

Capítulo 20

Análise da Viabilidade Comercial de Produtos à Base de *Bacillus subtilis* e *Bacillus pumilus* para o Controle de Fitopatógenos no Brasil

Fabiana D'Agostino¹ & Marcelo Augusto Boechat Morandi²

¹BioControle Ltda. Rua João Anes, 117, 05060-020, Lapa, São Paulo, SP, Brasil, e-mail: fabiana@biocontrole.com.br; ²Embrapa Meio Ambiente, CP 69; 13820-000 Jaguariúna, SP, Brasil, e-mail: mmorandi@cnpma.embrapa.br

Introdução

Aumentar a produtividade das plantas por meio da melhoria do seu estado fitossanitário com sustentabilidade é um desafio para a humanidade na sociedade moderna. Este objetivo foi conseguido, em muitos casos, com a utilização de variedades resistentes e controle químico. Contudo, para algumas doenças, não há fontes de resistência, além da possibilidade de quebra da resistência por novas raças do patógeno, o que exige melhoramento contínuo. Ainda, o uso indiscriminado de agrotóxicos conduz à degradação do ecossistema, podendo selecionar estirpes do patógeno resistentes aos agrotóxicos e causar problemas de saúde humana e animal (Huang, 1997).

Os dados de comercialização de agrotóxicos fornecidos pelo Sindag (Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola) mostram a evolução das vendas de fungicidas, com crescimento constante e chegando a R\$993,8 milhões em 2007, valor correspondente a 21,1% do total comercializado. Isso mostra a importância do controle de fitopatógenos na agricultura no Brasil e a necessidade de desenvolvimento e introdução de alternativas de manejo. Nesta situação, o controle biológico torna-se importante e tecnicamente justificável. O controle biológico está em crescimento no Brasil, mas em uma progressão lenta, tanto pela falta de produtos biológicos disponíveis no mercado, como pelo perfil conservador do agricultor brasileiro.

A maior parte da comercialização de produtos microbianos é voltada para a agricultura convencional. Embora alguns produtos sejam usados em grandes culturas anuais com resultados satisfatórios, os cultivos perenes e semiperenes e os cultivos protegidos oferecem melhores condições para o estabelecimento e uso dos microrganismos (Lopes, 2007). Além disso, precisa ser considerado o mercado da agricultura orgânica, que está em crescimento no país.

Há no mercado brasileiro dezenas de produtos à base de fungos e bactérias para o biocontrole (Pomella, 2007). Porém, o Agrofit, banco de dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa) mostra que estão registrados somente cinco ingredientes ativos microbiológicos em 18 produtos comerciais. Desses, 17 são inseticidas e um fungicida (Agrofit, 2008. Disponível em http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons, consultado em 26/01/2008). Comparativamente, nos Estados Unidos, 195 ingredientes ativos estavam registrados em 780 produtos comerciais até o final de 2001 (EPA, 2008). Portanto, considerando as perdas causadas pelos fitopatógenos na agricultura, a importância do desenvolvimento de alternativas menos agressivas ao homem e ao ambiente, o avanço nas pesquisas, a constatação do potencial do controle biológico e da disponibilidade de produtos eficazes no mercado internacional e, praticamente, sua ausência no mercado nacional, faz-se necessário o desenvolvimento de produtos, ou a introdução daqueles disponíveis em outros países para o manejo de doenças de plantas no Brasil.

Este capítulo analisa a viabilidade comercial de produtos à base de *Bacillus pumilus* e *Bacillus subtilis* na agricultura brasileira.

Potencial de *Bacillus pumilus* e *Bacillus subtilis*

Dentre os antagonistas mais estudados encontra-se a bactéria *Bacillus subtilis*, a qual se destaca no controle de doenças do filoplano e em pós-colheita (Pusey *et al.*, 1986, Ferreira *et al.*, 1991, Kalita *et al.*, 1996, Sonoda & Guo, 1996). *Bacillus subtilis* é efetivo na prevenção e controle de doenças causadas por várias espécies de patógenos. Atua inibindo a germinação de esporos o crescimento do tubo germinativo e micelial dos patógenos, bloqueando o ataque do patógeno à superfície foliar pela formação de uma zona de inibição e também por indução de resistência no hospedeiro. Há produtos no mercado internacional com registro de utilização em plantios de uva, maçã, pêra, amendoim, cucurbitáceas, hortaliças folhosas, crucíferas, pimentão, tomate, cebola, cenoura, herbáceas, ornamentais entre outras (Weller, 1988, Copping, 2004). Produtos formulados a partir de *Bacillus subtilis* são utilizados desde 1983 nos EUA para o tratamento de sementes de amendoim, aplicações foliares e no solo (Weller, 1988).

Outra espécie promissora no controle de doenças de plantas é *Bacillus pumilus*. O modo de ação de *Bacillus pumilus* tem como base a inibição do desenvolvimento do patógeno na superfície foliar, além de ativar o sistema de defesa da planta. Esse antagonista age curativa e preventivamente, contra o desenvolvimento de oídios, míldios, ferrugens e outros patógenos em cereais,

frutíferas, hortaliças e uva (Coping, 2004, Bargabus *et al.*, 2004). De acordo com o compêndio “The Manual of Biocontrol Agents”, há três estirpes de *Bacillus subtilis* registrados e presentes em 34 produtos comerciais uma estirpe de *Bacillus pumilus* registrada e utilizada em um produto comercial. Para discussão da viabilidade comercial desses agentes de biocontrole serão relatados alguns estudos de eficiência destes microrganismos contra importantes patógenos em culturas agrícolas no Brasil. O seu potencial de uso será determinado, baseado nos dados disponíveis sobre prejuízos causados pelas doenças e consumo de fungicidas para o controle.

Alface. No cultivo hidropônico de alface, uma das principais limitações é a podridão de raízes causada por *Pythium aphanidermatum*, especialmente nas épocas mais quentes do ano. Aplicações de *Bacillus subtilis* em alface hidropônica mostraram redução na recuperação do patógeno em 17%, na inoculação artificial (mergulho das raízes em suspensão do patógeno) e 40%, na inoculação natural (fornecimento de inóculo por plantas inoculadas artificialmente) (Correa & Bettiol, 2007).

Arroz. A brusone, causada por *Pyricularia grisea* (sin. *Pyricularia oryzae*), é considerada a principal doença do arroz. No Brasil, sob infecção natural, estimativas de danos em algumas variedades revelaram redução de 60% na produtividade. O patógeno afeta todas as partes aéreas da planta, desde os estádios iniciais de desenvolvimento até a fase final de produção de grãos (Bedendo & Prabhu, 2005). Bettiol & Kimati (1989) observaram a ocorrência de grande número de microrganismos antagonistas a *Pyricularia oryzae*, sendo *Bacillus subtilis* o mais eficiente.

Café. A ferrugem (*Hemileia vastatrix*) ataca as plantas de café em todas as regiões do mundo. No Brasil pode ser encontrada em todas as lavouras de café. Em condições favoráveis, os prejuízos atingem 35% e sob condições de estiagem prolongada, as perdas podem chegar a mais de 50%. Os principais danos são a queda precoce das folhas e a seca dos ramos. Em ensaios de avaliação de produtos orgânicos quanto ao efeito protetor e indutor de resistência à ferrugem do cafeeiro, comparando-se com fungicidas sistêmicos, Costa *et al.* (2007) verificaram que o tratamento com *Bacillus subtilis* reduziu a severidade da ferrugem em mais de 90% em relação à testemunha (água), equiparando-se inclusive a outros tratamentos químicos.

Citros. A podridão floral dos citros (*Colletotrichum acutatum*) afeta flores e frutos recém-formados. Endêmica, constitui-se numa das mais importantes doenças fúngicas no Rio Grande do Sul e sudeste de São Paulo (Feichtenberger *et al.*, 2005). Kupper *et al.* (2003) testaram em laboratório 64 isolados de *Bacillus subtilis*, quatro isolados de *Bacillus* spp. e um isolado de *Bacillus thuringiensis* quanto à capacidade de inibir o desenvolvimento de *Colletotrichum acutatum* em cultura pareada e quanto à produção de metabólitos com atividade antimicrobiana. Todos isolados inibiram o crescimento micelial do patógeno. Sete dos isolados de *Bacillus subtilis* foram testados para o controle da doença em condições de campo. Neste caso, *Bacillus subtilis* ACB-69 mostrou maior eficácia de controle, equiparada estatisticamente a um fungicida químico, proporcionando menor porcentagem de flores com sintomas e maior número médio de frutos efetivos. Outra doença de importância para a cultura é a podridão radicular (*Phytophthora parasitica* e *Phytophthora citrophthora*), que pode provocar perdas significativas em viveiros de todas as regiões citrícolas. Atualmente, o seu controle é feito com fungicidas.

