



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
AGROECOLOGIA E DESENVOLVIMENTO RURAL

**CONTROLE BIOLÓGICO DE *Alternaria alternata*, AGENTE CAUSAL DA MANCHA MARROM DE ALTERNARIA, POR *Bacillus* SPP.**

**ARIANE DO CARMO SOUZA**

**Araras**

**2018**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
AGROECOLOGIA E DESENVOLVIMENTO RURAL

**CONTROLE BIOLÓGICO DE *Alternaria alternata*, AGENTE CAUSAL DA MANCHA MARROM DE ALTERNARIA, POR *Bacillus* SPP.**

**ARIANE DO CARMO SOUZA**

ORIENTADOR: Prof<sup>a</sup>. Dra. KATIA CRISTINA KUPPER

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agroecologia e Desenvolvimento Rural como requisito parcial à obtenção do título de MESTRE EM AGROECOLOGIA E DESENVOLVIMENTO RURAL

Araras

2018

## FICHA CATALOGRÁFICA

do Carmo Souza, Ariane

CONTROLE BIOLÓGICO DE *Alternaria alternata*, AGENTE CAUSAL DA MANCHA MARROM DE ALTERNARIA, POR *Bacillus* SPP. / Ariane do Carmo Souza. -- 2018.

79 f. : 30 cm.

Dissertação (mestrado)-Universidade Federal de São Carlos, campus Araras, Araras

Orientador: KATIA CRISTINA KUPPER

Banca examinadora: Fernando Alves Azevedo, Ana Paula de Oliveira Amaral Mello

Bibliografia

1. Bactérias antagonicas. . 2. Controle alternativo. 3. Citrus. I. Orientador. II. Universidade Federal de São Carlos. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pelo Programa de Geração Automática da Secretaria Geral de Informática (SIn).

DADOS FORNECIDOS PELO(A) AUTOR(A)

Bibliotecário(a) Responsável: Maria Helena Sachi do Amaral – CRB/8 7083



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**

Centro de Ciências Agrárias  
Programa de Pós-Graduação em Agroecologia e Desenvolvimento Rural

---

**Folha de Aprovação**

---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Ariane do Carmo Souza, realizada em 14/06/2018:

---

Profa. Dra. Katia Cristina Kupper  
UFSCar

---

Profa. Dra. Ana Paula de Oliveira Amaral Mello  
UFSCar

---

Prof. Dr. Fernando Alves de Azevedo  
IAC

A melhor família que uma pessoa possa ter

Suzanir, Ricardo e Filipe.

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

Inicialmente, agradeço à **Deus** por me dar força, me amparar, me proteger e nunca me abandonar nessa longa caminhada.

À minha **família** que foi e sempre é meu alicerce mais bem fundado de todos. Sem vocês eu jamais teria conseguido concluir esse mestrado. Muito obrigada por todas as visitas, as conversas, os conselhos, os momentos maravilhosos que sempre passamos juntos. **Filipe, Suzi, Ricardo, Cecília, Dom e Lina** amo vocês.

Ao **Lucas** que esteve ao meu lado em todos os momentos nessa caminhada, desde experimentos a dias de lazer, um grande amigo acima de tudo. Meus sinceros agradecimentos a você que nunca desistiu de mim, me deu força, ajudou, acreditou em mim e no meu potencial e foi paciente frente todas às dificuldades encontradas.

À minha orientadora de mestrado Dra **Kátia Cristina Kupper** que possibilitou a realização deste trabalho, acreditou em meu potencial e contribuiu para minha formação pessoal.

Ao Centro de Citricultura “Sylvio Moreira” do IAC, por abrir as portas para que a realização deste trabalho pudesse acontecer. Não apenas um centro de pesquisa, mas um ambiente de enorme crescimento pessoal. Meus sinceros agradecimentos a **Maria, Lurdes, Izabel, Franciel, “QQ”, Gomes, Genésio, Nidelci, Nadji, Vivian, Maria Amélia, Kleber e Valéria**. Aos pesquisadores Dr. **Fernando Azevedo**, Dra **Marinês Bastianel**. E aos colegas **André, Rodrigo, Mariana, Isis, Reinaldo, Maria Eduarda, Juliana, Thais, Rayane, Henrique, Guilherme, Yuri e Alex**.

À **Universidade Federal de São Carlos** e ao Programa de Pós Graduação em Agroecologia e Desenvolvimento Rural por ser responsável por minha excelente formação como mestre. Agradeço especialmente a **Cris** por sempre ser tão solícita, salvadora e amiga em todas as horas, a **Sirlene** e ao corpo docente, em especial as professoras **Anastácia, Janice e Teca**.

Às professoras **Ana Paula de Oliveira Amaral Mello, Marinês Bastianel e Márcia Maria Rosa** por aceitarem o convite em compor a banca de qualificação e por suas contribuições para enriquecimento do trabalho. Aos membros que compuseram a banca de defesa **Ana Paula de Oliveira Amaral Mello e Fernando Alves de Azevedo** pelas ricas contribuições para finalizar a dissertação.

À **Lilian Lofego** que durante esses dois anos foi uma grande amiga e conselheira. Agradeço profundamente ao crescimento pessoal por ti proporcionado.

Aos amigos que sempre foram pacientes frente a tantos compromissos ausentes e acreditaram sempre em mim: **Filipe, Karina Gil, Pilla, Meca, Juliano, Amanda e Karina Torres**.

Aos colegas de laboratório **Aline, Andreia, Bianca, Deborah, Flávia, Lilian, Lorena, Luriany, Mariana, Vanessa e Wesley**. E aos estagiários **Amanda, João, Luan, Mariana, Mariane, Paulinho, Rafael e Vitor**.

Aos colegas de sala os quais passei ótimos momentos **Juliana, Tiago, Joana, Lucas, Ivonete, Barbosa, Erivaldo, Daniela, Leila, André, Diana, Danilo e Tainara**.

À **Capes** por ser a provedora da bolsa de estudos.

Às demais pessoas que direta ou indiretamente contribuíram com a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

	Pág.
ÍNDICE DE TABELAS .....	i
ÍNDICE DE FIGURAS .....	iv
RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	viii
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. OBJETIVO GERAL.....	3
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
3. REVISÃO DA LITERATURA .....	4
3.1 Panorama citrícola.....	4
3.2 Tangerinas e híbridos.....	4
3.3 Histórico e origem da Mancha marrom de alternaria.....	5
3.3.1 <i>Alternaria alternata</i> : etiologia e ciclo da doença.....	7
3.4 Medidas de controle da Mancha marrom de alternaria.....	8
3.5 Agroecologia.....	10
3.6 Controle biológico.....	11
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	14
4.1 Obtenção dos microrganismos .....	14
4.2 Interações <i>in vitro</i> entre <i>Bacillus</i> spp. e <i>Alternaria alternata</i> .....	16
4.2.1 Influência dos isolados de <i>Bacillus</i> spp. no crescimento micelial de <i>Alternaria alternata</i> através da técnica de cultivo pareado.....	16
4.3 Produção de compostos antifúngicos .....	16
4.3.1 Produção de metabólitos voláteis por <i>Bacillus</i> spp. e seu efeito sobre o crescimento micelial de <i>Alternaria alternata</i> .....	16
4.3.2 Avaliação da termoestabilidade dos metabólitos produzidos por <i>Bacillus</i> spp.....	17
4.3.3 Produção de metabólitos livres de células pelos isolados de <i>Bacillus</i> spp.....	18
4.3.4 Influência dos agentes de controle biológico (ACBs) na germinação de <i>Alternaria alternata</i> .....	19



4.4 Identificação molecular dos isolados de <i>Bacillus</i> spp.....	20
4.4.1 Extração de DNA genômico.....	20
4.4.2 Amplificação do gene que codifica o 16S rRNA.....	20
4.5. Controle da mancha marrom de alternaria <i>in vivo</i> .....	21
4.5.1 Produção de inóculo de <i>Alternaria alternata</i> .....	21
4.5.2 Teste de patogenicidade.....	22
4.5.3 Controle da mancha marrom de alternaria em folhas destacadas e, sob condições de casa de vegetação.....	22
5. RESULTADOS .....	25
5.1 Interações <i>in vitro</i> entre <i>Bacillus</i> spp. e <i>Alternaria alternata</i> .....	25
5.1.1 Influência dos isolados de <i>Bacillus</i> spp. no crescimento micelial de <i>Alternaria alternata</i> através da técnica de cultivo pareado.....	25
5.1.2 Produção de compostos voláteis pelos isolados de <i>Bacillus</i> spp.....	27
5.1.3 Avaliação da termoestabilidade dos metabólitos produzidos por <i>Bacillus</i> spp.....	29
5.1.4 Produção de metabólitos livres de células pelos isolados de <i>Bacillus</i> spp.....	31
5.1.5 Influência dos agentes de controle biológico (ACBs) na germinação de <i>Alternaria alternata</i> .....	33
5.1.6 Amplificação do gene que codifica o 16S rRNA.....	36
5.1.7 Controle da mancha marrom de alternaria em folhas destacadas e, sob condições de casa de vegetação.....	39
6. DISCUSSÃO .....	45
7. CONCLUSÕES .....	49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	50

## ÍNDICE DE TABELAS

	Pag.
Tabela 1. Isolados de <i>Bacillus</i> spp. pertencentes à coleção de microrganismos antagônicos do Laboratório de Fitopatologia e Controle Biológico do CCSM-IAC.....	14
Tabela 2. Diâmetro médio (cm) e porcentagem de inibição da colônia de <i>Alternaria alternata</i> , após cultivo pareado com diferentes isolados de <i>Bacillus</i> spp. Ensaios 1 e 2.....	26
Tabela 3. Diâmetro médio (cm) e porcentagem de inibição da colônia de <i>Alternaria alternata</i> , após cultivo pareado com diferentes isolados de <i>Bacillus</i> spp. Ensaio 3.....	27
Tabela 4. Efeito dos compostos voláteis, produzidos por diferentes isolados de <i>Bacillus</i> spp., na porcentagem de inibição da colônia de <i>Alternaria alternata</i> . Ensaios 1 e 2.....	28
Tabela 5. Efeito dos compostos voláteis, produzidos por diferentes isolados de <i>Bacillus</i> spp., na porcentagem de inibição da colônia de <i>Alternaria alternata</i> . Ensaio 3.....	29
Tabela 6. Efeito da produção de metabólitos termoestáveis por diferentes isolados de <i>Bacillus</i> spp. na porcentagem de inibição da colônia de <i>Alternaria alternata</i> . Ensaios 1 e 2.....	30
Tabela 7. Efeito da produção de metabólitos termoestáveis por diferentes isolados de <i>Bacillus</i> spp. na porcentagem de inibição da colônia de <i>Alternaria alternata</i> . Ensaio 3.....	31
Tabela 8. Efeito da produção de metabólitos livre de células por	

diferentes isolados de <i>Bacillus</i> spp. na porcentagem de inibição da colônia de <i>Alternaria alternata</i> . Ensaios 1 e 2.....	32
Tabela 9. Efeito da produção de metabólitos livre de células por diferentes isolados de <i>Bacillus</i> spp. na porcentagem de inibição da colônia de <i>Alternaria alternata</i> . Ensaios 3 e 4.....	32
Tabela 10. Inibição da germinação de conídios de <i>A. alternata</i> por isolados de <i>Bacillus</i> spp. Ensaio 1.....	33
Tabela 11. Inibição da germinação de conídios de <i>A. alternata</i> por isolados de <i>Bacillus</i> spp. Ensaio 2.....	34
Tabela 12. Inibição da germinação de conídios de <i>A. alternata</i> por isolados de <i>Bacillus</i> spp. Ensaio 3.....	35
Tabela 13. Inibição da germinação de conídios de <i>A. alternata</i> por isolados de <i>Bacillus</i> spp. Ensaio 4.....	35
Tabela 14. Identificação de espécies com base nas sequências do Genbank, NCBI.....	37
Tabela 15. Área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD) de mancha marrom de alternaria ( <i>Alternaria alternata</i> ) em folhas destacadas de tangor Murcott. Ensaio 1.....	39
Tabela 16. Área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD) para a mancha marrom de alternaria ( <i>Alternaria alternata</i> ) em folhas destacadas de tangor Murcott. Ensaio 2.....	40
Tabela 17. Área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD) para a mancha marrom de alternaria ( <i>Alternaria alternata</i> ) em folhas destacadas de tangor Murcott. Ensaio 3.....	40

Tabela 18. Área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD) para a mancha marrom de alternaria ( <i>Alternaria alternata</i> ) em condições de casa de vegetação em plantas de tangor Murcott. Ensaio 4.....	41
Tabela 19. Área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD) para a mancha marrom de alternaria ( <i>Alternaria alternata</i> ) em condições de casa de vegetação em plantas de tangor Murcott. Ensaio 5.....	42

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
<p>Figura 1. A - Cultivo pareado entre <i>Bacillus</i> sp. ACB-51 e <i>Alternaria alternata</i> B - Testemunha -crescimento do fitopatógeno na ausência da bactéria.....</p>	25
<p>Figura 2. Inibição da germinação de conídios de <i>Alternaria alternata</i> por isolados de <i>Bacillus</i> spp. A) Testemunha e B) Conídios não germinados após tratamento com ACB-26.....</p>	36
<p>Figura 3. Avaliações de área abaixo da curva do progresso da doença entre os isolados de <i>Bacillus</i> spp. e <i>A. alternata</i>, modo de aplicação (preventivo e curativo) e tipos de porta enxertos de tangor Murcott. As médias seguidas pela mesma letra, dentro de cada interação, não diferem entre si (Teste de Tukey – 5%); letras maiúsculas: entre modo de aplicação e tratamentos; letras minúsculas: entre os porta-enxertos e modo de aplicação e barra de erro: entre porta-enxertos. T1: testemunha, T2: ACB-01, T3: ACB-07, T4: ACB-08, T5:ACB-18, T6:ACB-57 e T7: tratamento químico.....</p>	43
<p>Figura 4. Avaliações de incidência entre os isolados de <i>Bacillus</i> spp. e <i>A. alternata</i>, modo de aplicação (preventivo e curativo) e tipos de porta enxertos de tangor Murcott. As médias seguidas pela mesma letra, dentro de cada interação, não diferem entre si (Teste de Tukey – 5%); letras maiúsculas: entre modo de aplicação e tratamentos; letras minúsculas: entre os porta-enxertos e modo de aplicação e</p>	

barra de erro: entre porta-enxertos. T1: testemunha, T2: ACB-01, T3:  
ACB-07, T4: ACB-08, T5:ACB-18, T6:ACB-57 e T7: tratamento  
químico..... 44

**CONTROLE BIOLÓGICO DE *Alternaria alternata*, AGENTE CAUSAL DA MANCHA MARROM DE ALTERNARIA, POR *Bacillus* SPP.**

**Autor: ARIANE DO CARMO SOUZA**

**Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr. KATIA CRISTINA KUPPER**

**RESUMO**

A mancha marrom de alternaria, causada por *Alternaria alternata* f sp. *citri*, causa grandes danos econômicos em tangor Murcott (*Citrus sinensis* L. Osbeck x *Citrus reticulata* [L.] Blanco). Seu controle é realizado através de pulverizações com agroquímicos, implicando em até 15 pulverizações por ano, o que acarreta em aumento no custo de produção da cultura e prejuízos ao meio ambiente. Como alternativa, o uso de microrganismos, em particular, as bactérias do gênero *Bacillus* spp., têm sido empregadas para o controle de doenças. Portanto, esse trabalho teve por objetivo avaliar em condições *in vitro* e *in vivo* a viabilidade de 47 isolados de *Bacillus* spp. para o controle da doença. As metodologias foram embasadas nas interações entre agentes de controle biológico (*Bacillus* spp.) e o fitopatógeno *A. alternata* avaliadas pela técnica de cultivo pareado, pela produção de metabólitos voláteis, termoestáveis e livre de células por diferentes isolados de *Bacillus* spp.. Realizou-se, ainda, a identificação molecular dos isolados testados e a eficácia dos isolados da bactéria em folhas destacadas e em plantas, sob condições de casa de vegetação. Os resultados obtidos mostraram que a maioria dos isolados afetou o desenvolvimento do fitopatógeno e produziram algum tipo de metabólito, sendo, a antibiose um dos prováveis mecanismos de ação da bactéria. Os isolados ACB-01, ACB-07, ACB-08, ACB-18 e ACB-57 apresentaram potencial para o biocontrole de *A. alternata*.

Palavras-chave: Bactérias antagônicas; voláteis; termoestabilidade, compostos livres de células.



**BIOLOGICAL CONTROL OF *Alternaria alternata*, THE CAUSAL AGENT OF ALTERNARIA BROWN SPOT BY *Bacillus* SPP.**

**Author: ARIANE DO CARMO SOUZA**

**Advisor: KATIA CRISTINA KUPPER**

**ABSTRACT**

The alternaria brown spot, caused by *Alternaria alternata* f sp. *citri*, causes large economic damages in tangor Murcott (*Citrus sinensis* Osbeck x *Citrus reticulata* [L.] Blanco). Its control is carried out through the spraying of agrochemicals, implying up to 15 pulverizations per year, which causes an increase in the production costs of the cultures and damages to the environment. As an alternative, the use of microorganisms, in particular *Bacillus* spp., has been used to diseases' control. Therefore, the aim of this work was to evaluate the viability of *Bacillus* spp in *in vitro* and *in vivo* conditions. The methodologies were based on the interactions between biological control agents (*Bacillus* spp.) and the phytopathogen *A. alternata*, evaluated by the paired culture technique, by the production of volatile, thermostable and cell-free metabolites by different *Bacillus* spp. isolates. The molecular identification of the isolates tested and the efficacy of bacterial isolates were evaluated in leaves and plants under greenhouse conditions. The results showed that most of the isolates affected the development of phytopathogen and produced some types of metabolite, being antibiosis one of the probable mechanisms of action of the bacterium. The isolates ACB-01, ACB-07, ACB-08, ACB-18 and ACB-57 presented potential for disease control of *A. alternata*.

