phytopathology*, v.45, p.252-258, 1955.
- GAIND, S.; GAUR, A.C. Thermotolerant phosphate solubilizing microorganisms and their interaction with mungbean. *Plant and Soil*, v.133, p.141-149, 1991.
- JINDAL, K.K.; THIND, B.S. Microflora of cowpea seeds and its significance in the biological control of seedborne infection of *Xanthomonas campestris* pv. *vignicola*. *Seed Science and Technology*, v.18, p.393-403, 1990.
- LAZZARETTI, E. Controle de fungos transportados por sementes de trigo com *Bacillus subtilis*. Piracicaba, 1993. 112p. Dissertação (Mestrado)-Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo.
- LAZZARETTI, E.; MENTEN, J.O.M.; BETTIOL, W. *Bacillus subtilis* antagonísticos aos principais patógenos associados às sementes de Feijão e Trigo. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 3., Águas de Lindóia, 1992. Anais. Jaguariúna: EMBRAPA/CNPDA, 1992. p.295.
- LI, D.M.; ALEXANDRER, M. Co-inoculation with antibiotic producing bacteria to increase colonization and nodulation by rhizobia. *Plant and Soil*, v.108, p.211-219, 1988.
- LIU, Z.; SINCLAIR, J.B. *Bacillus subtilis* as a potencial biological control agent for *Rhizoctonia* root rot of soybeans. *Phytopathology*, v.115, p.204-213, 1987.
- LUZ, W.C. Controle microbiológico do mal do pé do trigo pelo tratamento de sementes. *Fitopatologia Brasileira*, v.18, n.1, p.82-85, 1993.

- LUZ, W.C. Efeito de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas em trigo e em milho. *Fitopatologia Brasileira*, v.21, p.434, 1996.
- MERRIMAN, P.R.; PRICE, R.D.; KOLLMORGEN, J.F.; PIGGOTT, T.; RIDGE, E.H. Effect of seed inoculation with *Bacillus subtilis* and *Streptomyces griseus* on the growth of cereals and carrots. *Australian Journal of Agricultural Research*, v.25, p.219-226, 1974.
- NORRIS, J.R.; BERKELEY, R.C.W.; LOGAN, A.; O'DONNELL, A.L. The genera *Bacillus* and *Sporolactobacillus*. In: STARR, M.P. *The Prokaryotes*. Berlin: Springer Verlag, 1981. p.1711-1742.
- REEDY, M.S.; RAHE, J.E. Growth effects associated with seed bacterization not correlated with populations of *Bacillus subtilis* inoculant in onion seedling rhizospheres. *Soil Biology and Biochemistry*, v.21, n.3, p.373-378, 1989.
- ROSSALL, S.; MCKNIGHT, S.E. Some effects of *Bacillus subtilis* (MBI 600) on the development of cotton and peanut. *Bulletin-SROP*, v.14, n.8, p.88-92, 1991. Resumo nº7272; apud *Review of Plant Pathology*, v.71, n.11, p.880, 1992.
- SCORTICHINI, M.; ROSSI, M.P.; RICCI, B.; NDZOUNBA, B. Soybean (*Glycine max* (L.) Merr) seed decay associated with *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn, in Gabon. *FAO Plant Protection Bulletin*, v.37, n.2, p.87-91, 1989.
- TURNER, J.T.; BACKMAN, P.A. Factors relating to peanut yield increases after seed treatment with *Bacillus subtilis*. *Plant Disease*, v.75, n.4, p.347-353, 1991.
- VENKATASUBBIAH, P. Efficacy of *Bacillus subtilis* as a biocontrol for rot of coffee pathogen. *Geobios*, v.12, n.3/4, p.101-104, 1985.
- WELLER, D.M. Biological control of rhizosphere with bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, v.26, p.379-407, 1988.
- ZASPEL, I. Studies on the influence of antagonistic rhizosphere bacteria on winter wheat attacked by *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Bulletin_OILB/SROP*, v.15, n.1, p.142-144, 1992.

Recebido para publicação em 07.11.96

Aceito para publicação em 25.04.97