O antagonismo de *Bacillus subtilis* e de outros isolados bacterianos foi avaliado por meio da inibição do crescimento micelial e redução na percentagem de infecção da doença em mudas de citros, obtidas de sementes microbiolizadas com rizobactérias. A microbiolização de sementes pode constituir uma opção potencial para o controle de fitopatógenos habitantes do solo (Luz, 1993b). *Bacillus subtilis* foi um dos mais ativos inibidores do crescimento micelial de *Phytophthora*. Em condições de casa de vegetação, todos os isolados proporcionaram redução na percentagem de infecção da doença (Amorim, 2002).

Crucíferas. A podridão negra (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) é a principal doença bacteriana das crucíferas. Se a cultura for infectada, recomenda-se a eliminação total (Marigoni, 2005), por isso o tratamento preventivo é fundamental. Assis *et al.* (1996) observaram que *Bacillus subtilis* R14 controlou completamente três isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* em todo período de aplicação em couve, sugerindo uma utilização da bactéria como uso preventivo para a doença. Assis *et al.* (1997) confirmaram essa eficiência em ensaios de campo, onde o mesmo isolado promoveu a redução de 73% da doença em brócolis. Além do *Bacillus subtilis* R14, outras três espécies mostraram eficácia de controle, incluindo *Bacillus pumilus* C116. Em outro estudo, a partir de nove isolados de *Bacillus* testados *in vitro* contra *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, apenas quatro espécies mostraram atividade antibiótica, dentre elas *Bacillus pumilus* C116 e *Bacillus subtilis* R14 (Luna *et al.*, 2002).

Cucurbitáceas. A mancha aquosa (*Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*) é responsável por grandes perdas de produção e depreciação dos frutos. Desde que Assis *et al.* (1999) relataram a ocorrência dessa doença no Rio Grande do Norte em 1997, têm sido assinaladas perdas entre 40 a 50%, atingindo até 100% em períodos chuvosos (Sales Júnior & Menezes, 2001). Os mesmos autores citam que as medidas eficientes para controle da doença são escassas e depois de introduzida em uma área, é de difícil erradicação. Em ensaios conduzidos *in vitro*, Santos *et al.* (2006), observaram que compostos lipopeptídicos produzidos por *Bacillus pumillus* C116 inibiram o crescimento do agente causal da mancha-aquosa em plântulas de melão por meio do tratamento de sementes, sugerindo a provável eficácia deste tratamento para prevenção da doença em campo. Oliveira *et al.* (2006) testaram 96 isolados bacterianos para controle da mancha aquosa em sementes pré-inoculadas com *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. Dentre estes, *Bacillus subtilis* reduziu a severidade da doença e foi recomendado para o tratamento de sementes infectadas, isoladamente ou em combinação com outros agentes de controle. A podridão das raízes e do colo (*Fusarium solani*) em pepino, abóbora, melão e melancia ocasiona a morte de plantas quando em plantios consecutivos sob plasticultura. (Kurozawa *et al.*, 2005). De 18 isolados de bactérias da rizosfera de plantas sadias de pepino, três foram eficientes no antagonismo a *Fusarium solani*, sendo dois isolados de *Bacillus subtilis*. Em casa-de-vegetação, *Bacillus subtilis* 0G, controlou totalmente o patógeno (Melo & Valarini, 1995).

Feijão. A ferrugem do feijoeiro (*Uromyces appendiculatus*) pode causar danos severos quando ocorre precocemente na cultura. O controle por meio de resistência genética é prejudicado devido à grande variabilidade do agente causal (Bianchini *et al.*, 2005), portanto para seu controle utilizam-se fungicidas químicos. Baker *et al.*

(1983; 1985), citados por Bettioli & Ghini (1995), verificaram que um isolado de *Bacillus subtilis*, originário do solo, reduziu em 95% o número de pústulas da ferrugem do feijoeiro, quando aplicado em cultura líquida nas plantas, em casa de vegetação, duas a 120 h antes da inoculação de uredósporos de *Uromyces appendiculatus*. Em condições de campo, durante os anos de 1982 e 1983, observaram uma redução de, no mínimo, 75% na ocorrência da ferrugem com três aplicações semanais. Centurion (1991) obtiveram redução de 80 a 100% no número de pústulas de ferrugem com a aplicação de um isolado de *Bacillus subtilis*, em casa de vegetação. Mizubuti (1992) verificou redução significativa na germinação de uredósporos de *Uromyces appendiculatus* por cinco isolados de *Bacillus subtilis*. Verificou ainda redução do número de pústulas por folha quando os isolados foram aplicados até 48 h antes da inoculação com o patógeno, em casa de vegetação. Melo et al. (1995) constataram que *Bacillus subtilis* foi um potente antagonista contra patógenos de raízes de feijão, como *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii*.

Soja. O nematóide do Cisto (*Heterodera glycines*) é considerada uma das principais doenças da soja e devido a ausência de controle químico eficiente, o controle biológico pode ser uma alternativa. Em estudos sobre a interferência de *Bacillus subtilis* em etapas do ciclo de vida de *Heterodera glycines* foi observado o efeito da bactéria no desenvolvimento do nematóide e na infecção de raízes. A presença de *Bacillus subtilis* reduziu a eclosão de ovos e o tratamento de raiz de soja com a bactéria inibiu a migração de larvas juvenis do nematóide para a planta. Nos ensaios de casa de vegetação, observou-se uma redução de fêmeas na raiz de soja quando o solo e sementes foram tratados previamente com o antagonista (Araújo et al., 2002). *Bacillus pumilus* e *Bacillus subtilis* são reportadas como as mais abundantes bactérias cultivadas na filosfera de plantas de soja (Arias et al., 1999), o que pode indicar o potencial da utilização desses microrganismos para o controle de outras doenças da parte aérea da cultura.

Trigo. O Mal-do-Pé (*Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*) ocorre principalmente na região sul do país, caracterizada pela morte de plantas em reboleiras, cujo controle mais eficiente é a rotação de culturas (Reis & Casa, 2005). Em experimento de campo conduzido por Luz (1993a), *Bacillus subtilis* promoveu 98% de proteção contra a doença.

Tratamento de sementes. Devido à considerável dificuldade na inoculação de bactéria em larga escala no solo em campo, o tratamento de sementes com bactérias tem sido explorado para o controle de doenças. A eficácia de *Bacillus 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 (1993a). Uma formulação pó-molhável, à base de metabólitos e de células de *Bacillus subtilis*, foi testada para o tratamento de sementes de arroz, feijão, soja e trigo, visando a redução dos patógenos associados a estas. O nível de controle foi semelhante aos tratamentos com fungicidas recomendados para o controle de *Rhizoctonia solani*, *Aspergillus* sp. e *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de feijão; *Pyricularia oryzae* e *Rhynchosprium 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*, *Pyricularia oryzae* e *Alternaria tenuis* em sementes de trigo, o tratamento com o produto, embora não tenha se igualado ao tratamento com o fungicida padrão, diferiu estatisticamente do tratamento testemunha (Lazzaretti & Bettioli, 1997).

A inoculação de sementes de soja com *Bacillus subtilis* 0G reduziu a incidência de *Rhizoctonia solani* em 65%, em casa-de-vegetação (Agostini *et al.*, 2007). Segundo Backman (1995), o isolado GB03 de *Bacillus subtilis* foi utilizado para tratamento de mais de 2 milhões de hectares de diversas culturas em 1994. Estima-se que este número, atualmente, seja bem maior, em função do aumento da disponibilidade de produtos no mercado mundial e dos resultados efetivos obtidos com o tratamento de sementes com o antagonista.

Além destes estudos no Brasil, há na literatura uma grande quantidade de relatos da eficiência de *Bacillus subtilis* e *Bacillus pumilus* contra diversos patógenos, especialmente fungos (Tabela 1). No controle de bactérias fitopatogênicas, os principais relatos são contra a podridão negra em crucíferas, causada por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Wulff *et al.* 2002a,b; Massomo *et al.* 2004; Monteiro *et al.* 2005).