**Keywords:** Antagonistic bacteria; volatile, thermostable and cell-free compounds.

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil destaca-se como sendo o maior produtor e exportador de suco de laranja concentrado do mundo. Nesse contexto, a citricultura representa atualmente uma das mais importantes fontes de divisa da economia brasileira, sendo responsável por 60% da produtividade mundial (NEVES et al., 2010). Com aproximadamente 50 mil hectares e produção de 970 mil toneladas, o Brasil é um dos dez maiores produtores de tangerina do mundo (IBGE 2017; FAO, 2017).

O tangor Murcott compõe a família Rutaceae e consiste em um híbrido de laranja doce [*Citrus sinensis* [L.] Osbeck] com tangerina [*Citrus reticulata* [L.] Blanco]. Originou-se a partir de um pomar abandonado do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos e difundiu-se a primeira vez por Charles Murcott Smith (DAVIES & ALBRIGO, 1994). Esse híbrido foi introduzido no Brasil em 1948, pelo Instituto Agrônomo (IAC), para ser testado como potencial porta enxerto contra o vírus da tristeza dos citros e é a segunda variedade copa, dentro do grupo das tangerinas e híbridos, mais cultivada no Estado de São Paulo (POMPEU JÚNIOR, 2001).

Embora seja a segunda variedade mais cultivada, os produtores de tangor Murcott enfrentam dificuldades em se obter safras de boa qualidade e produtivas, devido à incidência de uma doença fúngica denominada mancha marrom de alternaria (MMA) (GOES et al., 2001; PERES et al., 2003; SPÓSITO, 2003).

A mancha marrom de alternaria (MMA) é causada por *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl e afeta folhas, ramos e frutos de tangerinas, tangores e tangelos, podendo causar queda das folhas, seca dos ramos e queda prematura dos frutos (FEICHTENBERGER et al., 2005). A doença representa um dos maiores problemas fitossanitários dentro do grupo das tangerinas, onde as cultivares comerciais mais utilizadas são suscetíveis ao fungo (BASTIANEL et al., 2005).

Frente à elevada suscetibilidade das variedades de tangerinas e híbridos à mancha marrom de alternaria, principalmente, de tangor Murcott no Estado

de São Paulo, a produção vem sendo inviabilizada fazendo com que produtores elevem o número de aplicações de agroquímicos gerando aumento no custo da produção (AZEVEDO et al. 2010). Diversas aplicações de fungicidas foliares são utilizados para controlar a doença e garantir a qualidade da fruta. Dependendo do clima, são necessárias de 3 a 15 aplicações anuais (TIMMER et al. 2003; 2005).

As doenças de plantas são responsáveis por ao menos 10% das perdas mundiais de alimentos (STRANGE & SCOTT, 2005), o que representa instabilidade para soberania alimentar e para a economia. Frente a essa problemática, faz-se necessário a criação de alternativas de controle que além de diminuir as perdas dos alimentos, tenham como princípio minimizar os efeitos deletérios ao meio ambiente e ao consumidor, em substituição total ou parcial de produtos químicos que são aplicados comumente para o controle dessas doenças.

Para que haja sucesso na produção e redução nos prejuízos na colheita, é indispensável a adoção de métodos de controle que visem à produtividade, mas que preservem o ambiente e a saúde humana. O controle biológico de fitopatógenos de plantas é considerado uma estratégia alternativa eficiente ao uso exacerbado de agrotóxicos (BETTIOL & MORANDI, 2009).

Bactérias do gênero *Bacillus* spp. têm sido muito utilizadas por apresentar excelentes resultados como agentes de biocontrole e promotores de crescimento. Como agente de controle biológico, possuem algumas vantagens por apresentar endósporos, que são tolerantes em condições adversas, como altas temperaturas, exposição a agrotóxicos, fertilizantes e condições limitantes de pH, o que facilita a sua aplicação na parte aérea de plantas (BETTIOL & BRANDÃO, 1994; LINDOW & LEVEAU, 2002; STRAGIER & LOSICK, 1996).

Com base nos preceitos agroecológicos, o controle biológico de doenças de plantas é uma alternativa viável às aplicações de agroquímicos que visa redução dos custos de produção e danos ao ambiente e possibilita um agroecossistema mais equilibrado ecologicamente.

## 2. OBJETIVO GERAL

Avaliar em condições *in vitro* e *in vivo* a viabilidade de isolados de *Bacillus* spp. para o controle de *Alternaria alternata* em tangor Murcott.

### 2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a viabilidade de 47 isolados de *Bacillus* spp. quanto a sua capacidade antagônica na redução do tamanho das colônias de *A. alternata*;
- Investigar os possíveis mecanismos de ação dos isolados de *Bacillus* spp. no controle de *A. alternata*;
- Identificar a partir de técnicas moleculares as espécies de cada isolado utilizado;
- Avaliar o desempenho dos isolados de *Bacillus* spp., que apresentaram potencial nos testes *in vitro*, no controle da doença em plantas de tangor Murcott sob condições de casa de vegetação.

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1. Panorama citrícola

Em meados de 1962 iniciaram-se as primeiras exportações do âmbito citrícola do país (PRIETO, 2012). Desde então, a citricultura tem contribuído efetivamente com o desenvolvimento agrícola no mercado de frutíferas do Brasil. Em 2016, movimentou cerca de US\$ 3 bilhões no processo produtivo (FAOSTAT, 2018). No mercado de laranjas, o Brasil é o maior produtor e exportador de suco concentrado do mundo, com 704.238 hectares plantados e produção de 18.666.928 toneladas (IBGE, 2018).

Os dados relacionados às atividades citrícolas mostram a importância do setor no agronegócio paulista nos últimos 60 anos. A citricultura transformou o Estado de São Paulo no maior produtor, sendo o Brasil responsável por 50% da produção mundial de laranja, empregando 200 mil trabalhos diretos e indiretos no país meio a crise econômica de 2016 (IEA, 2016).

No Brasil, a maior produção de tangerinas e híbridos advém do Estado de São Paulo, que é o responsável pela maior produção do país. Sua produtividade é superior à região sul (a segunda maior produtora) em 170 mil toneladas por hectare. Na somatória, o Brasil produz cerca de 970 mil toneladas de tangerinas e híbridos por safra em hectares produtivos (KIST et al., 2016; NEVES et al., 2010; IBGE, 2017).

#### 3.2. Tangerinas e híbridos

As tangerinas têm como provável centro de origem a Ásia e são cultivadas desde o século XII a.C, na China (SAUNT,1992). Considerando as variedades mais cultivadas no Brasil, evidencia-se a tangerina Ponkan (*Citrus reticulata* Blanco), seguida do híbrido tangor Murcott [*Citrus reticulata* Blanco x *Citrus sinensis* (L.) Osbeck] que são mais cultivadas no Estado de São Paulo, juntamente com as mexericas Rio ou Caí e Montenegrina (*Citrus deliciosa* Tenore) nos Estados do sul do país (BASTIANEL et al., 2014; AZEVEDO et al.,

2010; POMPEU JÚNIOR, 2001; STUART et al., 2009). A Ponkan é a mais cultivada devido à sua facilidade no descascamento e menor número de sementes por fruto. Já a preferência pelo tangor Murcott se dá por ser uma fruta com boa aceitação pelo consumidor e mercado *in natura*, bem como por possuir potencial para exportação (PIO et al., 2005). Ainda que seja elevado o número de variedades e híbridos existentes, seu cultivo depende da aceitação do consumidor final.

O tangor Murcott é um híbrido de laranja doce com tangerina, originário de pomar abandonado no Departamento de Agricultura dos Estados Unidos e teve sua disseminação por Charles Murcott Smith em Bayview, Florida, Estados Unidos em 1922. No Brasil, a variedade foi introduzida pelo Instituto Agrônomo em 1948 para ser avaliada como porta enxerto (FIGUEIREDO, 1991; DAVIES & ALBRIGO, 1994).

As plantas de tangor são vigorosas, com hábito de crescimento ereto e folhas lanceoladas. Os frutos possuem tamanho médio com aproximadamente 140g cada, cerca de 22 sementes por fruto e casca de coloração laranja, de fina espessura; porém, com forte aderência ao fruto. Quanto às características do suco, este possui rendimento elevado, com teor de sólidos solúveis de 12,6° Brix e 0,92% de acidez titulável. A época produtiva no Brasil é entre os meses de agosto e novembro (FIGUEIREDO, 1991).

Considerando a existência de diversas doenças relacionadas ao cultivo citrícola, as tangerinas e híbridos tem sido hospedeiras de uma doença fúngica denominada mancha marrom de alternaria, causada por um fungo saprofítico denominado *Alternaria alternata* (GOES et al., 2001; SPOSITO et al., 2003).

### **3.3. Histórico e origem da Mancha marrom de alternaria**

A mancha marrom de alternaria (MMA) é causada pelo fungo *Alternaria alternata* e afeta tangores, tangelos, tangerinas e raramente, toranjas. Quando severa, a doença pode causar queda dos frutos e redução do número de frutas no mercado de tangerinas e híbridos.

A doença é considerada uma das principais doenças fúngicas do citros, onde o fitopatógeno atinge folhas jovens, frutos e galhos de tangerinas e híbridos suscetíveis em diversas regiões do mundo (REIS et al., 2006).

Inicialmente, o fitopatógeno causador da MMA, foi descrito como *Alternaria citri* Ellis & Pierce (DOIDGE, 1929; WHITESIDE, 1976), porém em 1991, Solel (1991), sugeriu que sua denominação deveria ser *Alternaria alternata* (Fr:Fr) Keissl. pv. *citri*, devido a morfologia e medidas dos conídios e à sua especificidade ao hospedeiro. Em 1999, Simmons (1999), descreveu morfologicamente dez espécies de uma coleção mundial de *Alternaria* spp. causadoras de doenças no citros, as quais foram descritas de acordo com a cadeia de ramificação dos conídios. Devido à semelhança genética, morfológica e produção de toxina específica ao hospedeiro desses isolados de *Alternaria* spp., associados as mancha marrom e mancha foliar de limão rugoso, pôde-se considerar todas elas como *A. alternata* (KIELY, 1964; WHITESIDE, 1976).

Peever et al., (2004), através de análises filogenéticas de *A. alternata*, de vários clados entre diversas linhagens associadas à citros, e considerando seus aspectos biológicos, fenotípicos e ecológicos classificam essas espécies associadas como *A. alternata*. Portanto, o termo *Alternaria alternata* pv. *citri* passa a ser denominado como uma classificação correta deste fitopatógeno neste trabalho.

A primeira ocorrência da mancha marrom de alternaria foi relatada em 1903 em tangerina Emperor na Austrália (KIELY, 1964). Em 1974, teve seu relato na Flórida infectando tangerina Dancy (WHITESIDE, 1976). Já em 1989, foi relatada em Israel (SOLEL, 1991), seguida na África do Sul (SCHUTTE et al., 1992), Cuba (HERRERA, 1992), Colômbia (CASTRO CAICEDO et al., 1994), Turquia (CANIHOS et al., 1997), Espanha (VICENT et al., 2000), Itália (BELLA et al., 2001), Argentina (PERES et al., 2003) e Peru (MARÍN et al., 2006).

No Brasil, seu primeiro relato foi no Rio de Janeiro em 2001 (GOES et al., 2001), e nos anos seguintes observados nos Estados de São Paulo, Minas Gerais e Rio Grande do Sul (SPÓSITO et al., 2003).

### 3.3.1. *Alternaria alternata*: etiologia e ciclo da doença

*Alternaria alternata* é um fungo saprofítico pertencente à família Pleosporaceae (Filo Ascomycota; subfilo Pezizomycotina; classe Dothideomycetes, subclasse: Pleosporomycetidae, ordem Pleosporales). A diferenciação das espécies de *Alternaria* spp. se dá principalmente pelos conídios. Os conídios são formados em cadeias simples ou ramificadas, ovóides e obclavados, de coloração que varia desde verde oliva a marrom escuro, com septos transversais oblíquos ou longitudinais (BARNETT & HUNTER, 1998; ELLIS & HOLLIDAY, 1970).

Para separar as diferentes estirpes de *Alternaria* spp. que causam mancha marrom em tangerinas e híbridos das que causam mancha foliar em limão, adota-se a classificação de acordo com o patótipo do fungo, por mais que sejam morfológicamente similares, produzem toxinas diferentes dependente da toxina seletiva ao hospedeiro (STUART, 2009).

O fungo afeta folhas, frutos e ramos de tangerinas, tangores e híbridos e se reproduz sob material vegetal, seja na planta ou em restos vegetais, através da formação de esporos assexuais (conídios). As condições favoráveis para que ocorra a infecção são temperaturas entre 20 a 27°C e períodos de molhamento superiores a 12 horas. A disseminação dos esporos se dá através de vento e chuva e em ambientes com alta umidade (TIMMER et al., 2000).

O aparecimento de sintomas causados pelo fungo ocorre 24 horas após a infecção, que ocorre devido a produção de uma toxina seletiva ao hospedeiro (HST), caracterizada por ACT (TIMMER et al., 2003).

Para *A. alternata* pv. *citri*, a ACT consiste na toxina do patótipo das tangerinas e híbridos que causam infecção das mesmas. Seu sítio de ação acontece na membrana plasmática e proporciona necrose nas nervuras e um incremento da perda de eletrólitos nas folhas suscetíveis ao patótipo das tangerinas (KOHMOTO et al., 1993).

Os sintomas aparecem com maior facilidade em folhas jovens de tecidos tenros, e iniciam-se por pequenas manchas de cor preta ou marrom,



circundadas por halo amarelado e que podem ou não evoluir para toda a área foliar, podendo atingir pedúnculo da folha e evoluir para a abscisão da folha. No entanto, o tamanho das lesões nas folhas depende da quantidade de inóculo, agressividade e idade vegetativa da planta (GARDNER et al., 1886; REIS et al., 2006). Devido à agressividade do patógeno, os sintomas podem avançar causando lesões nas nervuras e brotações novas que apresentam um aspecto de envassouramento, impedindo o desenvolvimento da planta (AKIMITSU et al., 2003; KOHMOTO et al., 1993).

Para ocorrer a penetração do fungo na folha, é necessário que o fungo penetre diretamente a epiderme da folha ou através dos estômatos, mas em ambos os processos a penetração é realizada através do apressório (SOLEL & KIMCHI, 1998).

### **3.4. Medidas de controle da Mancha marrom de alternaria**

Dentre os fatores limitantes da produção de tangerinas e híbridos no Brasil, encontra-se a ocorrência de pragas e doenças. Cerca de 21 doenças fúngicas (LARANJEIRA, et al., 2005) causadas por diferentes fitopatógenos e etiologias afetam a citricultura, gerando intensiva aplicação de agroquímicos para o controle das mesmas e elevado custo de produção.

A maioria dos pomares produtores de tangerinas e tangores são suscetíveis à incidência da mancha marrom de alternaria. Muitos produtores buscam através de técnicas de controle, a redução da incidência da doença no campo através de manejos racionais. O manejo mais utilizado é a pulverização de fungicidas como iprodione, procimidone, mancozeb, chlorothalonil e estrobilurinas, onde os mesmos comprovam eficácia para o controle de *A. alternata*, porém, são necessárias muitas aplicações para alcançar o controle da doença (WHITESIDE, 1979; TIMMER & ZITKO, 1997; TIMMER et al., 2000). Solel (1997) comprovou a eficácia de controle na alternância do uso do fungicida iprodione com metiram, cobre e mancozeb para evitar a resistência fúngica pelo fitopatógeno. Colturato et al. (2009), comprovaram que a

alternância de fungicidas trifloxystrobin + propiconazole em cinco aplicações foi mais rentável e eficiente na relação de custo benefício.

Para auxiliar nas aplicações de fungicidas, Timmer et al., (2000) desenvolveram o sistema de pontos ALTER-RATER, que baseia-se nas condições climáticas, porcentagem de umidade, severidade da MMA e análises laboratoriais para estabelecer um sistema de pontos, onde para cada característica avaliada é estabelecido um dado ponto. As aplicações de fungicida são feitas a partir do acúmulo de pontos como, por exemplo, 70, 75, 100 e 150 pontos de dados meteorológicos, com aplicações de 8 a 15, 6 a 8, 5 a 6 ou 3 a 4 pulverizações, respectivamente. Com a adoção desse sistema de controle, e, juntando os dados históricos climáticos, foi possível reduzir as aplicações de fungicida na Flórida (Estados Unidos) e otimizar o controle da MMA.

Visando a lucratividade e o constante abastecimento de frutos no mercado, a utilização de produtos que asseguram uma produtividade no campo é muito comum. As grandes quantidades de fungicidas aplicados para o controle da doença, que variam de 10 a 15 aplicações anuais possuem elevados problemas a saúde humana e ao ambiente, alta toxicidade a fauna e a organismos não-alvo, bem como o desenvolvimento de estirpes resistentes ao uso de fungicidas.

Sobre a utilização de fungicidas, deve-se salientar que fungicidas a base de estrobilurinas por terem apenas um modo de ação, podem acarretar em resistência pelo fungo. Em Israel, após o uso contínuo de iprodione, do grupo da dicarboximida, as aplicações não surtiram efeito para o controle da doença, pois o fitopatógeno apresentou resistência ao fungicida (SOLEL et al., 1996).

Juntamente com a utilização de fungicidas, os produtores podem utilizar o manejo integrado de doenças para a redução do inóculo no campo, como: 1) reduzir aplicação aérea para evitar a disseminação de conídios e tempo de molhamento superficial, (essencial para a infecção e reprodução do fungo); 2) aumentar o espaçamento entre plantas para propiciar uma maior circulação de ar entre as plantas e reduzir a umidade nas mesmas; 3) realizar a poda de limpeza para reduzir a fonte de inóculo no campo; 4) evitar adubações

nitrogenadas que favoreçam a brotação excessiva das plantas, propiciando um ambiente favorável para o aparecimento da doença (REIS, 2006; MARTELLI, 2011).

Outros métodos de controle podem ser empregados como uso de roçadeiras ecológicas, podas de limpeza e manejo integrado. Martelli (2011), utilizando podas de limpeza no inverno comprovou a eficiência na redução de incidência e severidade da mancha marrom de alternaria no campo; porém, frisa a importância de associar esse manejo com outro método de controle para alcançar a redução total do inóculo.

Como alternativa, têm-se o uso de variedades resistentes ao fitopatógeno como o híbrido “Maria” criado pelo Centro APTA Citros “Sylvio Moreira” do IAC, que após anos de estudos foi lançado como resistente a MMA.

Para reduzir as aplicações de fungicidas, a utilização de métodos alternativos como controle biológico e o manejo integrado de doenças são opções que podem ser empregadas em cultivos convencionais e cultivos alternativos como orgânicos e agroecológicos, onde não é previsto a utilização de agroquímicos. Diversos produtos que têm em sua composição microrganismos benéficos como bactérias, leveduras e fungos são utilizados para controle de pragas e doenças, inoculantes de plantas e sementes, como promotores de crescimento e indutores de resistência em plantas na agricultura.

### **3.5. Agroecologia**

Desde a Revolução Verde, o modelo agrícola estabelecido e utilizado nas últimas décadas tem sido bem sucedido e produtivo, mantendo a produtividade da maioria das grandes *commodities* e atendendo as demandas de produção de alimentos no século XX. A produção de alimentos continua estável, superando a taxa de crescimento populacional, os preços pagos por alimentos diminuíram e os índices de fome crônica reduziram. Esses índices foram estabelecidos devido aos investimentos em pesquisas agrícolas,

inovações tecnológicas e ferramentas modernas que possibilitaram a otimização dos processos agrícolas (GLIESSMAN, 2009).

Entretanto, essa maximização dos processos agrícolas com objetivo de manter a produtividade e rentabilidade, nem sempre gera benefícios. O modelo agrícola atual é caracterizado pelo alto consumo de agrotóxicos e fertilizantes químicos, intensa mecanização do sistema produtivo, cultivo intensivo do solo e constante utilização de combustíveis fósseis para manutenção dos sistemas.

Os monocultivos citrícolas usados como modelo do sistema agrícola atual, desequilibram o sistema agrícola e estimula a ocorrência desenfreada de pragas, doenças e plantas daninhas. Para que haja um ambiente equilibrado, a diversidade dos agroecossistemas é fundamental para aumentar a biodiversidade microbiana e favorecer o controle biológico natural de pragas e doenças (NICHOLLS & ALTIERI, 2012).

A Agroecologia é classificada como ciência ou um campo do conhecimento com características multidisciplinares com diversos princípios e metodologias que permitem o redesenho sustentável dos agroecossistemas (CAPORAL & COSTABEBER, 2002).

Como alternativa a intensa aplicação de agrotóxicos e como ferramenta para cultivos orgânicos e agroecológicos, diversas bactérias tem sido empregadas como ferramenta para o controle de doenças de plantas.

Um dos objetivos da pesquisa Agroecológica é não maximizar a produção de uma atividade específica, mas, visar o equilíbrio do agroecossistema como um todo. O que requer uma ampla especificação do pesquisador na área do conhecimento, exigindo maior ênfase na interpretação dos dados e das relações existentes dentro do ecossistema estudado (CAPORAL & COSTABEBER, 2002).

### **Controle biológico**

Bactérias da família *Bacillaceae* que produzem endósporos, como o gênero *Bacillus* spp., vêm sendo muito utilizadas para controle de doenças de

plantas devido a suas propriedades antifúngicas (BROCK AND MADIGAN, 1991).

O gênero *Bacillus* spp. é caracterizado por serem do tipo bastonetes, com produção de endósporos e muito comumente encontradas no solo. Muitas espécies produzem antibióticos e somente algumas são patogênicas a humanos (TORTORA, et al., 2012).

*Bacillus* spp. são bactérias gram-positivas, que possuem múltiplos mecanismos de ação, possibilitando o controle de vários fitopatógenos. As atividades de controle muitas vezes são atribuídas à antibiose, parasitismo, predação, produção de lipopeptídeos cíclicos (CLPs), produção de metabólitos secundários, formação de endósporos. Não obstante, bactérias desse gênero têm como característica o rápido crescimento em meio de cultura, que possibilita sua rápida reprodução, sua alta adaptabilidade com condições ambientais como condições de pH adversas e extensos tempos de estocagem sem perder suas características (ALI, 2015; BAKER, 1968; PEREZ GARCIA et al., 2011; ROMERO, et al., 2007; SHODA, 2000). Ainda assim, essas bactérias muitas vezes não são patogênicas a humanos e possibilitam a interação com diversos nichos ecológicos e agronômicos.

Outros benefícios da utilização de *Bacillus* spp., são a habilidade de controlar fitopatógenos do solo (RYTTER et al., 1989) da parte aérea, sobrevivência na planta (PLEBAN et al., 1995) e indução de resistência sistêmica à fitopatógenos (WEI et al., 1996). Nesse contexto, espécies de *Bacillus* spp. também produzem uma grande quantidade de antibióticos que podem ser responsáveis pela antibiose como surfactina, iturina e fengicina (PEYPOUX et al., 1999; BONMATIN et al., 2003).

No mercado agrícola existem diversos produtos a base de *Bacillus* spp. com eficiência comprovada para o controle de doenças de plantas como Ballad®, Serenade®, Sonata® relatados por Bettiol (2012), entre outros. No mercado de produtos biológicos, produtos a base de *Bacillus* spp., representam metade dos microrganismos utilizados para confecção de produtos comerciais (FRAVEL, 2005).

Pesquisas realizadas no Centro APTA Citros “Sylvio Moreira”/IAC comprovam a eficácia de agentes de biocontrole para controle de fitopatógenos em doenças de parte aérea e pós colheita do citros. Kupper et al., (2013), utilizando 13 isolados de *Bacillus* spp. e 6 isolados de *Saccharomyces cerevisiae* comprovaram eficácia na inibição da germinação dos esporos de *Penicillium digitatum* com ACB-84 (*Bacillus* spp.) e os isolados ACB-K1 e ACB-CR1 de *Sacharomyces cerevisiae*, apresentaram taxas de inibição de 78% e 85,7% de esporos do fungo, respectivamente. Quando aplicados *in vivo*, os isolados de *S. cerevisiae* foram eficientes para o controle de *P. digitatum* em frutos de limão “Tahiti” e laranja “Hamlin”.

Klein & Kupper (2018) verificaram que a produção de biofilme pela levedura *Aureobasidium pullulans* favoreceu o biocontrole de *Geotrichum citri aurantii*, agente causal da podridão azeda do citros.

Cunha et al. (2018) ao testarem isolados de leveduras contra *P. italicum* em ensaio *in vitro* comprovaram a inibição do crescimento micelial do fungo em até 90%. Já em ensaios *in vivo* com frutos de laranja doce, isolados de *Candida stelimalicola* (ACBL-04, ACBL-05 e ACBI-08) foram eficazes para o controle do mofo azul (*Penicillium italicum*), quando aplicados preventivamente.

Lopes et al. (2015), comprovou a eficiência de seis isolados de *Saccharomyces cerevisiae*, que através de competição por nutrientes e produção de substâncias antifúngicas inibiram a germinação de esporos de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da podridão floral e controlaram a doença em flores destacadas de citros inoculadas artificialmente. Segundo os autores o controle foi tanto de forma curativa, como preventiva.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Obtenção dos microrganismos

Os 47 isolados de *Bacillus* spp utilizados neste trabalho foram obtidos a partir de folhas, flores e solo enquanto que, o fungo *Alternaria alternata* pv. *citri* (Soleil 1991) foi isolado de folha de citros, ambos de diferentes regiões do Estado de São Paulo e todos pertencem à coleção de microrganismos do Laboratório de Fitopatologia e Controle Biológico do Centro de Citricultura “Sylvio Moreira”/IAC e encontram-se na Tabela 1.

**Tabela 1. Isolados de *Bacillus* spp. pertencentes a coleção de microrganismos antagônicos do Laboratório de Fitopatologia e Controle Biológico do CCSM-IAC.**

Número do isolado	Hospedeiro	Procedência	Tecido
ACB-01 <sup>(1)</sup>	-	Jaguariúna	-
ACB-02	Laranja ‘Pêra’	Jaboticabal	Flor
ACB-07 <sup>(2)</sup>	-	Jaboticabal	-
ACB-08	Laranja ‘Pera’	Taiapu	Flor
ACB-09	Laranja ‘Pêra’	Mogi-Gauçu	Folha
ACB-10 <sup>(2)</sup>	-	Jaboticabal	-
ACB-11	Laranja ‘Pêra’	Taiapu	Folha
ACB-13	Laranja ‘Pêra’		
ACB-15	Laranja ‘Pêra’	Taiúva	Flor
ACB-16	Laranja ‘Pêra’	Taquaral	Folha
ACB-17	Laranja ‘Pêra’	Taiúva	Folha
ACB-18	Laranja ‘Pêra’	Taiúva	Folha
ACB-19	Laranja ‘Pêra’	Taiúva	Folha
ACB-20	Laranja ‘Pêra’	Taquaral	Flor
ACB-21	Laranja ‘Pêra’	Taquaral	Flor
ACB-22	Laranja ‘Pêra’	Taiúva	Folha

---

ACB-23	Laranja 'Pêra'	Taiúva	Flor
ACB-24	Laranja 'Pêra'	Taiúva	Flor
ACB-25	Laranja 'Pêra'	Taiúva	Folha
ACB-26	Laranja 'Pêra'	Taiúva	Flor
ACB-27	Laranja 'Pêra'	Taiúva	Folha
ACB-28	Laranja 'Pêra'	Taquaral	Folha
ACB-41	Lima ácida 'Tahiti'	Itápolis	Folha
ACB-42	Lima ácida 'Tahiti'	Itápolis	Folha
ACB-43	Lima ácida 'Tahiti'	Itápolis	Folha
ACB-44	Lima ácida 'Tahiti'	Itápolis	Folha
ACB-45	Lima ácida 'Tahiti'	Itápolis	Folha
ACB-46	Lima ácida 'Tahiti'	Itápolis	Folha
ACB-47	<i>Lima ácida 'Tahiti'</i>	Itápolis	Folha
ACB-48	Lima ácida 'Tahiti'	Itápolis	Folha
ACB-51	Laranja 'Pêra'	Itápolis	Folha
ACB-52	Laranja 'Pêra'	Itápolis	Folha
ACB-53	Laranja 'Pêra'	Itápolis	Folha
ACB-54	Laranja 'Pêra'	Itápolis	Folha
ACB-56	Laranja 'Pêra'	Itápolis	Folha
ACB-57	Laranja 'Pêra'	Itápolis	Folha
ACB-58	<i>Laranja 'Pêra'</i>	Itápolis	Folha
ACB-63	Laranja 'Valência'	Itápolis	Folha
ACB-64	Laranja 'Valência'	Itápolis	Folha
ACB-68	Laranja 'Valência'	Itápolis	Folha
ACB-69	Laranja 'Valência'	Itápolis	Folha
ACB-70	Laranja 'Valência'	Itápolis	Folha
ACB-72	Laranja 'Pêra'	Jaboticabal	Folha
ACB-85	Laranja 'Pêra'	Taiacu	Folha
ACB-90	Laranja 'Pêra'	Altinópolis	Folha
ACB-PB <sup>(3)</sup>			



- 
- <sup>(1)</sup> *Bacillus subtilis* cedido pelo Dr. Itamar Soares de Melo do CNPMA/EMBRAPA, Jaguariúna - SP.
- <sup>(2)</sup> *Bacillus* spp. obtido no Laboratório de Fitopatologia da FCAV/UNESP, Jaboticabal - SP.
- <sup>(3)</sup> *Bacillus* spp. cedido pelo Dr. Wagner Bettiol do CNPMA/EMBRAPA, Jaguariúna-SP.

## **4.2. Interações *in vitro* entre *Bacillus* spp. e *Alternaria alternata***

### **4.2.1. Influência dos isolados de *Bacillus* spp. no crescimento micelial de *Alternaria alternata* através da técnica de cultivo pareado**

Para estudar o efeito antagônico dos isolados de *Bacillus* spp. no crescimento das colônias de *Alternaria alternata*, utilizou-se a técnica de cultivo pareado em placa de Petri contendo BDA, de acordo com a metodologia descrita por Dennis & Webster (1971).

Discos de 5 mm de diâmetro contendo o micélio ativo de *A. alternata*, com crescimento de sete dias, foram colocados em placa de Petri contendo meio batata-dextrose-ágar (BDA) para pareamento a três cm de distância de um disco de 5 mm contendo colônias de cada um dos isolados de *Bacillus* spp. (com 48h de crescimento). As testemunhas foram representadas por um disco de micélio do fitopatógeno, na ausência da bactéria. A incubação das culturas se deu em estufa incubadora para B.O.D a 27°C com fotoperíodo 12/12h durante sete dias. A avaliação foi realizada por meio da medição das colônias de *A. alternata* em dois sentidos perpendiculares. Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições e em três ensaios. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

## **4.3. Produção de compostos antifúngicos**

### **4.3.1 Produção de metabólitos voláteis por *Bacillus* spp. e seu efeito sobre o crescimento micelial de *Alternaria alternata***

Para verificar o efeito dos compostos voláteis produzidos por *Bacillus* spp. sobre o crescimento micelial de *A. alternata*, utilizou-se de placas bipartidas, as quais permitem que seja realizado o cultivo simultâneo dos microrganismos sem que os exsudados bacterianos não voláteis entrem em contato com o fitopatógeno através do meio de cultura. Discos de 5 mm de diâmetro retirados de colônias ativas do fitopatógeno (sete dias de crescimento) e da bactéria (48h de crescimento) foram colocados em cada um dos lados da placa contendo meio batata-dextrose-ágar (BDA).

As testemunhas foram representadas pelo fitopatógeno cultivado na ausência do possível antagonista. As placas, contendo os respectivos microrganismos, foram vedadas com filme de poliestireno e a incubação das culturas se deu em estufa incubadora para BOD à 27°C, em fotoperíodo 12/12h, por sete dias.

A avaliação foi realizada por meio de medições do crescimento das colônias do patógeno, em dois sentidos perpendiculares. Utilizou-se um delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições e três ensaios. Os dados foram submetidos à análise variância (ANOVA) e a comparação de médias através do teste Tukey a 5% de probabilidade.

#### **4.3.2. Avaliação da termoestabilidade dos metabólitos produzidos por *Bacillus* spp.**

Para testar o efeito dos metabólitos termoestáveis produzidos pelos isolados de *Bacillus* spp., utilizou-se a metodologia descrita por Moretto (2000).

Dois discos (5 mm) contendo meio de cultura e colônias de *Bacillus* spp. (48h de crescimento) foram transferidos para frascos de Erlenmeyes de 250 mL, contendo 50 mL de meio líquido batata-dextrose (BD). As culturas foram incubadas sob agitação constante em incubadora tipo Shaker a 150 rpm, por 72 horas em temperatura ambiente. Uma alíquota de 10 mL foi retirada de cada frasco, correspondente a cada isolado de *Bacillus* spp., e transferida para Erlenmeyers com 90 mL de BDA. Em seguida, os frascos foram submetidos à autoclavagem por 20 minutos, a 120°C e 1 atm de pressão, sendo que,

posteriormente, cada meio, contendo o respectivo metabólito, foi vertido para placas de Petri. Após solidificação dos meios, transferiu-se para o centro de cada placa, um disco de 5 mm de diâmetro, obtido de uma colônia ativa de *A. alternata* (sete dias de crescimento). As testemunhas foram constituídas de placas contendo o fitopatógeno nos meios de cultura, sem a presença de metabólitos. Após sete dias de incubação das culturas em estufa incubadora para BOD, a 27°C e fotoperíodo 12/12h, efetuou-se a medição do crescimento micelial das colônias do fitopatógeno em dois sentidos perpendiculares. Utilizou-se um delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e a comparação de médias foi feita pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

#### **4.3.3 Produção de metabólitos livres de células pelos isolados de *Bacillus* spp.**

Os isolados de *Bacillus* spp. foram estudados quanto ao efeito de seus extratos, livres de células, sobre o crescimento micelial de *A. alternata*.