Tabela 1. *Bacillus subtilis* e *Bacillus pumilus* no controle de fungos fitopatogênicos.

Cultura	<i>Bacillus subtilis</i>	
	Patógeno	Referência
abacate	<i>Rosellinia necatrix</i>	Cazorla <i>et al.</i> (2007)
	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Demoz & Korsten (2006)
	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	
	<i>Dothiorella aromatica</i>	
	<i>Thyronectria pseudotrichia</i>	
	<i>Phomopsis perseae</i>	
abobrinha	<i>Podosphaera xanthii</i>	Gilardi <i>et al.</i> (2008)
abricó	<i>Moniliana laxa</i>	Altindag (2006)
<i>Acer</i> spp.	<i>Verticillium dahlia</i>	⁽¹⁾ Hali <i>et al.</i> (1986)
alface	<i>Pythium aphanidermatum</i>	Utkhede <i>et al.</i> (2000)
alfafa	<i>Fusarium graminearum</i>	Chan <i>et al.</i> (2003)
algodão	<i>Rhizoctonia solani</i>	⁽¹⁾ Kloepper (1991)
<i>Amaranthus</i>	<i>Choanephora cucurbitarum</i>	Emoghene & Okigbo (2001)
arroz	<i>Aspergillus flavus</i>	Reddy <i>et al.</i> (2009)
batata	<i>Alternaria solani</i>	⁽²⁾ Vasudeva & Chakravarti (1954)
	<i>Macrophomina phaseolina</i>	⁽²⁾ Thirumalachar & O'Brien (1977)
	<i>Botryodiplodia solani-tuberosi</i>	
	<i>Rhizoctonia solani</i>	Brewer & Larkin (2005)
		Schmiedeknecht <i>et al.</i> (1998)
beterraba	<i>Cercospora beticola</i>	Collins & Jacobsen (2003)
	<i>Pythium</i> sp.	Schmidt <i>et al.</i> (2004)
café	<i>Hemileia vastatrix</i>	⁽²⁾ Bettioli <i>et al.</i> (1989)
cebola	<i>Sclerotium cepivorum</i>	⁽¹⁾ Utkhede & Rahe (1983)

Continua

Tabela 1. Continuação

Cultura	<i>Bacillus subtilis</i>	
	Patógeno	Referência
cenoura	<i>Alternaria dauci</i>	Hernandez-Castillo <i>et al.</i> (2006)
cereja	<i>Monilinia fructicola</i>	(¹)Utkhede & Sholberg (1986)
	<i>Alternaria alternata</i>	
citros	<i>Phytophthora citrophthora</i>	(²)Amorim (1997)
	<i>Phytophthora parasitica</i>	
	<i>Penicillium digitatum</i>	Leelasuphakul <i>et al.</i> (2008)
	<i>Penicillium italicum</i>	Obagwu & Korsten (2003)
colza	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Hu <i>et al.</i> (2005)
couve-flor	<i>Pythium ultimum</i>	Abdelzaher (2003)
cravo	<i>Fusarium roseum f.sp. dianthi</i>	(¹)Baker & Aldrich (1970)
feijão	<i>Uromyces phaseoli</i>	(²)Centurion (1991)
fumo	<i>Pythium aphanidermatum</i>	Maketon <i>et al.</i> (2008)
	<i>Cercospora nicotiana</i>	
gerânio	<i>Puccinia pelargonii-zonalis</i>	(¹)Ryther <i>et al.</i> (1989)
grão-de-bico	<i>Fusarium oxysporum f. sp. ciceris</i>	Hervas <i>et al.</i> (1998)
inhame	<i>Botryodiplodia theobromae</i>	Okigbo (2003)
	<i>Fusarium moniliforme</i>	
	<i>Penicillium sclerotigenum</i>	
	<i>Rhizoctonia sp.</i>	
	<i>Fusarium oxysporum</i>	Swain <i>et al.</i> (2008)
	<i>Botryodiplodia theobromae</i>	
lentilha	<i>Fusarium oxysporum f.sp. lentis</i>	El-Hassan & Gowen (2006)
lichia	<i>Peronophythora litchi</i>	Jiang <i>et al.</i> (2001)
	<i>Alternaria alternata</i>	Sivakumar <i>et al.</i> (2007)
	<i>Cladosporium spp.</i>	
maçã	<i>Phytophthora cactorum</i>	(¹)Utkhede & Smith (1991)
		(²)Utkhede (1984)
	<i>Nectria galligena</i>	(²)Swinburne <i>et al.</i> (1975)
	<i>Botrytis cinerea</i>	Toure <i>et al.</i> (2004)
manga	<i>Oidium mangiferae</i>	Nofal & Haggag (2006)
melão	<i>Podosphaera fusca</i>	Romero <i>et al.</i> (2007)
milho	<i>Fusarium graminearum</i>	(²)Chang & Kommedahi (1968)
	<i>Fusarium moniliforme</i>	Bacon <i>et al.</i> (2001)
	<i>Fusarium verticillioides</i>	Cavaglieri <i>et al.</i> (2005)
	<i>Aspergillus flavus</i>	Nesci <i>et al.</i> (2005)
mirtilo	<i>Monilinia vaccinii-corymbosi</i>	Dedej <i>et al.</i> (2004)
		Scherm <i>et al.</i> (2004)
morango	<i>Botrytis cinerea</i>	Helbig & Bochow (2001)
	<i>Podosphaera aphanis</i>	Pertot <i>et al.</i> (2008)

Continua

Tabela 1. Conclusão

Cultura	<i>Bacillus subtilis</i>	
	Patógeno	Referência
mostarda	<i>Alternaria brassicae</i>	Sharma & Sharma (2008)
pepino	<i>Pythium aphanidermatum</i>	Grosch <i>et al.</i> (1999)
	<i>Phytophthora nicotianae</i>	
	<i>Rhizoctonia solani</i>	Kita <i>et al.</i> (2005)
	<i>Phomopsis sp.</i>	
pêra	<i>Monilinia fructicola</i>	⁽¹⁾ Pusey & Wilson (1984)
pêssego	<i>Monilinia fructicola</i>	⁽²⁾ McKeen <i>et al.</i> (1986)
		Fan <i>et al.</i> (2000)
pimentão	<i>Phytophthora capsici</i>	
	<i>Rhizoctonia solani</i>	Ahmed <i>et al.</i> (2003)
	<i>Phytophthora capsici</i>	Lee <i>et al.</i> (2008)
	<i>Pythium aphanidermatum</i>	Nakkeeran <i>et al.</i> (2006)
pinus	<i>Ophiostoma picea</i>	Silva & Morrell (1998)
	<i>Macrophomina phaseolina</i>	Singh <i>et al.</i> (2008)
rosa	<i>Botrytis cinerea</i>	Tatagiba <i>et al.</i> (1998)
soja	<i>Septoria glycines</i>	Mantecon (2008)
solo	<i>Rhizoctonia solani</i>	⁽¹⁾ Olsen & Baker (1968)
sorgo	<i>Pythium ultimum</i>	Idris <i>et al.</i> (2008)
tomate	<i>Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici</i>	Abd-Allah <i>et al.</i> (2007)
	<i>Phytophthora nicotianae</i>	Grosch & Grote (1998)
	<i>Pythium aphanidermatum</i>	Jayaraj <i>et al.</i> (2005)
	<i>Rhizoctonia solani</i>	Kondoh <i>et al.</i> (2000, 2001)
		Montealegre <i>et al.</i> (2003)
trigo		Szczecz & Shoda (2004)
	<i>Bipolaris sorokiana</i>	⁽²⁾ Luz (1994)
uva	<i>Eutypa lata</i>	⁽¹⁾ Ferreira <i>et al.</i> (1991)
	<i>Botrytis cinerea</i>	⁽²⁾ Rodgers (1989)

<i>Bacillus pumilus</i>		
arroz	<i>Rhizoctonia solani</i>	Pengnoo <i>et al.</i> (2000)
beterraba	<i>Cercospora beticola</i>	Bargabus <i>et al.</i> (2004)
citrus	<i>Penicillium digitatum</i>	⁽¹⁾ Huang <i>et al.</i> (1992)
grão-de -bico	<i>Macrophomina phaseolina</i>	Akhtar & Siddiqui (2008)
maçã	<i>Venturia inaequalis</i>	Kucheryava <i>et al.</i> (1999)
morango	<i>Botrytis cinerea</i>	Swadling & Jeffries (1998)
trigo	<i>Puccinia spp.</i>	⁽¹⁾ Morgan (1963)
	<i>Gaeumannomyces graminis var. tritici</i>	⁽²⁾ Capper & Campbell (1986)

⁽¹⁾Referências citadas por Edwards *et al.* (1994). ⁽²⁾Referências citadas por Melo (1998).