Para cada isolado de *Bacillus* spp., foi utilizado um Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de BD. Dois discos de meio contendo colônias de *Bacillus* spp. (48h de crescimento) foram transferidos para os frascos e, as culturas foram então incubadas por 72 horas em incubadora tipo Shaker sob agitação constante a 150 rpm, em temperatura ambiente. O caldo obtido foi filtrado em membrana millipore (0,22 µm), a fim de se conseguir um filtrado livre de células de *Bacillus* spp. (FRIGHETTO & MELO 1995).

Amostras de 10 mL de cada filtrado foram transferidas para Erlenmeyers com capacidade para 250 mL, contendo 90 mL de meio BDA fundente. Os meios correspondentes a cada tratamento foram vertidos para placas de Petri e, após a solidificação, um disco (5 mm) contendo o fitopatógeno (sete dias de crescimento) foi transferido para o centro das placas. As testemunhas consistiram de placas de Petri contendo BDA sem metabólitos. As culturas foram incubadas em estufa incubadora para BOD a 27°C e fotoperíodo 12/12h durante sete dias e, ao final deste período, avaliou-se o diâmetro médio da

colônia do fitopatígeno e a sua porcentagem de inibição. Utilizou-se um delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), com comparação de médias através do teste de Tukey a 5% de probabilidade.

#### **4.3.4 Influência dos agentes de controle biológico (ACBs) na germinação de *Alternaria alternata***

Com intuito de avaliar a influência dos isolados de *Bacillus* spp. na germinação de *Alternaria alternata* utilizou-se metodologia descrita por Kupper et al. (2003). Colônias dos ACBs foram repicadas para placas de Petri contendo meio de cultura BDA e incubadas por 48 horas, em estufa incubadora para BOD, a 27° C, fotoperíodo 12/12h. Após esse período a suspensão de células bacterianas foi ajustada para  $10^7$  células/mL, através de contagem por câmara de Neubauer. As colônias do fitopatígeno foram repicadas para placas de Petri contendo meio de cultura BDA e incubadas por sete dias em estufa incubadora para B.O.D, a 27°C, fotoperíodo 12/12h. Após este período obteve-se a suspensão de conídios de *A. alternata* com o auxílio da câmara de Neubauer.

Alíquotas de 20 $\mu$ L das suspensões dos possíveis antagonistas ( $1 \times 10^7$  células/mL) e do fitopatígeno ( $1 \times 10^5$  conídios/mL) foram depositadas em áreas demarcadas de lâminas previamente preparadas, contendo ágar-água. Para o tratamento testemunha foram colocadas alíquotas de água destilada autoclavada no lugar dos ACBs. Depois de montadas as lâminas, as culturas foram mantidas em estufa incubadora para BOD, na temperatura de 27°C com fotoperíodo 12/12 horas por 12 horas, onde se utilizou azul láctico para paralisar a germinação dos conídios.

Ao término do período de incubação, procedeu-se a avaliação em microscópio óptico, determinando-se o número de conídios germinados num total de 100 conídios, avaliados ao acaso. Considerou-se um conídio germinado, quando o tamanho do tubo germinativo encontrava-se maior ou igual ao tamanho do conídio.

Utilizou-se um delineamento inteiramente casualizado, sendo cada tratamento composto por seis repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), com comparação de médias através do teste de Tukey a 5% de probabilidade.

#### **4.4. Identificação molecular dos isolados de *Bacillus* spp.**

##### **4.4.1. Extração de DNA genômico**

O isolamento do DNA genômico foi realizado através de culturas bacterianas crescidas por 24 horas em placas de Petri contendo meio de cultura BDA. Células bacterianas foram transferidas para microtubos (2mL) contendo 100  $\mu$ L de água mili-Q, centrifugadas e o sobrenadante descartado para posterior utilização do kit de extração de DNA “Wizard Genomic DNA Purification Kit” Promega®. Após a extração, avaliou-se a quantificação e pureza das amostras de DNA através do equipamento 2000c NanoDrop.

##### **4.4.2. Amplificação do gene que codifica o 16S rRNA**

O gene 16S rRNA foi amplificado através da técnica de PCR a partir dos seguintes *primers* 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') e 1492R (5'-GGYTACCTTACGACTT-3'), conforme Lane (1991). A amplificação da região 16S rRNA por PCR foi feita em 13,5 $\mu$ L, sendo 0,3  $\mu$ L do *primer* 27F, 0,3 $\mu$ L do *primer* 1492R, 1  $\mu$ L de DNA genômico, 5,65  $\mu$ L de água miliQ autoclavada e 6,25  $\mu$ L de *Dream Taq* Sigma Aldrich® (Taq, MgCl<sub>2</sub> e dNTPs).

Os ciclos de amplificação da PCR foram 95°C durante 3 min, para a fase de desnaturação inicial; 27 ciclos de desnaturação a 94°C durante 30 s; 52°C durante 30 segundos, 72°C por 1 minuto e 40 segundos para extensão e a 72°C por 7 minutos para a fase de extensão final.

Os produtos de PCR foram purificados e sequenciados no Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO/UNESP, Jaboticabal/SP).

Para o sequenciamento utilizou-se os mesmos primers citados anteriormente, com o intuito de se obter a sequência completa da região 16S

rRNA. Com fim de se obter as espécies dos isolados, as sequencias de 1500pb obtidas foram alinhadas e comparadas com outras sequencias previamente descritas no GenBank do National Center for Biotechnology Information (NCBI), utilizando-se da ferramenta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), (ALTSCHUL et al., 1990).

#### **4.5. Controle da mancha marrom de alternaria *in vivo***

Para a realização dos ensaios *in vivo* foram utilizadas plantas de tangor Murcott [*Citrus reticulada* Blanco x *C. sinensis* Osbeck] enxertadas sobre limão Cravo (*Citrus limonia* Osbeck) ou citrumelo Swingle [*Citrus paradisi* Macfad cv. Duncan x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.] com 6 meses de idade.

##### **4.5.1. Produção de inóculo de *Alternaria alternata***

Conídios do fitopatógeno foram produzidos em meio de cultura, seguindo a metodologia descrita por Canihos et al. (1999). Colônias do fungo foram cultivadas em meio BDA e mantidas em estufa incubadora para B.O.D com fotoperíodo 12/12h a 27° C por sete dias. Após esse período, a superfície da cultura foi previamente raspada, com o auxílio de uma lâmina de microscopia estéril, para remoção do micélio e, em seguida, a cultura foi cortada em vários pedaços, de aproximadamente 4 mm de diâmetro. Cerca de 100 pedaços foram transferidos para cada placa contendo meio para esporulação, constituído de 30g de CaCO<sub>3</sub>, 20g de sacarose e 20 g de ágar por litro de água destilada. Adicionou-se dois mililitros de água destilada esterilizada em cada placa e as mesmas foram vedadas com Parafilm e incubadas em estufa incubadora para B.O.D com fotoperíodo de 12/12h, sob luz fluorescente a 27°C por três a quatro dias para produção de conídios. Os conídios foram coletados adicionando-se 10 mL de água destilada e esterilizada em cada placa de Petri e as colônias foram raspadas suavemente com um pincel, a suspensão foi filtrada em duas camadas de gaze esterilizada

para remoção dos fragmentos de micélio. A suspensão de conídios foi centrifugada uma vez por 20 minutos em 6000g e ajustada a  $10^5$  conídios/mL, com contagem em hemocitômetro.

#### **4.5.2. Teste de patogenicidade**

Antes da realização dos ensaios *in vivo*, foi efetuado um teste de patogenicidade do isolado de *Alternaria alternata* em folhas destacadas de tangor Murcott, previamente lavadas em água corrente. Cada folha foi inoculada com uma suspensão de 1 mL do fungo ( $1 \times 10^5$  conídios/mL), com borrifador de aspersão e depositadas em placas de Petri contendo papel de filtro com um chumaço de algodão molhado. As placas foram mantidas em estufa incubadora para B.O.D a 27°C com fotoperíodo 12/12 horas por 4 dias. As avaliações foram realizadas diariamente, durante cinco dias, pela observação dos sintomas da doença.

#### **4.5.3. Controle da mancha marrom de alternaria em folhas destacadas e, sob condições de casa de vegetação**

Ao todo foram realizados sete ensaios *in vivo*, sendo três em folhas destacadas (ensaio 1, 2 e 3) e quatro (ensaio 4, 5, 6 e 7) em plantas de tangor Murcott sob condições de casa de vegetação.

Para os ensaios com folhas destacadas adotou-se o seguinte procedimento: folhas jovens de 20-45 dias de idade, obtidas de plantas de tangor Murcott, foram lavadas em água corrente, padronizadas por tamanho e colocadas em placas de Petri contendo papel filtro e algodão (previamente embebido em água), estéreis (metodologia adaptada de Peever et al. 1999). Para a inoculação de cada folha foi utilizado 1 mL da suspensão do patógeno ( $1 \times 10^5$  conídios/mL), a qual foi pulverizada, com auxílio de um borrifador, na face abaxial das folhas. O tratamento com os diferentes isolados de *Bacillus* spp. foi realizado de forma preventiva (24 h antes da inoculação) e curativa

(24h após a inoculação), pulverizando uma concentração bacteriana de  $1 \times 10^7$  células/mL nas duas faces da folha do tangor.

Para os ensaios com mudas, em casa de vegetação, inicialmente foram realizadas as podas nas plantas, com o objetivo de forçar a brotação, e conseqüentemente, serem obtidas folhas jovens para a inoculação. A inoculação e os tratamentos com os diferentes isolados bacterianos seguiram a mesma metodologia descrita para as folhas destacadas, porém, após a inoculação com o fitopatógeno, as plantas foram submetidas à câmara úmida por 24 horas.

Os isolados bacterianos testados no ensaio 1 foram: ACBs: 08, 10,11, 15, 16, 21, 24, 25, 28, 48, 51, 56, 58, 63, 68, 69, 70, 72, 85, 90 e ACB-PB. Para o ensaio 2 foram utilizados os isolados ACBs: 17, 18, 19, 20, 22, 23, 26, 27, 41, 42, 46, 47 e ACB-AP3. Para o ensaio 3: ACBs: 01, 02, 07, 08, 13, 43, 44, 45, 52, 53, 54, 57 e 64. Para o ensaio 4, ACBs: 08, 10, 15, 21, 24, 48, 51, 68 70 e 85. Para o ensaio 5, ACBs: 01, 07, 18, 46, 57 e 64. Para o ensaio 6, ACBs: 01, 07, 08, 18, 57 e um tratamento químico com oxicleto de cobre em tangor Murcott enxertada em citrumelo Swingle. Para o ensaio 7, ACBs: 01, 07, 08, 18, 57 e um tratamento químico com oxicleto de cobre em tangor Murcott enxertada em limão cravo. Os ensaios 6 e 7 foram realizados a partir dos resultados obtidos em ensaios *in vitro* e *in vivo*.

As avaliações nos ensaios de folhas destacadas e mudas foram realizadas após 48 horas da inoculação de *A. alternata* e se estenderam diariamente por cinco dias (ensaio 1, 2 3), dez dias (ensaio 4), sete dias (ensaio 5), nove dias (ensaio 6) e nove dias (ensaio 7). Avaliou-se a severidade com o auxílio de uma escala de notas variando entre 0 e 9 (0-0%; 1-0,3%, 2-3,5%; 3-8% e, 4-15%, 5-34%, 6-61%, 7-80%, 8-90% e 9-97,0%) proposta por Martelli (2011), determinando-se a Área Abaixo da Curva do Progresso da Doença (AACPD) por meio da fórmula (SHANER & FINNEY,1977):

$$AUDPC = \sum_i^{n-1} \left( \frac{y_i + y_{i+1}}{2} \right) \times (t_{i+1} - t_i)$$



Onde  $n$ , é o número de avaliações,  $y$  representa os valores de severidade da doença e  $t$  o período de avaliação. A incidência da doença foi determinada pela porcentagem de folhas doentes.

Para todos os ensaios utilizou-se um delineamento inteiramente casualizado com três repetições para os ensaios de 1 a 3, três repetições para os ensaios 4 e 5, e duas repetições para os ensaios 6 e 7, respectivamente. Os resultados de Área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD) obtidos nos ensaios 1 a 3 foram transformados em  $x=\sqrt{x}$  e os resultados obtidos nos ensaios 4, 5, 6 e 7 transformados em  $x=\sqrt{x+0,5}$  para AACPD e  $\arcsen\sqrt{x}/100$  para incidência, respectivamente. Todos os ensaios foram submetidos à análise de variância (ANOVA), os ensaios 6 e 7 foram submetidos a análise fatorial e a comparação de médias foi realizada através do teste de Tukey a 5% de probabilidade.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Interações *in vitro* entre *Bacillus* spp. e *Alternaria alternata*

#### 5.1.1. Influência dos isolados de *Bacillus* spp. no crescimento micelial de *Alternaria alternata* através da técnica de cultivo pareado

Dentre os 47 isolados bacterianos testados, 14 foram capazes de inibir, significativamente, o crescimento micelial de *A. alternata*, apresentando mais de 25% de inibição (Tabela 1 e 2). Os melhores resultados foram obtidos pelos isolados ACB-44, ACB-51, ACB-69 e ACB-85, com porcentagens de inibição do crescimento do fungo superiores a 75%. Nesse estudo, o crescimento micelial de *A. alternata* foi impedido devido à produção de substâncias antifúngicas pelos isolados de *Bacillus* spp. como pode-se notar na Figura 1, onde observa-se um halo de inibição na colônia do fitopatógeno quando pareada com ACB-51.

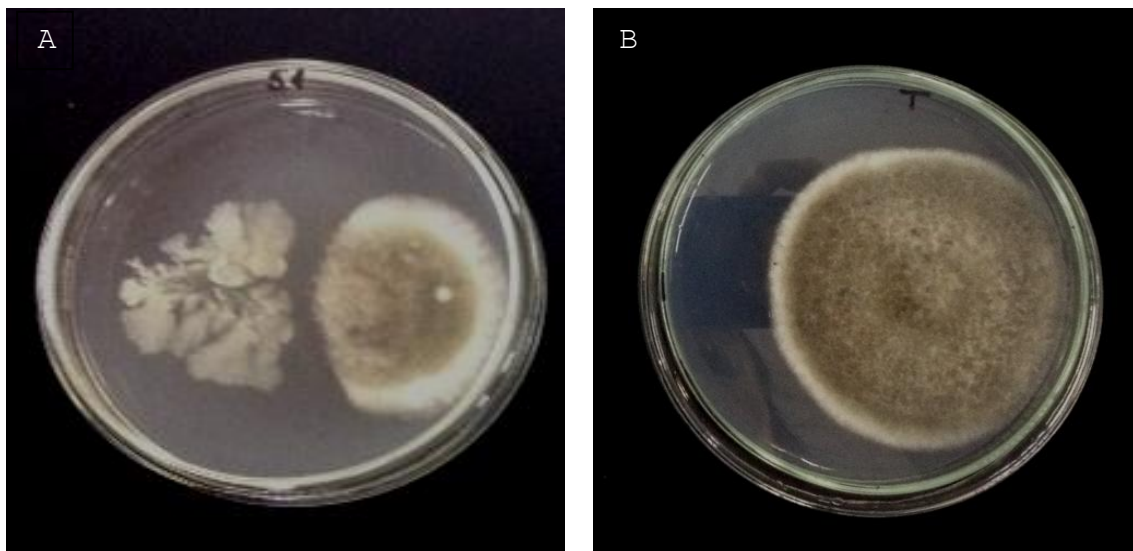


Figura 1. A- Cultivo pareado entre *Bacillus* sp. ACB-51 e *Alternaria alternata* B- Testemunha -crescimento do fitopatógeno na ausência da bactéria.

**Tabela 2.** Diâmetro médio (cm) e porcentagem de inibição da colônia de *Alternaria alternata*, após cultivo pareado com diferentes isolados de *Bacillus* spp. Ensaios 1 e 2.

Tratamentos	Diâmetro médio (cm)	Inibição (%)	Tratamentos	Diâmetro médio (cm)	Inibição (%)
Testemunha	6,7a <sup>(1)</sup>	-	Testemunha	6,82a	-
ACB-08	5,15ab	23,13	ACB-02	2,89cde	57,62
ACB-10	5,53ab	17,46	ACB-09	5,02abcd	26,39
ACB-11	5,33ab	20,45	ACB-13	5,07abcd	25,66
ACB-15	5,7ab	14,93	ACB-17	5,66ab	17,01
ACB-16	5,23ab	21,94	ACB-19	5,52ab	19,06
ACB-21	4,98ab	25,67	ACB-20	5,61ab	17,74
ACB-24	5,7ab	14,93	ACB-22	5,38ab	21,11
ACB-25	5,7ab	14,93	ACB-23	5,32ab	21,99
ACB-28	5,3ab	20,90	ACB-26	5,26ab	22,87
ACB-48	2,91cd	56,57	ACB-27	5,09abcd	25,37
ACB-51	1,27d	81,04	ACB-41	4,91abcd	28,01
ACB-56	4,33bc	35,37	ACB-42	4,92abcd	27,86
ACB-58	5,4ab	19,40	ACB-43	4,79abcd	29,77
ACB-63	5,2ab	22,39	ACB-44	1,10e	83,87
ACB-68	5,38ab	19,70	ACB-45	5,18abc	24,05
ACB-69	1,62d	75,82	ACB-47	3,97bcd	41,79
ACB-70	2,85cd	57,46	ACB-52	2,82de	58,75
ACB-72	5,4ab	19,40	ACB-53	5,14abcd	24,63
ACB-85	1,25d	81,34	ACB-54	5,18abc	24,05
ACB-90	4,18bc	37,61	ACB-AP3	4,06bcd	40,47
ACB-PB	4,92ab	26,57	-	-	-

<sup>(1)</sup> Médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem entre si, pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

**Tabela 3.** Diâmetro médio (cm) e porcentagem de inibição da colônia de *Alternaria alternata*, após cultivo pareado com diferentes isolados de *Bacillus* spp. Ensaio 3.

Tratamentos	Diâmetro médio (cm)	Inibição (%)
Testemunha	7,66a <sup>(1)</sup>	-
ACB-01	5,55ab	27,49
ACB-07	5,83ab	23,94
ACB-18	5,76ab	24,80
ACB-46	4,43b	42,17
ACB-57	5,49b	28,33
ACB-64	5,76ab	24,80

<sup>(1)</sup> Médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem entre si, pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

### 5.1.2. Produção de compostos voláteis pelos isolados de *Bacillus* spp.

Dentre os 47 isolados de *Bacillus* spp. testados para a produção de compostos antifúngicos voláteis, 13 foram eficientes na inibição do crescimento do fitopatógeno. Os melhores resultados foram obtidos no ensaio 1 através dos isolados ACB-08, ACB-10, ACB-21, ACB-48, ACB-63, ACB-68 e ACB-51, com valores de inibição variando de 20% a 30% (Tabela 4). No segundo ensaio, nenhum dos isolados produziu compostos antifúngicos voláteis suficientes para inibir o crescimento micelial de *A. alternata*. Já no terceiro ensaio, todos os isolados de *Bacillus* spp. produziram compostos antifúngicos voláteis que inibiram o crescimento de *A. alternata*, com valores de inibição de 20% (ACB-18) a 31% (ACB-07) (Tabela 5).

**Tabela 4.** Efeito dos compostos voláteis, produzidos por diferentes isolados de *Bacillus* spp., na porcentagem de inibição da colônia de *Alternaria alternata*. Ensaio 1 e 2.

Tratamentos	Diâmetro médio (cm)	Inibição (%)	Tratamentos	Diâmetro médio (cm)	Inibição (%)
Testemunha	6,89a <sup>(1)</sup>	-	Testemunha	5,72a	-
ACB-08	5,21 b	24,38	ACB-02	5,44a	4,60
ACB-10	5,40 b	21,63	ACB-09	5,50a	3,51
ACB-11	5,57 ab	19,16	ACB-13	4,83a	15,26
ACB-15	5,93 ab	13,93	ACB-17	5,05a	11,40
ACB-16	6,62 ab	3,92	ACB-19	5,51a	3,33
ACB-21	5,29 b	23,22	ACB-20	5,50a	1,75
ACB-24	5,61 ab	18,58	ACB-22	5,49a	3,68
ACB-25	5,96 ab	13,50	ACB-23	5,62a	1,40
ACB-28	5,59 ab	18,87	ACB-26	5,56a	2,46
ACB-48	5,50 b	20,17	ACB-27	5,53a	3,51
ACB-51	4,84 b	29,75	ACB-41	5,57a	2,28
ACB-56	5,56 ab	19,30	ACB-42	4,71a	17,37
ACB-58	5,61 ab	18,58	ACB-43	5,46a	4,21
ACB-63	5,24 b	23,95	ACB-44	5,15a	9,65
ACB-68	4,81 b	30,19	ACB-45	5,58a	2,11
ACB-69	5,82 ab	15,53	ACB-47	5,61a	1,58
ACB-70	5,60 ab	18,72	ACB-52	5,22a	8,42
ACB-72	5,67 ab	17,71	ACB-53	5,28a	7,37
ACB-85	5,65 ab	18,00	ACB-54	5,56a	2,46
ACB-90	5,72 ab	16,98	ACB-AP3	5,37a	5,79
ACB-PB	5,63 ab	18,29			

<sup>(1)</sup>Médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem entre si, pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

**Tabela 5.** Efeito dos compostos voláteis, produzidos por diferentes isolados de *Bacillus* spp., na porcentagem de inibição da colônia de *Alternaria alternata*. Ensaio 3.

Tratamentos	Diâmetro médio (cm)	Inibição (%)
Testemunha	6,95a <sup>(1)</sup>	-
ACB-01	5,32b	23,50
ACB-07	4,77b	31,40
ACB-18	5,50b	20,90
ACB-46	5,17b	25,60
ACB-57	5,36b	22,90
ACB-64	5,43b	21,90

<sup>(1)</sup>Médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem entre si, pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

### 5.1.3. Avaliação da termoestabilidade dos metabólitos produzidos por *Bacillus* spp.

Os resultados obtidos através dos ensaios de produção de compostos antifúngicos termoestáveis por *Bacillus* spp. mostraram que 42 isolados inibiram, significativamente, o crescimento micelial de *A. alternata*, com valores de inibição que variaram de 32,30 (ACB-41) a 81,20% (ACB-23) (Tabelas 6 e 7).

**Tabela 6.** Efeito da produção de metabólitos termoestáveis por diferentes isolados de *Bacillus* spp. na porcentagem de inibição da colônia de *Alternaria alternata*. Ensaios 1 e 2.

Tratamentos	Diâmetro médio (cm)	Inibição (%)	Tratamentos	Diâmetro médio (cm)	Inibição (%)
<b>Testemunha</b>	6,80 a <sup>(1)</sup>	-	<b>Testemunha</b>	7,01a <sup>(1)</sup>	-
<b>ACB-08</b>	1,73 cd	74,56	<b>ACB-01</b>	2,19b	68,08
<b>ACB-10</b>	2,06 bcd	69,71	<b>ACB-07</b>	4,05ab	42,20
<b>ACB-11</b>	2,40 bc	64,71	<b>ACB-09</b>	3,23ab	53,90
<b>ACB-15</b>	2,23 bcd	67,21	<b>ACB-17</b>	2,63b	62,50
<b>ACB-16</b>	1,70 d	75,00	<b>ACB-18</b>	2,28b	67,50
<b>ACB-21</b>	1,92 bcd	71,76	<b>ACB-19</b>	3,92ab	44,10
<b>ACB-24</b>	1,98 bcd	70,88	<b>ACB-22</b>	1,43b	79,60
<b>ACB-25</b>	2,28 bcd	66,47	<b>ACB-23</b>	1,32b	81,20
<b>ACB-28</b>	2,20 bcd	67,65	<b>ACB-43</b>	2,86b	59,20
<b>ACB-48</b>	2,16 bcd	68,24	<b>ACB-45</b>	2,22b	68,30
<b>ACB-51</b>	2,16 bcd	68,24	<b>ACB-46</b>	2,69b	61,60
<b>ACB-56</b>	2,13 bcd	68,68	<b>ACB-52</b>	1,84b	73,80
<b>ACB-58</b>	2,32 bcd	65,88	<b>ACB-53</b>	1,50b	78,60
<b>ACB-63</b>	2,13 bcd	68,68	<b>ACB-57</b>	4,69ab	33,10
<b>ACB-68</b>	2,19 bcd	67,79	<b>ACB-64</b>	3,65ab	47,90
<b>ACB-69</b>	2,45 b	63,97			
<b>ACB-70</b>	2,06 bcd	69,71			
<b>ACB-72</b>	2,24 bcd	67,06			
<b>ACB-85</b>	2,12 bcd	68,82			
<b>ACB-90</b>	1,91 bcd	71,91			
<b>ACB-PB</b>	2,27 bcd	66,62			

<sup>(1)</sup> Médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem entre si, pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

**Tabela 7.** Efeito da produção de metabólitos termoestáveis por diferentes isolados de *Bacillus* spp. na porcentagem de inibição da colônia de *Alternaria alternata*. Ensaio 3.

Tratamentos	Diâmetro médio (cm)	Inibição (%)
Testemunha	5,73a <sup>(1)</sup>	-
ACB-02	2,54c	55,70
ACB-13	2,45c	57,20
ACB-20	2,33c	59,30
ACB-26	2,10c	63,40
ACB-27	2,83c	50,60
ACB-41	3,88b	32,30
ACB-42	1,90c	66,80
ACB-44	2,20c	61,60
ACB-47	2,34c	59,00
ACB-54	2,20c	61,60
ACB-AP3	2,81c	51,00

<sup>(1)</sup>Médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem entre si, pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

#### 5.1.4. Produção de metabólitos livres de células pelos isolados de *Bacillus* spp.

Nos ensaios de produção de metabólitos livre de células bacterianas, apenas o ACB-07 não produziu metabólitos livres de células em quantidade suficiente para inibir o crescimento da colônia de *A. alternata*. Os demais isolados bacterianos apresentaram valores de inibições da colônia do fitopatógeno que variaram de 42,20% (ACB-64) a 93,70% (ACB-20) (Tabelas 8 e 9).



**Tabela 8.** Efeito da produção de metabólitos livre de células por diferentes isolados de *Bacillus* spp. na porcentagem de inibição da colônia de *Alternaria alternata*. Ensaios 1 e 2.

Tratamento	Diâmetro médio (cm)	% de Inibição	Tratamento	Diâmetro médio (cm)	% de Inibição
Testemunha	7,74a <sup>(1)</sup>	-	Testemunha	6,01a <sup>(1)</sup>	-
ACB-08	2,32de	70,02	ACB-10	1,80bc	70,05
ACB-21	2,34de	69,76	ACB-11	2,30bc	61,73
ACB-51	2,4cde	68,98	ACB-15	1,66c	72,38
ACB-56	2,28de	70,54	ACB-16	2,41bc	59,90
ACB-58	2,44bcd	68,47	ACB-24	1,63c	72,88
ACB-63	2,9bc	62,52	ACB-25	2,26bc	62,40
ACB-68	2,08de	73,12	ACB-28	2,55b	57,57
ACB-69	2,97b	61,62	ACB-48	1,84bc	69,38
ACB-70	2,42cde	68,73	ACB-85	1,91bc	68,22
ACB-72	1,88e	75,70	ACB-90	1,82bc	69,72
-	-	-	ACB-PB	1,77bc	70,55

<sup>(1)</sup>Médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem entre si, pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

**Tabela 9.** Efeito da produção de metabólitos livre de células por diferentes isolados de *Bacillus* spp. na porcentagem de inibição da colônia de *Alternaria alternata*. Ensaios 3 e 4.

Tratamento	Diâmetro médio (cm)	Inibição (%)	Tratamento	Diâmetro médio (cm)	Inibição (%)
Testemunha	7,99a <sup>(1)</sup>	-	Testemunha	7,01a <sup>(1)</sup>	-
ACB-02	1,54d	80,70	ACB-01	3,15cde	55,10
ACB-13	1,55d	80,60	ACB-07	5,52ab	21,30
ACB-20	0,50e	93,70	ACB-09	2,98cdef	57,50
ACB-26	2,66bc	66,70	ACB-17	1,99def	71,60
ACB-27	1,91cd	76,10	ACB-18	2,63cdef	62,50
ACB-41	3,03b	62,10	ACB-19	2,32def	66,90

<b>ACB-42</b>	1,55d	80,60	<b>ACB-22</b>	1,78ef	74,60
<b>ACB-44</b>	1,51de	81,10	<b>ACB-23</b>	1,71ef	75,60
<b>ACB-47</b>	2,05bcd	74,30	<b>ACB-43</b>	1,58ef	77,50
<b>ACB-54</b>	1,71cd	78,60	<b>ACB-45</b>	2,22def	68,30
<b>ACB-AP3</b>	1,83cd	77,10	<b>ACB-46</b>	2,78cdef	60,30
			<b>ACB-52</b>	1,48f	78,90
			<b>ACB-53</b>	1,62ef	78,60
			<b>ACB-57</b>	3,48cd	50,40
			<b>ACB-64</b>	4,05bc	42,20

<sup>(1)</sup>Médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem entre si, pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

### 5.1.5 Influência dos agentes de controle biológico (ACBs) na germinação de *Alternaria alternata*

Dentre os 47 isolados bacterianos testados, 18 deles diferiram significativamente da testemunha, inibindo a germinação de conídios de *A. alternata*. Os melhores resultados foram obtidos através dos isolados ACB-01, ACB-02, ACB-11, ACB-16, ACB-26, ACB-27, ACB-28, ACB-42, ACB-47, ACB-51, ACB-53 ACB-56, ACB-63, ACB-69, ACB-72, ACB-90 e ACB-PB, com porcentagens de inibição da germinação dos conídios, que variaram de 41 % (ACB-21) a 95 % (ACB-26) (Tabelas 10, 11 12 e 13).

**Tabela 10.** Inibição da germinação de conídios de *A. alternata* por isolados de *Bacillus* spp. Ensaio 1.

Tratamentos	Conídios germinados	Inibição (%)
Testemunha	63,83a <sup>(1)</sup>	36,17
<b>ACB-11</b>	43,33b	56,67
<b>ACB-16</b>	43,67b	56,33
<b>ACB-28</b>	37,83b	62,17

<b>ACB-51</b>	39,83b	60,17
<b>ACB-56</b>	30,83b	69,17
<b>ACB-63</b>	39,67b	60,33
<b>ACB-69</b>	36,33b	63,67
<b>ACB-72</b>	29,83b	70,17
<b>ACB-90</b>	37,17b	62,83
<b>ACB-PB</b>	34,00b	66,00

<sup>(1)</sup> Médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem entre si, pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

**Tabela 11.** Inibição da germinação de conídios de *A. alternata* por isolados de *Bacillus* spp. Ensaio 2.

<b>Tratamentos</b>	<b>Conídios germinados</b>	<b>Inibição (%)</b>
<b>Testemunha</b>	34,00a <sup>(1)</sup>	66,00
<b>ACB-08</b>	21,00a	79,00
<b>ACB-10</b>	29,67a	70,33
<b>ACB-15</b>	19,33a	80,67
<b>ACB-21</b>	58,50b	41,50
<b>ACB-24</b>	20,17a	79,83
<b>ACB-25</b>	24,83a	75,17
<b>ACB-48</b>	24,50a	75,50
<b>ACB-58</b>	28,83a	71,17
<b>ACB-68</b>	22,67a	77,33
<b>ACB-70</b>	26,33a	73,67
<b>ACB-85</b>	34,00a	79,67

<sup>(1)</sup> Médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem entre si, pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

**Tabela 12.** Inibição da germinação de conídios de *A. alternata* por isolados de *Bacillus* spp. Ensaio 3.

<b>Tratamentos</b>	<b>Conídios germinados</b>	<b>Inibição (%)</b>
<b>Testemunha</b>	86,50a <sup>(1)</sup>	13,50
<b>ACB-01</b>	27,50bc	72,50
<b>ACB-02</b>	18,50bc	81,50
<b>ACB-07</b>	82,67a	17,33
<b>ACB-18</b>	88,00a	12,00
<b>ACB-19</b>	84,50a	15,50
<b>ACB-22</b>	82,33a	17,67
<b>ACB-26</b>	4,17c	95,83
<b>ACB-27</b>	25,67bc	74,33
<b>ACB-42</b>	24,33bc	75,67
<b>ACB-46</b>	82,17a	17,83
<b>ACB-47</b>	43,50b	56,50
<b>ACB-53</b>	8,17c	91,83
<b>ACB-57</b>	93,17a	6,83

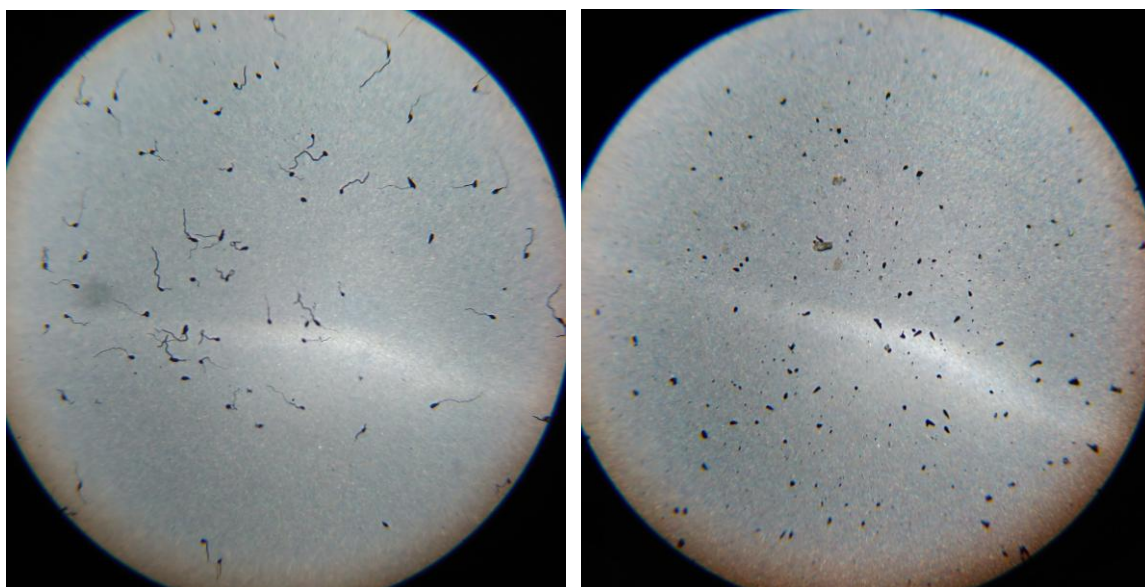
<sup>(1)</sup> Médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem entre si, pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

**Tabela 13.** Inibição da germinação de conídios de *A. alternata* por isolados de *Bacillus* spp. Ensaio 4.

<b>Tratamentos</b>	<b>Conídios germinados</b>	<b>Inibição (%)</b>
<b>Testemunha</b>	96,67ab <sup>(1)</sup>	3,33
<b>ACB-09</b>	95,33ab	4,67
<b>ACB-13</b>	99,33a	0,67
<b>ACB-17</b>	98,50ab	1,50
<b>ACB-20</b>	97,00ab	3,00
<b>ACB-23</b>	97,33ab	2,67

<b>ACB-41</b>	97,83ab	2,17
<b>ACB-43</b>	94,83b	5,17
<b>ACB-44</b>	96,67ab	3,33
<b>ACB-45</b>	96,17ab	3,83
<b>ACB-52</b>	99,00a	1,00
<b>ACB-54</b>	97,83ab	2,17
<b>ACB-64</b>	98,83ab	1,17
<b>ACB-AP3</b>	97,83ab	2,17

(<sup>1</sup>) Médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem entre si, pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.