No levantamento de informações sobre as propriedades fungicidas e protetoras dessas espécies, foi observado que além de biocontroladores de fitopatógenos, *Bacillus* também são considerados promotores de crescimento de plantas. No Brasil, essa avaliação foi feita para plântulas de citros (Amorim, 2002), pepino (Melo & Valarini, 1995), alface (Correa & Bettiol, 2007) e trigo (Luz, 1993), entre outras. Essa característica agrega vantagens na utilização das bactérias na agricultura.

Um ponto importante a ser analisado como determinante no uso do controle biológico é a persistência dos microrganismos controladores e reaplicações. Collins *et al.* (2003), considerando a dificuldade em se desenvolver um biofungicida para doenças foliares devido às influências ambientais e com base nas hipóteses de colonização com um isolado de *Bacillus subtilis*, concluíram que, apesar de depender de nutrientes, o crescimento da colônia de bactérias não é influenciado pela quantidade de nutrientes disponível e também não depende dela para sua agregação.

Apesar de resultados positivos quanto ao antagonismo de *Bacillus* aos fungos fitopatogênicos, o controle das doenças não é satisfatório para todos os patossistemas e muitos devem ser testados no campo. Resultados inconsistentes quanto à eficiência do controle podem ser testados em um sistema de manejo integrado, utilizando mistura com fungicidas químicos ou agentes de controle biológico. O sinergismo pode ser mais eficiente e persistente que o controle realizado apenas com as bactérias (Shoda, 2000).

As interações entre os microrganismos e os fatores bióticos e abióticos influenciam na atuação e atividade de *Bacillus*. Respostas desiguais entre os tratamentos são prováveis, o que reflete a interferência dessas variáveis. A segurança e a eficácia da sua utilização serão determinadas em grande parte pelo sucesso ecológico das estirpes introduzidas no ambiente (McSpadden & Gardener, 2004). Por isso, são necessários estudos específicos nas condições brasileiras para garantia de eficiência dos isolados do antagonista.

A utilização de agentes de controle biológico deve estar relacionada com o manejo integrado, para que se tenha sucesso. Os produtos comerciais à base de *Bacillus*, podem servir como uma ferramenta de controle de fitopatógenos, em rotação com outros fungicidas químicos em cultivos convencionais. São também interessantes alternativas de controle de doenças em cultivos orgânicos, onde a oferta de produtos é escassa. Para o controle de fungos fitopatógenos, fungicidas são utilizados, não raro excessivamente, o que leva a problemas ambientais, econômicos e de saúde humana. Por isso, é importante adotar medidas alternativas de manejo (Maffia & Mizubuti, 2005).

Considerando a quantidade de ingrediente ativo, as culturas em destaque quanto ao uso de fungicidas químicos no Brasil são o café (3.680 t), a batata-inglesa (2.797 t), a soja (1.626 t) e o tomate envarado (1.125 t) (Sindag, 2000, disponível em Campanhola & Bettiol, 2003). Para essas, principalmente, e para outras culturas com uso intensivo de agroquímicos, verifica-se a necessidade de introdução de formas alternativas de controle de doenças, incluindo o controle biológico. Jacobsen *et al.* (2004) avaliaram a importância da utilização de *Bacillus*

spp. em manejo integrado de doenças, inclusive no manejo de resistência. Os autores enfatizam a necessidade da avaliação desses organismos em conjunto com outros métodos de controle, como cultivares resistentes, controle cultural, redução do uso de agrotóxicos, e com outros agentes de biocontrole.

Produtos à Base de *Bacillus pumilus* e *Bacillus subtilis* no Brasil

Como consequência do crescimento do mercado para bioprodutos, tem-se verificado o surgimento de grande número de pequenas empresas desenvolvendo esforços para colocar esses agentes no mercado (Morandi *et al.*, 2005). Diante desse cenário, é imprescindível que se ampliem e aperfeiçoem os estudos nessa área, visando dar continuidade a esse crescimento com segurança, por meio da produção e comercialização de produtos de qualidade. Froyd (1997), em seus comentários sobre os investimentos em indústrias de agroquímicos em pesquisas e exploração de mercados na área de biopesticidas, incentiva o ingresso neste segmento, baseado nas vantagens de registro de produtos (menos custoso e trabalhoso), desenvolvimento do produto (mais rápido) e de ampliação de nichos de agricultores atingidos pela empresa.

No Brasil existem alguns produtos à base de *Bacillus subtilis* sendo comercializados para fins de controle de doenças de plantas ou como condicionadores de solo, entretanto, sem registro no Mapa.

Os produtos Serenade® (*Bacillus subtilis* isolado QST 713) e Sonata® (*Bacillus pumilus* isolado QST2808), produzidos pela Agrquest Inc., ambos registrados no “*Environmental Protection Agency*” (EPA, 2008) dos Estados Unidos da América estão sendo avaliados quanto à viabilidade de introdução no país. Os produtos possuem certificados orgânicos aprovados e estão em processo de registro nos órgãos federais.

Serenade® está registrado no Chile, Estados Unidos da América, México, Nova Zelândia, Porto Rico, Costa Rica, Japão, Israel, Filipinas, Guatemala, Honduras, Suíça, Argentina, França, Itália, Coréia do Sul, Equador e Peru e em fase de registro na Colômbia, Canadá, Espanha, Grécia, Alemanha, África do Sul, Reino Unido e Brasil. O produto é recomendado para mancha bacteriana, oídio e pinta-preta em tomate e pimentão; mofo-cinzento, oídio e podridão ácida em uva; oídio e crestamento gomoso em cucurbitáceas; Sigatoka negra em banana; antracnose em manga; podridão de *Sclerotinia* em alface; podridão de *Erwinia* em maçã e pêra e mofo-branco em feijão (Edgecomb & Manker, 2007).

Sonata® é registrado nos EUA e está em processo de registro na Coréia do Sul, México e Brasil. (Edgecomb & Manker, 2007). As culturas e doenças para as quais o produto é recomendado são: oídio em tomate, pimentão, uva, cucurbitáceas, morango, alface, maçã e pêra; pinta-preta e requeima em tomate e míldio em cucurbitáceas e alface.

Aspectos Econômicos do Uso de *Bacillus* no Brasil

Para apoiar as decisões sobre a utilização dos biofungicidas em lavouras brasileiras é indispensável analisar os aspectos econômicos. Na Tabela 2 são apresentados os dados agrícolas brasileiros disponíveis para as culturas onde os produtos comerciais à base de *Bacillus* poderão ser utilizados.

Tabela 2. Produção, área e custos com fungicidas em lavouras brasileiras.

Cultura	Produção (mil t) ⁽¹⁾	Área (mil ha) ⁽¹⁾	Gastos com agrotóxicos (Milhões US\$) ⁽³⁾
Amendoim	226	102	12,3
Arroz	11.045	2.962	121,9
Banana	7.021	498	10,3
Batata-inglesa	3.334	143	86,1
Café	2.131	2.318	233,5
Feijão	3.881	4.263	93,1
Citros	17.892	803	163,7
Maçã	949	36	30,8
Manga	842,3	67,6	*
Melão	352,3	16,9	9,8
Soja	56.700	20.700	2.286,0
Tomate	3.299	56	74,2
Trigo	3.464	1.754	126,7
Uva	1.297	75	21,1
Grãos ⁽²⁾	126.476	45.531	13,6

⁽¹⁾Área colhida. Fonte: IBGE – Produção Agrícola Municipal e Levantamento Sistemático da Produção Agrícola (fevereiro/07) – disponível em www.agricultura.gov.br. Para manga e melão, os dados se referem à área plantada (Fonte: Anuário Brasileiro da Fruticultura 2004). ⁽²⁾Produtos: Algodão, Amendoim, Arroz, Aveia, Centeio, Cevada, Feijão, Girassol, Mamona, Milho, Soja, Sorgo, Trigo e Triticale. Fonte: Conab – Consolidado e Acompanhamento da Safra 2006/2007, 5º Levantamento (www.conab.gov.br) – disponível em www.agricultura.gov.br. ⁽³⁾Fonte: Sindag, 2008. * Dado não disponível.

Em 2007, segundo dados do Sindag (2008), as vendas de fungicidas totalizaram R\$993,8 milhões, correspondente a 21,1% do total de defensivos agrícolas. A redução do uso de fungicidas sintéticos e o aumento do uso de produtos biológicos na prática agrícola só será viável se este último for eficiente e um custo que compense o seu uso.

A seguir é apresentada uma simulação feita para a ferrugem da soja, considerando-se uma redução de 50% no uso de fungicidas, com a aplicação de *Bacillus*. Dados experimentais preliminares (dados não publicados) indicam que esta redução do uso de fungicidas associado com a aplicação de um isolado de *Bacillus pumilus* promoveu controle satisfatório da doença.

O custo médio para o controle da ferrugem da soja com fungicidas, considerando quatro aplicações foi estimado em R\$112,36/ha, podendo ser maior ou menor em função dos fungicidas e equipamentos utilizados (dados calculados a partir de estimativa publicada em 27/11/2008 por Kadajah Suleiman, MTb RJ 22729JP - Embrapa Agropecuária Oeste, Dourados, MS e disponível em <http://www.embrapa.br/embrapa/imprensa/noticias/2008/novembro/4a-semana/estimativas-apontam-reducao-de-custos-para-controlar-ferrugem-da-soja>).

Considerando 50% de redução do uso de fungicidas, e mantendo-se o custo médio por ha e eficiência semelhante, verifica-se que o custo médio de aplicação do controle biológico não deve exceder, em valores de hoje, a R\$56,18. Assim, para ser economicamente viável, o custo de um produto biológico contendo uma concentração mínima de 1×10^8 UFC/ml com 85% de viabilidade e aplicado na proporção de 2 l/ha, em duas aplicações por safra, não deve exceder a R\$14,00/l.

É importante salientar que nesta simulação consideraram-se apenas os custos de substituição de produtos, mantendo-se as demais características de aplicação sem alteração. Também não foram considerados os aspectos não diretamente mensuráveis, como a redução da contaminação ambiental por resíduos dos fungicidas.

Considerações Finais

Apesar da maioria dos estudos serem *in vitro* e em casa de vegetação, os resultados obtidos com *Bacillus subtilis* e *Bacillus pumilus* são promissores. Também a eficácia e utilização desses organismos no controle de fitopatógenos nas condições de cultivo são promissoras. Assim, há necessidade de testes em áreas agrícolas, para avaliação do seu potencial de controle de doenças em lavouras comerciais nas condições brasileiras e para refinamento das recomendações de manejo.

Com base nas informações descritas, as culturas e doenças promissoras, que inicialmente merecem ser melhor analisadas para desenvolvimento de produtos no Brasil são: soja (ferrugem asiática), tomate (mancha bacteriana e pinta-preta), café (ferrugem), cucurbitáceas (míldios e oídios), citros (podridão floral e podridão radicular), crucíferas (podridão negra) e para o tratamento de sementes em geral.

Com o desenvolvimento de novas pesquisas científicas nesse segmento e ao longo do desenvolvimento técnico-comercial, os produtos deverão ser testados também em outras culturas como: alface, maçã, banana, morango, uva, batata, arroz e trigo.

A partir do levantamento apresentado e da análise de eficiência e vantagens, pode-se concluir que o uso de *Bacillus* é promissor, tanto devido ao desempenho das bactérias em controlar fitopatógenos quanto à sua aceitação pelos agricultores brasileiros que procuram novas alternativas para o manejo de doenças, mais seguras ao ambiente e à saúde humana.

Referências

- Abd-Allah, E.F.; Ezzat, S.M. & Tohamy, M.R. *Bacillus subtilis* as an alternative biologically based strategy for controlling Fusarium wilt disease in tomato: A histological study. *Phytoparasitica* 35: 474-478. 2007.
- Abdelzaher, H.M.A. Biological control of root rot of cauliflower (caused by *Pythium ultimum* var. *ultimum*) using selected antagonistic rhizospheric strains of *Bacillus subtilis*. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 31: 209-220. 2003.
- Agostini, P.; Lotto, M.C.; Valarini, P.J. & Melo, I.S. Avaliação do potencial de *Bacillus subtilis* na proteção e no desenvolvimento da soja. Resumos, IX. Reunião Brasileira sobre Controle Biológico de Doenças em Plantas, Campinas, SP. 2007. (Resumo).
- AGROFIT. Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 15 jan. 2009.
- Ahmed, A.S.; Ezziyyani, M.; Sanchez, C. P. & Candela, M. E. Effect of chitin on biological control activity of *Bacillus* spp. and *Trichoderma harzianum* against root rot disease in pepper (*Capsicum annuum*) plants. *European Journal of Plant Pathology* 109: 633-637. 2003.
- Akhtar, M. S. & Siddiqui, Z.A. *Glomus intraradices*, *Pseudomonas alcaligenes*, and *Bacillus pumilus*: effective agents for the control of root-rot disease complex of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Journal of General Plant Pathology* 74: 53-60. 2008.
- Altindag, M.; Sahin, M.; Esitken, A.; Ercisli, S.; Guleryuz, M.; Donmez, M. F. & Sahin, F. Biological control of brown rot (*Moniliana laxa* Ehr.) on apricot (*Prunus armeniaca* L. cv. Hacihaliloglu) by *Bacillus*, *Burkholderia*, and *Pseudomonas* application under in vitro and in vivo conditions. *Biological Control* 38: 369-372. 2006.
- Amorim, E. P. da R. & Melo, I. S. Ação antagônica de rizobactérias contra *Phytophthora parasitica* e *P. citrophthora*. *Revista Brasileira de Fruticultura* 24: 565-568. 2002.
- Anuário Brasileiro da Fruticultura 2004. Santa Cruz do Sul. Editora Gazeta. 2004.
- Araújo, F.F.; Silva, J.F.V. & Araújo, A.S.F. Influência de *Bacillus subtilis* na eclosão, orientação e infecção de *Heterodera glycines* em soja. *Ciência Rural* 32: 197-202. 2002.
- Arias, R. S.; Sagardoy, M. A. & Van Vuurde, J. W. L. Spatiotemporal distribution of naturally occurring *Bacillus* spp. and other bacteria on the phylloplane of soybean under field conditions. *Journal of Basic Microbiology* 39: 283-292. 1999.
- Assis, S.M.P.; Mariano, R.L.R.; Michereff, S.J. & Coelho, R.S.B. Biocontrol of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* on kale with *Bacillus* spp. and endophytic bacteria. In: Wenhua, T.; Cook, R.J. & Rovira, A. (Eds.) *Advances in Biological Control of Plant Diseases*. Beijing. China Agricultural University Press. 1996. pp. 347-353.
- Assis, S.M.P.; Mariano, R.L.R.; Michereff, S.J.; Silva, G. & Maranhão, E.A.A. Antagonism of *Bacillus* spp. to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* on cabbage phylloplane in field. In: Ogoshi, A.; Kobayashi, Y.; Homma, Y.; Kodama, F.; Kondo, N. & Akino, S. (Eds.) *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: Present Status and Future Prospects*. Sapporo. University of Hokaido/OECD. 1997. pp. 345-348.
- Assis, S.M.P.; Mariano, R.L.R.; Silva-Hanlin, D.M.W. & Duarte, V. Mancha-aquosa do melão causada por *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, no Estado do Rio Grande do Norte. *Fitopatologia Brasileira* 24: 191. 1999.
- Backman, P.A. Development and commercialization of *Bacillus subtilis* (GBO3) as a rhizosphere inoculant. In: Abstracts, 13. International Plant Protection Congress, 13. The Hague. 1995. Abstract 27.
- Bacon, C. W.; Yates, I.E.; Hinton, D. M. & Meredith, F. Biological control of *Fusarium moniliforme* in maize. *Environmental Health Perspectives* 109: 325-332. 2001.
- Bargabus, R. L.; Zidack, N.K.; Sherwood, J. E. & Jacobsen, B. J. Screening for the identification of potential biological control agents that induce systemic acquired resistance in sugar beet. *Biological Control* 30: 342-350. 2004.
- Bedendo, I.P. & Prabhu, A.S. Doenças do arroz. In: Kimati, H.; Amorim, L.; Bergamin Filho, A. & Camargo, L.E.A. (Eds.) *Manual de fitopatologia*. 4. Ed. São Paulo. Agronômica Ceres. 2005. pp. 79-90.
- Bettiol, W. & Ghini, R. Controle biológico. In: Bergamin Filho, A.; Kimati, H. & Amorim, L. (Eds.) *Manual de fitopatologia*. Vol. 1. Princípios e conceitos, 3. Ed. São Paulo. Agronômica Ceres. 1995. pp. 717-728.