**Figura 2. Inibição da germinação de conídios de *Alternaria alternata* por isolados de *Bacillus* spp. A) Testemunha e B) Conídios não germinados após tratamento com ACB-26.**

#### **5.1.6. Amplificação do gene que codifica o 16S rRNA**

Após a extração do DNA dos isolados, realizou-se a reação da PCR com os primers 27F e 1492R, obtiveram-se fragmentos de 1500pb. Estes

fragmentos foram purificados e sequenciados, o que resultou na identificação de 46 isolados de *Bacillus* spp.. Apenas um isolado bacteriano não foi possível obter identificação a nível de espécie. Através da base de dados do NCBI foi possível comparar as sequências obtidas no sequenciamento ao menos em nível de gênero e, na maioria dos casos, obteve-se similaridades que variaram de 80-99% de similaridade, em nível de espécie. Os resultados encontram-se na Tabela 14.

**Tabela 14.** Identificação de espécies com base nas sequencias do Genbank, NCBI.

<b>Isolado</b>	<b>Espécie</b>
<b>ACB-01</b>	<i>Bacillus subtilis</i>
<b>ACB-02</b>	<i>B. amyloliquefaciens</i>
<b>ACB-07</b>	<i>B. subtilis</i>
<b>ACB-08</b>	<i>B. amyloliquefaciens</i> <sup>(1)</sup>
<b>ACB-09</b>	<i>B. amyloliquefaciens</i>
<b>ACB-10</b>	<i>B. amyloliquefaciens</i>
<b>ACB-11</b>	<i>B. subtilis</i> <sup>(1)</sup>
<b>ACB-13</b>	<i>B. subtilis</i> <sup>(1)</sup>
<b>ACB-15</b>	<i>B. subtilis</i> <sup>(1)</sup>
<b>ACB-16</b>	<i>B. methylotrophicus</i> <sup>(1)</sup>
<b>ACB-17</b>	<i>B. subtilis</i> <sup>(1)</sup>
<b>ACB-18</b>	<i>B. subtilis</i>
<b>ACB-19</b>	<i>B. amyloliquefaciens</i> <sup>(1)</sup>
<b>ACB-20</b>	<i>B. amyloliquefaciens</i> <sup>(1)</sup>
<b>ACB-21</b>	<i>B. subtilis</i>
<b>ACB-22</b>	<i>B. subtilis</i>
<b>ACB-23</b>	<i>B. amyloliquefaciens</i>
<b>ACB-24</b>	<i>B. subtilis</i> <sup>(1)</sup>
<b>ACB-25</b>	<i>B. subtilis</i>

---

<b>ACB-26</b>	<i>B. velezensis</i>
<b>ACB-27</b>	<i>B. amyloliquefaciens</i>
<b>ACB-28</b>	<i>B. amyloliquefaciens</i>
<b>ACB-41</b>	<i>B. amyloliquefaciens</i> <sup>(1)</sup>
<b>ACB-42</b>	<i>B. subtilis</i>
<b>ACB-43</b>	<i>B. spp.</i>
<b>ACB-44</b>	<i>B. subtilis</i>
<b>ACB-45</b>	<i>B. subtilis</i>
<b>ACB-46</b>	<i>B. subtilis</i> <sup>(1)</sup>
<b>ACB-47</b>	<i>B. methylotrophicus</i> <sup>(1)</sup>
<b>ACB-48</b>	<i>B. amyloliquefaciens</i>
<b>ACB-51</b>	<i>B. subtilis</i>
<b>ACB-52</b>	<i>B. amyloliquefaciens</i> <sup>(1)</sup>
<b>ACB-53</b>	<i>B. subtilis</i>
<b>ACB-54</b>	<i>B. methylotrophicus</i> <sup>(1)</sup>
<b>ACB-56</b>	<i>B. amyloliquefaciens</i>
<b>ACB-57</b>	<i>B. subtilis</i>
<b>ACB-58</b>	<i>B. subtilis</i>
<b>ACB-63</b>	<i>B. methylotrophicus</i>
<b>ACB-64</b>	<i>B. methylotrophicus</i> <sup>(1)</sup>
<b>ACB-68</b>	<i>B. amyloliquefaciens</i> <sup>(1)</sup>
<b>ACB-69</b>	<i>B. amyloliquefaciens</i> <sup>(1)</sup>
<b>ACB-70</b>	<i>B. subtilis</i> <sup>(1)</sup>
<b>ACB-72</b>	<i>B. subtilis</i>
<b>ACB-85</b>	<i>B. subtilis</i>
<b>ACB-90</b>	<i>B. methylotrophicus</i>
<b>ACB-PB</b>	<i>B. amyloliquefaciens</i>
<b>ACB-AP3</b>	<i>B. subtilis</i>

---

<sup>(1)</sup> Isolados previamente identificados por FUJIMOTO, (2017).

### 5.1.7. Controle da mancha marrom de alternaria em folhas destacadas e, sob condições de casa de vegetação

Nos ensaios realizados a partir de folhas destacadas de tangor Murcott, os melhores tratamentos, quando se avaliou a severidade da doença, foram os isolados de *Bacillus* spp.: ACB-25, ACB-28, ACB-63, ACB-AP3, nas folhas tratadas preventivamente. Já nos tratamentos em que as mesmas foram tratadas de forma curativa, os melhores resultados foram com os isolados bacterianos ACB-18, ACB-43, ACB-52, ACB-57 e ACB-70 (Tabelas 15, 16 e 17).

**Tabela 15.** Área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD) de mancha marrom de alternaria (*Alternaria alternata*) em folhas destacadas de tangor Murcott. Ensaio 1.

Tratamento	Preventivo		Curativo	
	AACPD	Incidência	AACPD	Incidência
Testemunha	6,21ab	100	5,79a	100
ACB-08	5,02abc	100	5,32a	100
ACB-10	5,00abc	100	5,81a	100
ACB-11	4,06abcde	100	5,3a	100
ACB-15	4,61abcd	100	5,24a	100
ACB-16	4,38abcde	100	5,99a	100
ACB-21	3,37bcde	100	5,15a	100
ACB-24	3,62bcde	100	5,80a	100
ACB-25	1,11e	50	5,62a	100
ACB-28	2,21cde	75	5,25a	100
ACB-48	5,68ab	75	4,82a	100
ACB-51	5,81ab	100	4,58ab	100
ACB-56	4,77abc	100	6,07a	100
ACB-58	7,17a	100	6,62a	100
ACB-63	1,29de	50	5,44a	100
ACB-68	5,4abc	100	5,15a	100
ACB-69	5,42abc	100	4,87a	100
ACB-70	5,19abc	100	1,73b	50
ACB-72	5,26abc	100	6,03a	100
ACB-85	3,36bcde	100	5,64a	100
ACB-90	4,65abcd	100	5,26a	100
ACB-PB	5,88ab	100	5,68a	100

<sup>(1)</sup> Médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem entre si, pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. Dados transformados em  $x=\sqrt{x}$



**Tabela 16.** Área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD) para a mancha marrom de alternaria (*Alternaria alternata*) em folhas destacadas de tangor Murcott. Ensaio 2.

Tratamentos	Preventivo		Curativo	
	AACPD	Incidência (%)	AACPD	Incidência (%)
Testemunha	4,82a <sup>(1)</sup>	100	4,19a	100
ACB-17	2,89ab	75	1,14ab	100
ACB-18	4,82a	75	0b	100
ACB-19	1,15ab	50	3,02ab	100
ACB-20	3,14ab	100	2,62ab	100
ACB-22	3,60ab	100	2,07ab	100
ACB-23	4,21ab	75	1,97ab	100
ACB-26	1,20ab	100	1,77ab	100
ACB-27	2,81ab	100	1,87ab	100
ACB-41	3,33ab	75	3,55a	100
ACB-42	0,75ab	25	2,57ab	100
ACB-46	1,14ab	75	1,22ab	100
ACB-47	1ab	75	2,84ab	25
ACB-AP3	0,33b	50	2,53ab	100

<sup>(1)</sup>Médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem entre si, pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. Dados transformados em  $x=\sqrt{x}$

**Tabela 17.** Área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD) para a mancha marrom de alternaria (*Alternaria alternata*) em folhas destacadas de tangor Murcott. Ensaio 3.

Tratamentos	Preventivo		Curativo	
	AACPD	Incidência (%)	AACPD	Incidência (%)
Testemunha	3,46a <sup>(1)</sup>	100	4,10ab	100
ACB-01	1,56a	75	2,55bcd	100
ACB-02	2,48a	75	4,83a	100
ACB-07	0,67a	50	1,94bcde	100
ACB-09	2,2a	100	2,85abcd	100
ACB-13	3,54a	100	3,41abc	100
ACB-43	1,94a	75	1,77cde	100
ACB-44	1,27a	100	3,78abc	100
ACB-45	2,23a	100	3,20abcd	100

<b>ACB-52</b>	1,15a	75	1de	100
<b>ACB-53</b>	0,58a	25	2,70abcd	100
<b>ACB-54</b>	1,52a	75	2,51bcd	100
<b>ACB-57</b>	3,05a	75	0de	25
<b>ACB-64</b>	0,58a	50	2,04bcde	100

(<sup>1</sup>) Médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem entre si, pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. Dados transformados em  $x=\sqrt{x}$

Quando se avaliaram os dados de controle, sob condições de casa de vegetação (ensaios 4, 5, 6 e 7), verificou-se que, os isolados de *Bacillus* spp. testados no ensaio 4 não apresentaram controle da MMA, independente do modo de aplicação (Tabela 18).

**Tabela 18.** Área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD) para a mancha marrom de alternaria (*Alternaria alternata*) em condições de casa de vegetação em plantas de tangor Murcott. Ensaio 4.

Tratamentos	Preventivo		Curativo	
	AACPD	Incidência (%)	AACPD	Incidência (%)
<b>Testemunha</b>	3,01a ( <sup>1</sup> )	62,77a	3,15a	59,91a
<b>ACB-08</b>	2,71a	51,51a	1,76a	22,01a
<b>ACB-10</b>	2,79a	53,43a	2,96a	58,39a
<b>ACB-15</b>	2,55a	41,00a	3,00a	53,09a
<b>ACB-21</b>	1,98a	24,24a	2,24a	31,58a
<b>ACB-24</b>	2,45a	38,46a	2,60a	33,81a
<b>ACB-48</b>	2,98a	57,18a	2,59a	47,62a
<b>ACB-51</b>	2,27a	36,34a	2,91a	58,05a
<b>ACB-68</b>	1,84a	24,14a	2,70a	43,07a
<b>ACB-70</b>	2,46a	31,25a	2,63a	45,14a
<b>ACB-85</b>	2,32a	40,33a	2,23a	31,11a

(<sup>1</sup>) Médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem entre si, pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. Dados transformados em  $x=\sqrt{x}+0,5$  e  $\arcsen\sqrt{x}/100$

Os dados obtidos no ensaio 5 mostraram que os isolados ACB-07, ACB-18 e ACB-57, aplicados preventivamente, diferiram, significativamente, do

tratamento testemunha com valores de severidade da doença menores. Quando se avaliou a incidência, nenhum dos agentes de biocontrole testado diferiu da testemunha. Quando os isolados da bactéria foram aplicados de forma curativa, neste ensaio, os mesmos não foram eficientes para o controle de *A. alternata* em plantas de tangor Murcott (Tabela 19).

**Tabela 19.** Área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD) para a mancha marrom de alternaria (*Alternaria alternata*) em condições de casa de vegetação em plantas de tangor Murcott. Ensaio 5.

Tratamentos	Preventivo		Curativo	
	AACPD	Incidência (%)	AACPD	Incidência (%)
Testemunha	3,33a <sup>(1)</sup>	76,7a	3,04a	70a
ACB-01	1,85ab	23,3a	2,20a	50a
ACB-07	1,39b	16,7a	3,58a	56,67a
ACB-18	1,49b	36,7a	1,36a	16,67a
ACB-46	2,88ab	53,3a	2,39a	26,67a
ACB-57	1,31b	23,3a	1,75a	36,67a
ACB-64	2,90ab	50,0a	2,22a	40a

<sup>(1)</sup>Médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem entre si, pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. Dados transformados em  $x = \sqrt{x} + 0,5$  e  $\arcsen \sqrt{x}/100$

Quando se avaliou os dados das plantas de tangor Murcott enxertadas em citrumelo Swingle verificou-se que, quando as plantas foram tratadas preventivamente com os diferentes isolados de *Bacillus*, o tratamento com ACB-08 proporcionou o menor tamanho de lesões, não diferindo estatisticamente do tratamento químico e foram eficientes em diminuir a porcentagem de folhas doentes. Por outro lado, quando as plantas foram tratadas depois da inoculação do fitopatógeno, os tratamentos com ACB-01 e ACB-07 promoveram, significativamente, os menores tamanhos das lesões e 100% de folhas sadias (Figura 3).

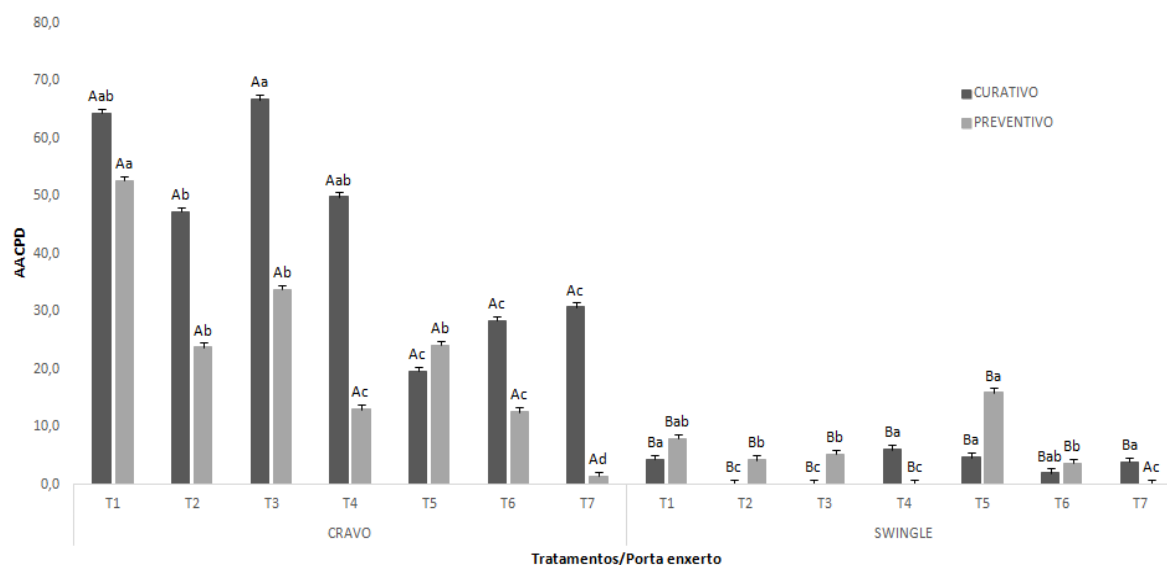


Figura 3. Avaliações de área abaixo da curva do progresso da doença entre os isolados de *Bacillus* spp. e *A. alternata*, modo de aplicação (preventivo e curativo) e tipos de porta enxertos de tangor Murcott. As médias seguidas pela mesma letra, dentro de cada interação, não diferem entre si (Teste de Tukey – 5%); letras maiúsculas: entre o modo de aplicação e tratamentos; letras minúsculas: entre os porta-enxertos e modo de aplicação e barra de erro: entre porta-enxertos. T1: testemunha, T2: ACB-01, T3: ACB-07, T4: ACB-08, T5: ACB-18, T6: ACB-57 e T7: tratamento químico.

Quando as plantas de tangor Murcott eram enxertadas em limão cravo (Ensaio 7), notou-se maior suscetibilidade das plantas à mancha marrom de alternaria. No entanto, pode se notar, também, melhor desempenho dos isolados de *Bacillus* spp. no biocontrole, quando as plantas foram tratadas preventivamente, onde com exceção do ACB-18, todos os isolados proporcionaram, estatisticamente, os menores tamanhos de lesões. Quando se avalia a incidência da doença, o ACB-08 foi o que melhor controlou a doença. Já no tratamento curativo, com exceção do ACB-07 e ACB-08, os demais tratamentos diferiram estatisticamente do tratamento controle, diminuindo o tamanho das lesões da MMA, porém, somente o ACB-18 diminuiu a porcentagem de folhas lesionadas (Figura 4).