- Bettiol, W. & Kimati, H. Seleção de microrganismos antagonísticos a *Pyricularia oryzae* Cav. para o controle do brusone do arroz (*Oryza sativa* L.). *Summa Phytopathologica* 15: 257-266. 1989.
- Bianchini, A.; Marigoni, A.C. & Carneiro, S.M.T.P.G. Doenças do feijoeiro. In: Kimati, H.; Amorim, L.; Bergamin Filho, A. & Camargo, L.E.A. (Eds.) Manual de fitopatologia. 4. Ed. São Paulo. Agronômica Ceres. 2005. pp. 333-350.
- Brewer, M. T. & Larkin, R.P. Efficacy of several potential biocontrol organisms against *Rhizoctonia solani* on potato. *Crop Protection* 24: 939-950. 2005.
- Campanhola, C. & Bettiol, W. Panorama sobre o uso de agrotóxicos no Brasil. In: Campanhola, C. & Bettiol, W. (Eds.) Métodos Alternativos de Controle Fitossanitário. Jaguariúna. Embrapa Meio Ambiente. 2003. pp. 13-52.
- Cavaglieri, L.; Orlando, J.; Rodriguez, M. I.; Chulze, S. & Etcheverry, M. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against *Fusarium verticillioides* in vitro and at the maize root level. *Research in Microbiology* 156: 748-754. 2005.
- Cazorla, F. M.; Romero, D.; Perez-Garcia, A.; Lugtenberg, B. J. J.; Vicente, A. & Bloemberg, G. Isolation and characterization of antagonistic *Bacillus subtilis* strains from the avocado rhizoplane displaying biocontrol activity. *Journal of Applied Microbiology* 103: 1950-1959. 2007.
- Chan, Y. K.; McCormick, W.A. & Seifert, K. A. Characterization of an antifungal soil bacterium and its antagonistic activities against *Fusarium* species. *Canadian Journal of Microbiology* 49: 253-262. 2003.
- Collins, D. P. & Jacobsen, B.J. Optimizing a *Bacillus subtilis* isolate for biological control of sugar beet cercospora leaf spot. *Biological Control* 26: 153-161. 2003.
- Collins, D.P.; Jacobsen, B.J. & Maxwell, B. Spatial and temporal population dynamics of a phyllosphere colonizing *Bacillus subtilis* biological control agent of sugar beet cercospora leaf spot. *Biological Control* 26: 224-232. 2003.
- Coping, L.G. The Manual of Biocontrol Agents - A World Compendium. 3. Ed. Croydon. BCPC. 2004.
- Correa, E.B. & Bettiol, W. Controle da podridão de raiz e promoção de crescimento em alface hidropônica com bactérias Gram positivas. Anais, IX. Reunião Brasileira sobre Controle Biológico de Doenças em Plantas, Campinas, SP. 2007. (Resumo).
- Costa, M.J.N.; Zambolim, L. & Rodrigues, F.A. Avaliação de produtos alternativos no controle da ferrugem do cafeeiro. *Fitopatologia Brasileira* 32: 150-155. 2007.
- Dedej, S.; Delaphane, K.S. & Scherm, H. Effectiveness of honey bees in delivering the biocontrol agent *Bacillus subtilis* to blueberry flowers to suppress mummy berry disease. *Biological Control* 31: 422-427. 2004.
- Demoz, B. T. & Korsten, L. *Bacillus subtilis* attachment, colonization, and survival on avocado flowers and its mode of action on stem-end rot pathogens. *Biological Control* 37: 68-74. 2006.
- Edgecomb, D.W. & Manker, D.C. Serenade (*Bacillus subtilis* strain QST 713) and Sonata (*Bacillus pumilus* strain QST 2808), new biological tools for integrated and organic disease control programs. Anais, IX. Reunião Brasileira sobre Controle Biológico de Doenças em Plantas, Campinas SP. 2007. (Resumo).
- Edwards, S.G.; McKay, T. & Seddon, B. Interaction of *Bacillus* species with phytopathogenic fungi - Methods of analysis and manipulation for biocontrol purposes. In: Blakeman, J.P. & Williamson, B. (Ed.) Ecology of Plant Pathogens. Wallingford. CAB International. 1994. pp. 101-118.
- El-Hassan, S.A. & Gowen, S.R. Formulation and delivery of the bacterial antagonist *Bacillus subtilis* for management of lentil vascular wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis*. *Journal of Phytopathology* 154: 148-155. 2006.
- Emoghene, A.O. & Okigbo, R.N. Phylloplane microbiota of *Amaranthus hybridus* and their effect on shoot disease caused by *Choanephora cucurbitarum*. *Tropical Agriculture* 78: 90-94. 2001.
- EPA - Environmental Protection Agency. Disponível em: <<http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides.htm>> . Acesso em: 15 jan. 2008.
- Fan, Q.; Tian, S.P.; Li, Y. X.; Xu, Y. & Wang, Y. Biological control of postharvest brown rot in peach and nectarine fruits by *Bacillus subtilis* (B-912). *Acta Botanica Sinica* 42: 1137-1143. 2000.

- Feichtenberger, E.; Bassanezi, R.B.; Spósito, M.B. & Belasque Jr., J. Doenças dos citros. In: Kimati, H.; Amorim, L.; Bergamin Filho, A. & Camargo, L.E.A. (Eds.) Manual de Fitopatologia. 4. Ed. São Paulo. Agronômica Ceres. 2005. pp. 239-270.
- Ferreira, J.H.S.; Matthee, F.N. & Thomas, A.C. Biological control of *Eutypa lata* on grapevine by an antagonistic strain of *Bacillus subtilis*. *Phytopathology* 81: 283-287. 1991.
- Froyd, J.D. Can synthetic pesticides be replaced with biologically-based alternatives? - an industry perspective. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 19: 192-195. 1997.
- Gilardi, G.; Manker, D.C.; Garibaldi, A. & Gullino, M. L. Efficacy of the biocontrol agents *Bacillus subtilis* and *Ampelomyces quisqualis* applied in combination with fungicides against powdery mildew of zucchini. *Journal of Plant Diseases and Protection* 115: 208-213. 2008.
- Grosch, R. & Grote, D. Suppression of *Phytophthora nicotianae* by application of *Bacillus subtilis* in closed soilless culture of tomato plants. *Gartenbauwissenschaft* 63: 103-109. 1998.
- Grosch, R.; Junge, H.; Krebs, B. & Bochow, H. Use of *Bacillus subtilis* as a biocontrol agent. III. Influence of *Bacillus subtilis* on fungal root diseases and on yield in soilless culture. *Journal of Plant Diseases and Protection* 106: 568-580. 1999.
- Helbig, J. & Bochow, H. Effectiveness of *Bacillus subtilis* (isolate 25021) in controlling *Botrytis cinerea* in strawberry. *Journal of Plant Diseases and Protection* 108: 545-559. 2001.
- Hernandez-Castillo, F.; Aquirre-Aguirre, A.; Lira-Saldivar, R.; Guerrero-Rodriguez, E. & Gallegos-Morales, G. Biological efficiency of organic biological and chemical products against *Alternaria dauci* Kuhn and its effects on carrot crop. *Phyton-International Journal of Experimental Botany* 75: 91-101. 2006.
- Hervas, A.; Landa, B.; Datnoff, L. E. & Jimenez-Diaz, R. M. Effects of commercial and indigenous microorganisms on *Fusarium* wilt development in chickpea. *Biological Control* 13: 166-176. 1998.
- Hu, X. J.; Roberts, D.P.; Jiang, M. L. & Zhang, Y. B. Decreased incidence of disease caused by *Sclerotinia sclerotiorum* and improved plant vigor of oilseed rape with *Bacillus subtilis* Tu-100. *Applied Microbiology and Biotechnology* 68: 802-807. 2005.
- Huang, H.H.C. Biological control of soilborne diseases in Canada. Proceedings, International Symposium on Clean Agriculture, Sapporo. 1997. pp. 52-59.
- Idris, H. A.; Labuschagne, N. & Korsten, L. Suppression of *Pythium ultimum* root rot of sorghum by rhizobacterial isolates from Ethiopia and South Africa. *Biological Control* 45: 72-84. 2008.
- Jacobsen, B. J.; Zidack, N. K. & Larson, B. J. The role of *Bacillus*-based biological control agents in integrated pest management systems: Plant diseases. *Phytopathology* 94: 1272-1275. 2004.
- Jayaraj, J.; Radhakrishnan, N.V.; Kannan, R.; Sakthivel, K.; Suganya, D.; Venkatesan, S. & Velazhahan, R. Development of new formulations of *Bacillus subtilis* for management of tomato damping-off caused by *Pythium aphanidermatum*. *Biocontrol Science and Technology* 15: 55-65. 2005.
- Jiang, Y. M.; Zhu, X.R. & Li, Y. B. Postharvest control of litchi fruit rot by *Bacillus subtilis*. *Food Science and Technology* 34: 430-436. 2001.
- 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* 18: 393-403. 1990.
- Kalita, P.; Bora, L.C. & Bhagabati, K.N. Phylloplane microflora of citrus and their role in management of citrus canker. *Indian Phytopathology* 49: 234-237. 1996.
- Kita, N.; Ohya, T.; Uekusa, H.; Nomura, K.; Manago, M. & Shoda, M. Biological control of damping-off of tomato seedlings and cucumber *Phomopsis* root rot by *Bacillus subtilis* RB14-C. *JARQ-Japan Agricultural Research Quarterly* 39: 109-114. 2005.
- Kondoh, M.; Hirai, M. & Shoda, M. Co-utilization of *Bacillus subtilis* and Flutolanil in controlling damping-off of tomato caused by *Rhizoctonia solani*. *Biotechnology Letters* 22: 1693-1697. 2000.
- Kondoh, M.; Hirai, M. & Shoda, M. Integrated biological and chemical control of damping-off caused by *Rhizoctonia solani* using *Bacillus subtilis* RB14-C and flutolanil. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 91: 173-177. 2001.
- Kucheryava, N.; Fiss, R.; Auling, G. & Kroppenstedt, R. M. Isolation and characterization of epiphytic bacteria from the phyllosphere of apple, antagonistic in vitro to *Venturia inaequalis*, the causal agent of apple scab. *Systematic and Applied Microbiology* 22: 472-478. 1999.
- Kupper, K.C.; Gimenes-Fernandes, N. & Goes, A. de. Controle biológico de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. *Fitopatologia Brasileira* 28: 251-257. 2003.

- Kurozawa, C.; Pavan, M.A. & Rezende, J.A.M. Doenças das cucurbitáceas. In: Kimati, H.; Amorim, L.; Bergamin Filho, A. & Camargo, L.E.A. (Eds.) Manual de Fitopatologia. 4. Ed. São Paulo. Agronômica Ceres. 2005. pp. 293-302.
- 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.
- Lazzaretti, E. Controle de fungos transportados por sementes de trigo com *Bacillus subtilis*. Dissertação de Mestrado. Piracicaba SP. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo. 1993.
- Lee, K. J.; Kamala-Kannan, S.; Sub, H. S.; Seong, C. K. & Lee, G. W. Biological control of *Phytophthora* blight in red pepper (*Capsicum annuum* L.) using *Bacillus subtilis*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 24: 1139-1145. 2008.
- Leelasuphakul, W.; Hemmanee, P. & Chuenchitt, S. 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* 48: 113-121. 2008.
- Lopes, R.B. A indústria no controle biológico: produção e comercialização de microorganismos no Brasil. Anais, IX. Reunião Brasileira sobre Controle Biológico de Doenças em Plantas, Campinas SP. 2007. (Resumo).
- Luna, C.L.; Mariano, R.L.R. & Souto-Maior, A.M. Production of a biocontrol agent for crucifers black rot disease. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 19: 133-140. 2002.
- Luz, W. C. Microbiolização de sementes para o controle de doenças de plantas. *Revisão Anual de Patologia de Plantas* 1: 33-77. 1993b.
- Luz, W.C. Controle microbiológico do mal-do-pé do trigo pelo tratamento de sementes. *Fitopatologia Brasileira* 13: 82-85. 1993a.
- Maffia, L.A. & Mizubuti, E.S.G. Controle alternativo de fungos. In: Venzon, M.; Paula Júnior, T.J. & Pallini, A. (Coords.) Controle Alternativo de Pragas e Doenças. Viçosa. EPAMIG/CTZM/UFV. 2005. pp. 269-294.
- Maketon, M.; Apisitsantikul, J. & Siriraweeikul, C. Greenhouse evaluation of *Bacillus subtilis* AP-01 and *Trichoderma harzianum* AP-001 in controlling tobacco diseases. *Brazilian Journal of Microbiology* 39: 296-300. 2008.
- Mantecon, J. D. Efficacy of chemical and biological strategies for controlling the soybean brown spot (*Septoria glycines*). *Ciencia y Investigación Agraria* 35: 211-214. 2008.
- Maringoni, A.C. Doenças das crucíferas. In: Kimati, H.; Amorim, L.; Bergamin Filho, A. & Camargo, L.E.A. (Eds.) Manual de Fitopatologia. 4. Ed. São Paulo. Agronômica Ceres. 2005. pp. 285-292.
- Massomo, S. M. S.; Mortensen, C. N.; Mabagala, R. B.; Newman, M. A. & Hockenhull, J. Biological control of black rot (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) of cabbage in Tanzania with *Bacillus* strains. *Journal of Phytopathology* 152: 98-105. 2004.
- McKeen, C.D.; Reilly, C.C. & Pusey, P.L. Production and partial characterization of antifungal substances antagonistic to *Monilinia fructicola* from *Bacillus subtilis*. *Phytopathology* 76: 136-139. 1986.
- McSpadden Gardener, B. B. Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. in agricultural systems. *Phytopathology* 94: 1252-1258. 2004.
- Melo, I. S.; Valarini, P.J. Potencial de rizobactérias no controle de *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. em pepino (*Cucumis sativum* L.). *Scientia Agricola* 52: 326-330, 1995.
- Melo, I.S. Agentes microbianos no controle de fungos fitopatogênicos. In: Melo, I.S. & Azevedo, J.L. (Eds.) Controle Biológico. Vol.1. Jaguariúna. SP. EMBRAPA. 1998. pp. 17-67.
- Melo, I.S.; Valarini, P.J. & Faull, J.L. Controle biológico de *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* por *Bacillus subtilis* isolado da rizosfera do feijoeiro. *Fitopatologia Brasileira* 20: 342. 1995.
- 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* 25: 219-226. 1974.
- Mizubuti, E. S. G. Controle da ferrugem do feijoeiro com *Bacillus subtilis*. Dissertação de Mestrado. Viçosa MG. Universidade Federal de Viçosa. 1992.
- Montealegre, J. R.; Reyes, R.; Perez, L. M.; Herrera, R.; Silva, P. & Besoain, X. Selection of bioantagonistic bacteria to be used in biological control of *Rhizoctonia solani* in tomato. *Electronic Journal of Biotechnology* 6: 115-127. 2003.