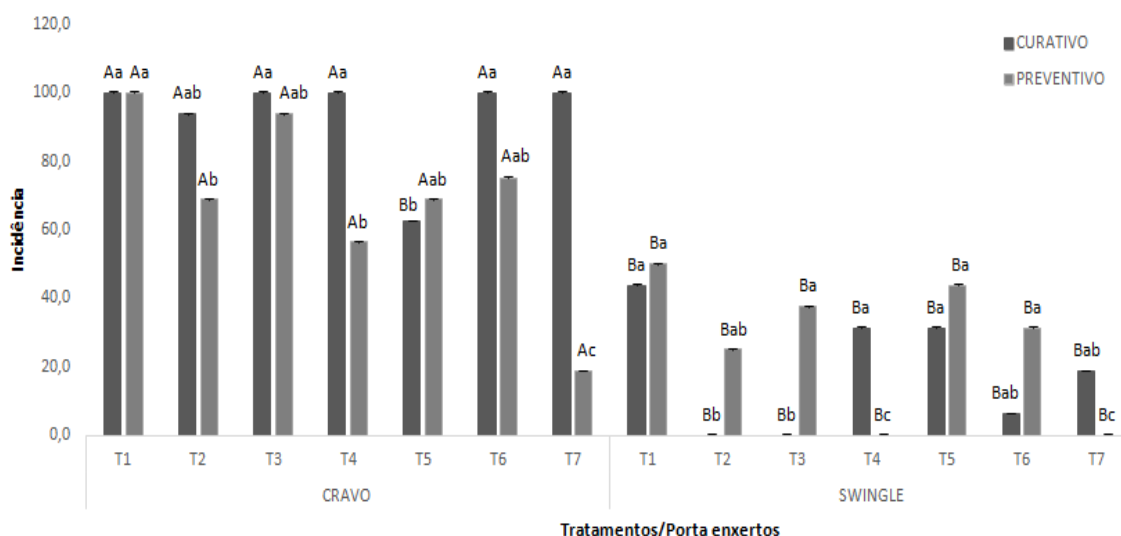


Figura 4. Avaliações de incidência entre os isolados de *Bacillus* spp. e *A. alternata*, modo de aplicação (preventivo e curativo) e tipos de porta enxertos de tangor Murcott. As médias seguidas pela mesma letra, dentro de cada interação, não diferem entre si (Teste de Tukey – 5%); letras maiúsculas: entre o modo de aplicação e tratamentos; letras minúsculas: entre os porta-enxertos e modo de aplicação e barra de erro: entre porta-enxertos. T1: testemunha, T2: ACB-01, T3: ACB-07, T4: ACB-08, T5: ACB-18, T6: ACB-57 e T7: tratamento químico.

Nota-se que, quando as plantas de citrumelo Swingle foram tratadas com *Bacillus* spp., o porta-enxerto mostrou-se mais tolerante à doença, quando comparado com a plantas enxertadas em limão cravo.

## 6. DISCUSSÃO

No presente estudo, isolados de *Bacillus* spp. foram avaliados quanto à sua potencialidade *in vitro* e *in vivo* para o controle de *Alternaria alternata*.

Os resultados *in vitro* mostraram que a maioria desses isolados afeta o desenvolvimento do fitopatógeno produzindo algum tipo metabólito, sendo, a antibiose um dos prováveis mecanismos de ação desse gênero de bactéria. De acordo com Chaurasia et al. (2004), o antagonismo é caracterizado por proporcionar a produção de uma variedade de compostos de origem microbiana, como por exemplo, bacteriocinas, enzimas, substâncias tóxicas, voláteis, etc. No respectivo estudo, com exceção do ACB-07 que produziu apenas metabólitos voláteis, os demais produziram substâncias livres de células e a maioria das substâncias suportou a alta temperatura. Segundo Kupper et al. (2003), esse gênero de bactéria e, em especial a espécie *B. subtilis* torna-se um excelente agente de controle biológico por apresentar capacidade para produzir metabólitos capazes de suportarem altas temperaturas, considerando a possibilidade da formulação de um bioproduto.

Outros autores corroboram com os resultados obtidos no presente estudo. Velasco et al. (2016), em estudos realizados com *Bacillus* spp., relataram que bactérias antagônicas inibiram, significativamente, o crescimento micelial de *A. alternata*, *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea*, *Penicillium crustosum* e *Aspergillus nidulans*, ressaltando que *Bacillus methylotrophicus* foi o mais eficiente entre eles e que produz compostos bioativos responsáveis por sua atividade antagônica. Souza et al. (2015), ao testarem 113 isolados de *Bacillus* spp. verificaram inibições no crescimento de *Colletotrichum lindemuthianum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Corynespora cassiicola*, *Fusarium solani* pelos isolados bacterianos BREI-92 e BREIII-107. Kupper, et al. (2003), comprovaram a eficiência de sessenta e oito isolados de *Bacillus* spp. na redução do tamanho da colônia de *Colletotrichum acutatum*. Li et al. (2015), ao testarem diferentes concentrações de filtrados bacterianos de *Bacillus megaterium* comprovou que altas concentrações de filtrados (acima de 20% v/v) inibem o crescimento micelial de *A. alternata*.

Com relação à porta enxertos utilizados nos experimentos *in vivo*, pode-se constatar que ao realizar aplicações em plantas enxertadas em citrumelo Swingle, as mesmas apresentavam maior tolerância ao aparecimento de sintomas de *A. alternata*. Quando o experimento foi realizado em plantas enxertadas em porta enxerto limão cravo os sintomas de MMA foram mais evidentes. Os resultados apresentados neste estudo sugerem uma maior tolerância à doença, quando plantas de tangor Murcott são enxertadas em citrumelo Swingle. No entanto, o desempenho dos isolados de *Bacillus spp.*, como agentes de controle biológico, foi mais efetivo em plantas enxertadas em limão cravo, mostrando as diferenças de interações planta-microrganismo nos porta enxertos. Dentro desse contexto, pelos resultados de controle *in vivo* foi possível verificar que cinco isolados de *Bacillus spp.* apresentaram controle da MMA, sendo eles ACB-01, ACB-07, ACB-08, ACB-18 e ACB-57.

Nem sempre os resultados de controle obtidos em folhas destacadas com os diferentes isolados bacterianos se repetiram nos ensaios de casa de vegetação. ACB-01, ACB-18 e ACB-57, que foram eficientes em casa de vegetação, não foram agentes em potencial para o controle da doença em folhas destacadas.

A ação preventiva dos isolados de *Bacillus spp.*, em sua maioria, *Bacillus subtilis* (ACB-01, ACB-08 e ACB-57), em plantas de tangor Murcott enxertas em limão Cravo, indica a possibilidade de indução de resistência, como mecanismos de ação dessa espécie de bactéria. Este fato corrobora, parcialmente, com o estudo de Shiomi et al. (2006). Segundo os autores, os isolados de *Bacillus spp.* TF2-IIc, TF7-IIa, TG4-Ia e TG11-IIa, induziram resistência a *Hemilea vastatrix* em café, quando aplicados 72 ou 24 antes ou, simultaneamente à aplicação do fitopatógeno. Behairy et al. (2014) obtiveram resultados positivos no controle de *Alternaria spp.* em fava, utilizando isolados de *B. subtilis* e *B. lechniformis* aplicados preventivamente.

Park et al. (2013), relataram que isolados de *Bacillus vallismortis* BS07 apresentaram indução de resistência sistêmica por isolados que previamente estavam relacionados a síntese de antibióticos. Os isolados controlaram *in vivo*

os fitopatógenos *Pectobacterium carotovorum*, *Phytophthora capsici* e *Colletotrichum acutatum* em pimenta.

No presente estudo, nove isolados de *Bacillus* spp. foram eficientes no controle da doença em folhas destacadas, porém, quando alguns destes foram testados em casa de vegetação, não apresentaram controle. Esses resultados corroboram com os obtidos por outros autores, Lee et al. (2008) relataram que alguns isolados de *Bacillus* spp. (R13 e R33) foram mais eficientes para o controle de *Phytophthora capsici*, em pimenta vermelha, nos ensaios de casa de vegetação do que quando aplicados em folhas destacadas. Por outro lado, Melnicki et al. (2008) afirmaram que a utilização da metodologia de folhas destacadas ajudou a selecionar potenciais isolados para realização de experimentos em casa de vegetação, devido ao rápido desenvolvimento da doença nesse tipo de modelo experimental. Não obstante, Tahi et al. (2006) utilizaram discos de folha destacada de cacau para selecionar genótipos resistentes de *Phytophthora* spp. e através disso, correlacionar a resistência em condições de campo.

Com a realização desse trabalho foi possível constatar que o resultado encontrado a partir de experimentos em folha destacada, com diferentes isolados de *Bacillus* spp., não foi eficaz quanto a seleção de microrganismos para os experimentos em casa de vegetação.

Com relação aos mecanismos de ação, os isolados ACB-01, ACB-07, ACB-08, ACB-18 e ACB-57 com potencial de controle da doença, produziram compostos voláteis. Quatro deles (ACB-01, ACB-08, ACB-18 e ACB-57), além de compostos voláteis, produziram metabólitos livres de células e, tais substâncias, com exceção das produzidas por ACB-57, mantiveram suas atividades antagônicas até mesmo em alta temperatura. Vários autores sugerem a produção de metabólitos produzidos por *Bacillus* spp., Fujimoto & Kupper (2016), ao testarem o isolado ACB-18 contra o fungo *Phyllosticta citricarpa*, verificaram a produção de compostos voláteis pela bactéria que inibiram em 42% o tamanho da colônia do fitopatógeno. Chaurasia et al. (2005) testaram a produção de compostos voláteis para o biocontrole de *A. alternata*, *Cladosporium oxysporum*, *Fusarium oxysporum*, *Paecilomyces lilacinus*,



*Paecilomyces variotii*, e *Pythium afertile* através de isolados de *B. subtilis*. Os autores mencionam inibições de unidades formadoras de colônia de *A. alternata* em torno de 78%, enquanto que, no respectivo estudo as inibições da colônia do patógeno foram em torno de 24, 31, 24, 21 e 23% pelos compostos voláteis produzidos por ACB-01, ACB-07, ACB-08, ACB-18 E ACB-57, respectivamente.

Os ensaios *in vitro* e *in vivo* realizados neste estudo tiveram como objetivos selecionar, avaliar e entender a atividade antagônica de diferentes isolados de *Bacillus* spp. contra o fitopatógeno *Alternaria alternata* e, conseqüentemente, buscar o controle da mancha marrom de alternaria. Durante os testes *in vitro*, foi possível verificar que alguns isolados como ACB 46, ACB-48 e ACB-51 apresentam porcentagens de inibições nas colônias de *A. alternata* em todos os testes relacionados à produção de metabólitos e do cultivo pareado. No entanto, quando os mesmos foram testados em plantas de tangor, sob condições de casa de vegetação, para o controle da doença, não foram eficientes. Neste contexto, Kupper et al. (2003) relataram que, quando suspensões de células do antagonista são aplicadas nas plantas, muitas vezes não possuem a mesma eficiência de controle que apresentavam em condições laboratoriais, uma vez que, no campo, os antagonistas podem não encontrar as mesmas condições favoráveis para seu desenvolvimento.

Neste estudo foi possível evidenciar o potencial de isolados de *Bacillus* spp. para o controle da mancha marrom de alternaria, porém, é indispensável a realização de novas pesquisas para se avaliar a eficiência da bactéria sob condições de campo e a viabilidade de formulações a base deste microrganismo para o controle da doença.

## 7. CONCLUSÕES

De acordo com os dados obtidos nesse trabalho pode-se concluir que:

- a) Os isolados de *Bacillus* spp. foram capazes de produzir substâncias antifúngicas, em quantidades suficientes, para inibir o crescimento micelial de *Alternaria alternata*; sendo a antibiose, o possível mecanismo de ação adotado pela bactéria;
- b) Dentre as espécies de *Bacillus* spp. identificadas nesse estudo, vinte e três pertencem à *B. subtilis*, quinze foram identificadas como *B. amyloliquefaciens*, sete *B. methylotrophicus*, uma *B. velezensis* e uma não foi identificada a nível de espécie (*Bacillus* sp.).
- c) Os isolados de *B. subtilis* (ACB-01, ACB-07, ACB-18 e ACB-57) e *B. amyloliquefaciens* (ACB-08) apresentaram potencial para o controle de *Alternaria alternata*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKIMITSU, K.; PEEVER, T. L.; TIMMER, L. W. Molecular, ecological and evolutionary approaches to understanding *Alternaria* diseases of citrus. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 4, n. 6, p. 435-446, 2003.

ALI, G.S.; NORMAN, D.; EL-SAYED A. S. Soluble and volatile metabolites of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPRs): role and practical applications in inhibiting pathogens and activating induced systemic resistance (ISR). In: **Advances in Botanical Research**. Academic Press, v.75, p. 241-284, 2015.

ALTSCHUL, S.F; GISH, W.; MILLER, W.; MEYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 215, p. 403-410, 1990.

AZEVEDO; F. A.; POLYDORO, D. A.; BASTIANEL, M.; KUPPER, K. C.; STUART, R. M.; COSTA, F. P.; PIO, R. M. Resposta de diferentes genótipos de tangerinas e seus híbridos à inoculação *in vitro* e *in vivo* de *Alternaria alternata*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, p. 1-10. 2010.

BAKER, R., Mechanism of biological control of soil borne pathogens. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v.6, p. 263–294, 1968.

BARNETT, H.L. & HUNTER, B.B. **Illustrated Genera of Imperfect Fungi**. American Phytopathological Society, 4 ed., 1998, 240p.

BASTIANEL, M.; AZEVEDO, F. A.; CRISTOFANI, M.; MACHADO, M. A. Mancha marrom de alternaria: uma interação fungo, toxina e tangerina. **Laranja**. v, 26, p. 323-336, 2005.

BASTIANEL, M.; SIMONETTI, L. M.; SCHINOR, E. H.; DE GIORGI, R. O.; DE NEGRI, J. D.; GOMES, D. N.; AZEVEDO, F. A.. Avaliação do banco de

germoplasma de mexericas com relação às características físico-químicas e suscetibilidade à mancha marrom de alternária. **Bragantia**, v. 73, n.1, p. 23-31, 2014.

BEHAIRY, M. H.; SOBHY, H. M.; ABBAS, M.; SABADA, K. H. A.; MOURAD, Y. Alternaria leaf spot disease control on faba bean in Egypt. **J. Plant Prot. and Path.**, v. 5, n 1, p.119-130, 2014.

BELLA, P.; GUARINO, C. R.; CATARA, A. Severe infections of *Alternaria* spp. on a mandarin hybrid. **Journal of Plant Pathology**, Bari, v. 83, p. 231, 2001.

BETTIOL, W. S. M. L.; BRANDAO, M. S. B. Controle da ferrugem do cafeeiro com produtos à base de *Bacillus subtilis*. **Summa Phytopathologica**, v. 20, n. 2, p. 119-122, 1994.

BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Embrapa Meio Ambiente. Jaguariuna, 2009.

BONMATIN, J.M.; LAPREVOTE, O.; PEYPOUX, F. Diversity among microbial cyclic lipopeptides: iturins and surfactins. Activity–structure relationships to design new bioactive agents. **Comb Chem High Throughput Screen**, v 6, p. 541–556, 2003.

BROCK, T. D.; MADIGAN, M.T. **Biology of Microorganisms**. 6th edn. NY: Prentice Hall, 1991.

CANIHOS, Y.; ERKILIC, A.; TIMMER, L. W. First reporter of Alternaria Brown spot of *Minneola* tangelo in Turkey. **Plant disease**. St. Paul, v. 81, n. 10, p. 1214-1214 1997.

CANIHOS, Y.; PEEVER, T. L.; TIMMER, L. W. Temperature, leaf wetness, and isolate effects on infection of *Minneola tangelo* leaves by *Alternaria* sp. **Plant Disease**, v 83, p. 429-433, 1999.

CAPORAL, F. R.; COSTABEBER, J. A. Agroecologia: enfoque científico e estratégico. **Agroecologia e desenvolvimento rural sustentável**, v. 3, n. 2, p. 13-16, 2002.

CASTRO-CAICEDO, B. L.; LEGUIZAMON-C., LOPEZ-R, J. A. La mancha foliar de lós cítricos em la zona cafetera. **Avances Técnicos Cenicafé**, Chinchiná, v. 198, p. 26, 1994.

CHAURASIA, B.; PANDEY, A.; PALNI, L. M. S.; TRIVEDI, P.; KUMAR, B.; COLVIN, N. Diffusible and volatile compounds produced by an antagonistic *Bacillus subtilis* strain cause structural deformations in pathogenic fungi in vitro. **Microbiological research**, v. 160, n. 1, p. 75-81, 2005.

COLTURATO, A. B.; PAULOSI, T.; VENÂNCIO, W. S.; FURTADO, E. L. Eficiência e custo do controle químico da mancha de alternaria em tangor murcote. **Summa Phytopathologica**, v. 35, n. 3, p. 210-215, 2009.