- Monteiro, L.; Mariano R. D. R. & Souto-Maior, A. M. Antagonism of *Bacillus* spp. against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 48: 23-29. 2005.
- Morandi, M. A. B.; Bettiol, W. & Ghini, R. Situação do controle biológico de doenças de plantas no Brasil. In: Venzon, M.; Paula Júnior, T.J. & Pallini, A. (Coords.) *Controle Alternativo de Pragas e Doenças*. Viçosa. EPAMIG/CTZM/UFV. 2005. pp. 247-268.
- Nakkeeran, S.; Kavitha, K.; Chandrasekar, G.; Renukadevi, P. & Fernando, W. G. D. Induction of plant defence compounds by *Pseudomonas chlororaphis* PA23 and *Bacillus subtilis* BSCBE4 in controlling damping-off of hot pepper caused by *Pythium aphanidermatum*. *Biocontrol Science and Technology* 16: 403-416. 2006.
- Nesci, A. V.; Bluma, R.V. & Etcheverry, M. G. In vitro selection of maize rhizobacteria to study potential biological control of *Aspergillus* section *Flavi* and aflatoxin production. *European Journal of Plant Pathology* 113: 159-171. 2005.
- Nofal, M. A. & Haggag, W.M. Integrated management of powdery mildew of mango in Egypt. *Crop Protection* 25: 480-486. 2006.
- Obagwu, J. & Korsten, L. Integrated control of citrus green and blue molds using *Bacillus subtilis* in combination with sodium bicarbonate or hot water. *Postharvest Biology and Technology* 28: 187-194. 2003.
- Okigbo, R. N. Mycoflora of tuber surface of white yam (*Dioscorea rotundata* poir) and postharvest control of pathogens with *Bacillus subtilis*. *Mycopathologia* 156: 81-85. 2003.
- Oliveira, A.; Santos, M.H.M.; Silveira, E.B.; Gomes, A.M.A. & Mariano, R.L.R. Biocontrole da mancha-aquosa do melão pelo tratamento de sementes com bactérias epifíticas e endofíticas. *Horticultura Brasileira* 24: 373-377. 2006.
- Pengnoo, A.; Kusongwiriyawong, C.; Nilratana, L. & Kanjanamaneesathian, M. Greenhouse and field trials of the bacterial antagonists in pellet formulations to suppress sheath blight of rice caused by *Rhizoctonia solani*. *Biocontrol* 45: 245-256. 2000.
- Pertot, I.; Zasso, R.; Amsalem, L.; Baldessari, M.; Angeli, G. & Elad, Y. Integrating biocontrol agents in strawberry powdery mildew control strategies in high tunnel growing systems. *Crop Protection* 27: 622-631. 2008.
- Pomella, A.W.V. A utilização do controle biológico para grandes culturas - a experiência do grupo Sementes Farroupilha. *Anais, IX. Reunião Brasileira sobre Controle Biológico de Doenças em Plantas*, Campinas SP. 2007. (Resumo).
- Pusey, P.L. & Wilson, C.L. Postharvest biological control of stone fruit brown rot by *Bacillus subtilis*. *Plant Disease* 68: 753-756. 1984.
- Reddy, K. R.; Reddy, C. S. & Muralidharan, K. Potential of botanicals and biocontrol agents on growth and aflatoxin production by *Aspergillus flavus* infecting rice grains. *Food Control* 20: 173-178. 2009.
- 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* 21: 373-378. 1989.
- Reis, E.M. & Casa, R.T. Doenças do trigo. In: Kimati, H.; Amorim, L.; Bergamin Filho, A. & Camargo, L.E.A. (Eds.) *Manual de Fitopatologia*. 4. Ed. São Paulo. Agronômica Ceres. 2005. pp. 631-638.
- Romero, D.; de Vicente, A.; Zerriouh, H.; Cazorla, F. M.; Fernandez-Ortuno, D.; Tores, J. A. & Perez-Garcia, A. Evaluation of biological control agents for managing cucurbit powdery mildew on greenhouse-grown melon. *Plant Pathology* 56: 976-986. 2007.
- Sales Júnior, R. & Menezes, J.B. Mapeamento das Doenças Fúngicas, Bacterianas e Viróticas do Cultivo do Melão no Estado do RN. Mossoró. UFERSA. 2001. (Relatório Técnico).
- Santos, E.R.; Gouveia, E.R.; Mariano, R.L.R. & Souto-Maior, A.M. Biocontrol of bacterial fruit blotch of melon by bioactive compounds produced by *Bacillus* spp. *Summa Phytopathologica* 32: 376-378. 2006.
- Scherm, H.; Ngugi, H.K.; Savelle, A. T. & Edwards, J. R. Biological control of infection of blueberry flowers caused by *Monilinia vaccinii-corymbosi*. *Biological Control* 29: 199-206. 2004.
- Schmidt, C. S.; Agostini, F.; Simon, A. M.; Whyte, J.; Townend, J.; Leifert, C.; Killham, K. & Mullins, C. Influence of soil type and pH on the colonisation of sugar beet seedlings by antagonistic *Pseudomonas* and *Bacillus* strains, and on their control of *Pythium* damping-off. *European Journal of Plant Pathology* 110: 1025-1046. 2004.

- Schmiedeknecht, G.; Bochow, H. & Junge, H. Use of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent. II. Biological control of potato diseases. *Journal of Plant Diseases and Protection* 105: 376-386. 1998.
- Sharma, N. & Sharma, S. Control of foliar diseases of mustard by *Bacillus* from reclaimed soil. *Microbiological Research* 163: 408-413. 2008.
- Shoda, M. Bacterial control of plant diseases. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 89: 515-521. 2000.
- Silva, A. A. & Morrell, J.J. Inhibition of wood-staining *Ophiostoma picea* by *Bacillus subtilis* on *Pinus ponderosa* sapwood. *Material Und Organismen* 32: 241-252. 1998.
- Sinclair, J.B. & Hartman, G.L. Soybean rust. In: Hartman, G.L.; Sinclair, J.B. & Rupe, J.C. (Eds.) *Compendium of Soybean Diseases*. 4. Ed. St. Paul. American Phytopathological Society. 1999. pp. 25-26.
- SINDAG - Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola. Disponível em: <<http://www.sindag.com.br>> Acesso em: 15 jan. 2008.
- Singh, N.; Pandey, P.; Dubey, R. C. & Maheshwari, D. K. Biological control of root rot fungus *Macrophomina phaseolina* and growth enhancement of *Pinus roxburghii* (Sarg.) by rhizosphere competent *Bacillus subtilis* BN1. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 24: 1669-1679. 2008.
- Sivakumar, D.; Zeeman, K. & Korsten, L. Effect of a biocontrol agent (*Bacillus subtilis*) and modified atmosphere packaging on postharvest decay control and quality retention of litchi during storage. *Phytoparasitica* 35: 507-518. 2007.
- Sonoda, R.M. & Guo, Z. Effect of spray applications of *Bacillus subtilis* on postbloom drop of citrus. *Phytopathology* 86: S52. 1996. (Abstract).
- Swadling, I. R. & Jeffries, P. Antagonistic properties of two bacterial biocontrol agents of grey mould disease. *Biocontrol Science and Technology* 8: 439-448. 1998.
- Swain, M. R.; Ray, R.C. & Nautiyal, C. S. Biocontrol efficacy of *Bacillus subtilis* strains isolated from cow dung against postharvest yam (*Dioscorea rotundata* L.) pathogens. *Current Microbiology* 57: 407-411. 2008.
- Szczecz, M. & Shoda, M. Biocontrol of *Rhizoctonia* damping-off of tomato by *Bacillus subtilis* combined with *Burkholderia cepacia*. *Journal of Phytopathology* 152: 549-556. 2004.
- Tatagiba, J. D. S.; Maffia, L.A.; Barreto, R. W.; Alfenas, A. C. & Sutton, J. C. Biological control of *Botrytis cinerea* in residues and flowers of rose (*Rosa hybrida*). *Phytoparasitica* 26: 8-19. 1998.
- Toure, Y.; Ongena, M.; Jacques, P.; Guiro, A. & Thonart, P. Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple. *Journal of Applied Microbiology* 96: 1151-1160. 2004.
- Turner, J.T. & Backman, P.A. Factors relating to peanut yield increases after seed treatment with *Bacillus subtilis*. *Plant Disease* 75: 347-353. 1991.
- Utkhede, R. S.; Levesque, C.A. & Dinh, D. *Pythium aphanidermatum* root rot in hydroponically grown lettuce and the effect of chemical and biological agents on its control. *Canadian Journal of Plant Pathology-Revue Canadienne De Phytopathologie* 22: 138-144. 2000.
- Venkatasubbaiah, P. Efficacy of *Bacillus subtilis* as a biocontrol for rot of coffee pathogen. *Geobios* 12: 101-104. 1985.
- Weller, D.M. Biological control of rhizosphere with bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 26: 379-407. 1988.
- Wulff, E. G.; Mguni C. M.; Mansfeld-Giese, K.; Fels, J.; Lubeck, M. & Hockenhull, J. Biochemical and molecular characterization of *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. subtilis* and *B. pumilus* isolates with distinct antagonistic potential against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Plant Pathology* 51: 574-584. 2002a.
- Wulff, E. G.; Mguni, C. M.; Mortensen, C. N.; Keswani, C. L. & Hockenhull, J. Biological control of black rot (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) of brassicas with an antagonistic strain of *Bacillus subtilis* in Zimbabwe. *European Journal of Plant Pathology* 108: 317-325. 2002b.