DAVIES, F. S.; ALBRIGO, L. G. **Crop production in horticulture 2**. Citrus. London, 1994.

DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* III. Hyphal interactions. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 57, p. 359-363, 1971.

DOIDGE E. M. A study on some *Alternarias* affecting Citrus in South Africa. **Science Bulletin 69**, The Government Printer, Pretoria. 1929, 29 p.

ELLIS, M. B.; HOLLIDAY, P. *Alternaria citri*. Commonwealth Mycological Institute, Kew: Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria, 1970, 242p.

FAOSTAT. **Value of agricultural production**. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QV>. Acessos em 07/03/2018.

FAOSTAT **Countries by commodities: Tangerines, mandarins, clementines, satsumas 2013**. Disponível em: [http://www.fao.org/faostat/en/#rankings/countries\\_by\\_commodity](http://www.fao.org/faostat/en/#rankings/countries_by_commodity). Acessos em: 13/09/2017.

FEICHETENBERGER, E.; SPÓSITO, M. B.; PIO, R. M.; CASTRO, J. L. Seleção de híbridos de tangerinas e híbridos de citros para tolerância à mancha marrom de alternaria (*Alternaria alternata* Keissler). **Citricultura Atual**, v. 45, p. 8-10, 2005.

FIGUEIREDO, J. O. Variedades comerciais. In: RODRIGUES, O.; VIÉGAS, F.; POMPEU JÚNIOR, J.; AMARO, A. S. (Ed.). **Citricultura brasileira**. 2 ed. Campinas, SP. Fundação Cargill, v.1, p. 228-264, 1991.

FRAVEL, D. R. Commercialization and implementation of biocontrol. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v. 43, p. 337-359, 2005.

FRIGHETTO, R. T. S.; MELO, I. S. **Produção de antibióticos por microrganismos**. Embrapa Meio Ambiente (ALICE) Jaguariúna, 1995.

FUJIMOTO, A.; KUPPER, K. C. Production of Antifungal Compounds and Hydrolytic Enzymes by *Bacillus* spp. As Mechanisms of Action against *Phyllosticta citricarpa*. **IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science**, v.9, p. 19-27, 2016.

GARDNER, J. M.; KONO, Y.; CHANDLER, J. L. Biossay and host-selectivity of *Alternaria citri* toxins affecting rough lemon and mandarins. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 29, p. 293-304, 1986.

GLIESSMAN, S. R. **Agroecologia: processos ecológicos em agricultura sustentável**. 4. Ed. Ed. da Univ. Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, 2009, 654p.

GOES, A.; MONTES de OCA, A. G.; REIS, R. F. Ocorrência de la mancha de *Alternaria* em mandarina “Dancy” em el estado de Rio de Janeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, supl., p. 386, 2001.

HERRERA, L. La mancha parda de los cítricos en Cuba. **Levante Agrícola**, Valência, v. 31, n. 229, p. 49-50, 1992.

IBGE. **Sistema IBGE de Recuperação Automática**. SIDRA, 2017. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/Tabela/1613#resultado> . Acessos em: 28/09/2017.

IBGE. **Levantamento sistemático da produção agrícola**, 2018. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1618#resultado>> Acessos em 07/03/2018.

Instituto de Economia Aplicada (IEA), **Dinâmica econômica da citricultura paulista**. Disponível em: <<http://www.iea.sp.gov.br/out/boletim/n14.pdf>> Acessos em 07/03/2018.

KIELY, T. B. Brown spot of Emperor mandarin. **Agricultural Gazette of new South Wales**, Sidney, v. 75, n. 2, p. 854-856, 1964.

KIST, B. B.; SANTOS, C. E.; FILTER, C. F. **Anuário brasileiro de citros 2016**. Santa Cruz do Sul : Editora Gazeta Santa Cruz, 2016, 64 p.

KLEIN, M. N., & KUPPER, K. C. Biofilm production by *Aureobasidium pullulans* improves biocontrol against sour rot in citrus. **Food microbiology**, v. 69, p. 1-10. 2018.

KOHMOTO, K.; ITOH, Y.; SHIMOMURA, N.; KONDOH, Y.; OTANI, H.; KODAMA, M.; NISHIMURA, S.; NAKATSUKA, S. Isolation and biological activities of two host-specific toxins from the tangerine pathotype of *Alternaria alternata*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 83, n. 5, p. 495-502, 1993.

KUPPER, K. C.; GIMENES-FERNANDES, N.; GOES, A. Controle biológico de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. **Fitopatol. Bras.**, v. 28, p. 251-257, 2003.

KUPPER, K. C., CERVANTES, A. L. L., KLEIN, M. N., & DA SILVA, A. C. Avaliação de microrganismos antagônicos, *Saccharomyces cerevisiae* e *Bacillus subtilis* para o controle de *Penicillium digitatum*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, p. 425-436. 2013.

LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. In: STACKEBRANDT E.; GOODFELLOW, M. **Nucleic Acid techniques in Bacterial Systematics**. 1991, p. 115-175.

LARANJEIRA, F. F., AMORIM, L., BERGAMIN FILHO, A., AGUILAR-VILDOSO, C. I., DELLA COLLETA FILHO, H. Fungos, procariotos e doenças abióticas. In: MATTOS JUNIOR, D.; DE NEGRI, JD; PIO, RM, POMPEU JUNIOR, J. (Eds) **Citros**. Instituto Agrônômico e Fundag, Campinas, 2005. p. 1-18.

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 and biotechnology**, v. 24, p. 1139-1145, 2008.



LI, Z., GUO, B., WAN, K., CONG, M., HUANG, H., GE, Y. Effects of bacteria-free filtrate from *Bacillus megaterium* strain L2 on the mycelium growth and spore germination of *Alternaria alternata*. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 29, n. 6, p. 1062-1068, 2015.

LINDOW, S. E.; LEVEAU, J. H. J. Phyllosphere microbiology. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 13, p. 238-243, 2002.

LOPES, M. R., KLEIN, M. N., FERRAZ, L. P., DA SILVA, A. C., & KUPPER, K. C. *Saccharomyces cerevisiae*: a novel and efficient biological control agent for *Colletotrichum acutatum* during pre-harvest. **Microbiological research**, 175, 93-99, 2015.

MARÍN, J. E.; FERNÁNDEZ, H. S.; PERES, N. A; ANDREW, M.; PEEVER, T. L.; TIMMER, L. W. First report of *Alternaria* Brown spot of citrus caused by *Alternaria alternata* in Peru. **Phytopathology**, St. Paul, v. 90, n. 5, p. 686, 2006.

MARTELLI, I. B. **Manejo de mancha marrom de alternaria em citros: poda de limpeza e correlação com lagarta minadora**. 2011, 41f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) – Curso de Pós Graduação em Agricultura Tropical e Subtropical, Instituto Agronômico, Campinas, 2011.

MELNICK, R. L.; ZIDACK, N. K.; BAILEY, B. A.; MAXIMOVA, S. N.; GUILTINAN, M.; BACKMAN, P. A. Bacterial endophytes: *Bacillus* spp. from vegetable crops as potential Biol. Control agents of black pod rot of cacao. **Biol. Control**. v. 46, p. 46-56, 2008.

MORETTO, K. C. K. Controle biológico da queda prematura dos frutos cítricos. 2000. (Tese de Doutorado). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Universidade Estadual de São Paulo, Jaboticabal, 2000.

NEVES, M. F.; TROMBIN, V. G.; MILAN, P.; LOPES, F. F.; PEREIRA, F. C.; KALAKI, R. B. **O Retrato da Citricultura Brasileira**. Ribeirão Preto, 2010, 137 p.

NICHOLLS, C. I.; ALTIERI, M. In: ALTIERI, M. **Agroecologia: bases científicas para uma agricultura sustentável**. 3a Edição. Editora Expressão Popular, AS-PTA, São Paulo, Rio de Janeiro, 2012, 400p.

PARK, J. W.; BALARAJU, K.; KIM, J.; LEE, S.; PARK, K. Systemic resistance and growth promotion of chili pepper induced by an antibiotic producing *Bacillus vallismortis* strain BS07. **Biological Control**, v. 65, p. 246-257, 2013.

PERES, N. A. R.; AGOSTINI, J. P.; TIMMER, L. W.. Outbreaks of *Alternaria* brown spot of citrus in Brazil and Argentina. **Plant Disease**, v. 87, p. 750, 2003.  
PÉREZ-GARCÍA, A.; ROMERO, D.; DE VICENTE, A. Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of Bacilli in agriculture. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, n. 2, p. 187-193, 2011.

PEEVER, T. L.; CANIHOS, Y.; OLSEN, L.; IBANEZ, A. LIU, Y. C.; TIMMER, L. W. Population genetic structure and host specificity of *Alternaria* spp. causing brown spot of *Minneola* tangelo and rough lemon in Florida. *Phytopathology*, v. 89, p. 851-860, 1999.

PEEVER T.L.; SU G.; CARPENTER-BOGGS L.; TIMMER L. W.. Molecular systematics of citrus-associated *Alternaria* species. **Mycologia**, v. 96, p. 119–134, 2004.

PEYPOUX, F., BONMATIN, J.M., AND WALLACH, J. Recent trends in the biochemistry of surfactin. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 51, p. 553–563, 1999.

PIO, R. M.; FIGUEIREDO, J.O.; STUCHI, E.S.; CARDOSO, S. A. B. Variedades copas In: MATTOS JR, D. de; DE NEGRI, J. D.; PIO, R. M.;

POMPEU JR, J. (Eds). **Citros**. Campinas: Instituto Agronômico e Fundag, 2005. Cap.3, p.37-60.

PLEBAN, S.; INGEL, F.; CHET, I. Control of *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* in the greenhouse using endophytic *Bacillus* spp. **European Journal of Plant Pathology**, v. 101, p. 665-672, 1995.

POMPEU JÚNIOR, J. Rootstocks and scions in citriculture of the São Paulo State. **Proceedings**, v. 6, p.75-82, 2001.

PRIETO, K. R. **Estudo químico de *Alternaria alternata* patótipo tangerina em meio artificial e na interação com *Guignardia citricarpa*** -- São Carlos: UFSCar, 2012, 295p. Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2012.

REIS, R. F.; GOES, A. de; MONDAL, S. M.; TIMMER, L. W. Effectiveness of fungicides and susceptibility of fruit and leaves of tangerine, tangor and tangelos to infection by *Alternaria alternata*, the cause of brown spot. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, supl., p. 11-12, 2006.

ROMERO D.; DE VICENTE, A.; RAKOTOALY, R.H.; DUFOUR, S.E.; VEENING, J. W.; ARREBOLA, E.; CAZORLA, F.M. KUIPERS, O. P.; PAQUOT, M.; PEREZ-GARCIA, A. The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podosphaera fusca*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 20, n. 4, p. 430-440, 2007.

RYTTER, J.L.; LUKEZIC, F.L.; CRAIG, R.; MOORMAN, G.W. Biological control of geranium rust by *Bacillus subtilis*. **Phytopathology**, v. 79, p. 367-370, 1989.

SAUNT, J. **Variedades de cítricos del mundo**. Valencia, Espanha: Sinclair International, 1992, 128p.

SCHUTTE, G. C.; LESAR, K. H.; PELSER, D. T. P.; SWART, S. H.. The use of tebuconazole for the control of *Alternaria alternata* on 'Minneola tangelos' and its potential to control postharvest decay when applied as a preharvest spray. **Proceedings of the International Society for Citriculture**, v. 7, p. 1070–1074, 1992.

SHANER, G.; FINNEY, R.E. The effects of nitrogen fertilization on the expression of slowmildwing in knox wheat. **Phytopathology**, v. 67, p. 1051-1055, 1977.

SHIOMI, H. F.; SILVA, H. S. A.; MELO, I. S.; NUNES, F. V.; BETTIOL, W. Bioprospecting endophytic bacteria for biological control of coffee leaf rust. **Scientia Agrícola**, v. 63, p. 32-39, 2006.

SHODA, M. Bacterial control of plant diseases. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 89, n. 6, p. 515-521, 2000.

SIMMONS E. G. *Alternaria* themes and variations 226–235: classification of citrus pathogens. **Mycotaxon**, v. 70, p. 263–323, 1999.

SIMMONS, E. G. *Alternaria* themes and variations (226-235): Classification of citrus pathogens. **Mycotaxon**, Ithaca, v. 70, n. 1, p. 263-323, 1999.

SOLEL, Z. *Alternaria* brown spot on Minneola tangelos in Israel. **Plant Pathology**, Oxford, v. 40, n. 1, p. 145-147, 1991.

SOLEL, Z.; TIMMER, L. W. Iprodione resistance of *Alternaria alternata* pv. *citri* from Minneola tangelo in Israel and Florida. **Plant Disease**, St. Paul, v. 80, n. 3, p. 291-293, 1996.

SOLEL, Z.; OREN, Y. KIMCHI, M. Control of *Alternaria* brown spot of Minneola tangelo with fungicides. **Crop Protection**, Oxford, v. 16, n. 7, p. 659-664, 1997.

SOLEL, Z.; KIMCHI, M. Histopathology of Infection of *Minneola* tangelo by *Alternaria alternata* pv. *citri* and the Effect of Host and Environmental Factors on Lesion Development. **Journal of Phytopathology**, v. 146, n. 11-12, p. 557-561, 1998.

SOUZA, R. D.; MENDONÇA, E. A. F.; SOARES, M. A. Atividade antagônica a microrganismos patogênicos por bactérias endofíticas isoladas de *Echinodorus scaber* Rataj. **Summa Phytopathologica**, v. 41, p. 229-232, 2015.

SPÓSITO, M. B.; FEICHTENBERGER, E.; PIO, R. M.; CASTRO, J. L.; RENAUD, M. S. Ocorrência de mancha marrom de *Alternaria* em diferentes genótipos de citros nos estados de Minas Gerais, São Paulo e Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, supl., p. 152, 2003.

STUART, R. M.; BASTIANEL, M.; AZEVEDO, F. A.; MACHADO, M. A. *Alternaria* brown spot. **Laranja**, v.30, p.29-44, 2009.

STRAGIER P, LOSICK R Molecular genetics of sporulation in *Bacillus subtilis*. **Annual review of genetics**, v. 30, p. 297-341, 1996.

STRANGE, R.N.; SCOTT, P.R. Plant disease: A threat to global food security. **Annual Review of Phytopathology**, v. 43, p. 83-116, 2005.

TAHI, G. M.; KE´BE, B. I. N.; GORAN, A. K. N.; SANGARE, A. M.; ONDEIL, F.; CILAS, C.; ESKES, A. B. Expected selection efficiency for resistance to cacao pod rot (*Phytophthora palmivora*) Comparing lead disc inoculations with field observations. **Euphytica**. v. 149, p. 35-44, 2006.

TIMMER, L. W.; ZITKO, E. Evaluation of fungicides for control of *Alternaria* brown spot and citrus scab. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, Winter Haven, v. 110, p. 71-76, 1997.

TIMMER, L.W.; SOLEL, Z.; OROZCO-SANTOS, M. *Alternaria* brown spot of mandarins *Compendium of Citrus Diseases* (Timmer LW Garnsey SM & Graham JH, eds), **The American Phytopathological Society Press**, St. Paul, MN, v. 2, p. 19–21. 2000.

TIMMER, L. W.; DARHOWER, H. M.; ZITKO, S. E.; PEEVER, T. L.; IBANEZ, A. M.; BUSHONG, P. M. Environmental factors affecting the severity of *Alternaria* brown spot of citrus and their potential use in timing fungicide applications. **Plant Disease**, v. 84, n. 6, p. 638-643, 2000.

TIMMER, L. W.; PEEVER, T. L.; SOLEIL, Z.; AZUYA, K.; KIMITSU, A. *Alternaria* diseases of citrus-novel pathosystems. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 42, p. 99–112, 2003.

TIMMER, L. W.; ROBERTS, M. J.; CHUNG, K. R. *Alternaria* brown spot. In: Timmer, L.W., Rogers, M.E. Buker, R.S. **Florida citrus pest management guide**. Gainesville: FL, p. 43, 2005.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Procariotos: Domínios *Bacteria* e *Archaea*. **Microbiologia**. 10a ed. Porto Alegre: Artmed, p. 156-83, 2012.

VELASCO, C. R.; CISNEROS, J. M. C.; REYES, D. I. B.; CISNEROS, M. F. R.; PAZ, J. J. O.; MARINA, M. A. S.; PRIETO, V. M. G. Identification and antagonistic activity in vitro of *Bacillus* spp. and *Trichoderma* spp. isolates against common phytopathogenic fungi. **Revista mexicana de fitopatología**, v. 34, p. 84-99, 2016.

VICENT, A.; ARMENGOL, J.; SALES, R.; GARCIA-JIMENEZ, J. First report of *alternaria* brown spot of citrus in Spain. **Plant Disease**, St. Paul, v. 84, n. 9, p. 1044, 2000.

WEI, G.; KLOEPPER, J.W.; TUZUN, S. Induced systemic resistance to cucumber disease and increased plant growth by plant growth-promoting rhizobacteria under field conditions. *Phytopathology*, v. 86, p. 221-224, 1996.

WHITESIDE, J. O. A newly recorded *Alternaria*-induced brown spot disease on Dancy tangerines in Florida. **Plant Disease Reporter**, v. 60, p. 326–329, 1976.

WHITESIDE, J. O. *Alternaria* brown spot of Dancy tangerines and its control. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, Winter Haven, v. 93, p. 34-37, 1979.