



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

**FORMULAÇÕES À BASE DE *Bacillus* SPP. PARA CONTROLE DE *Alternaria*  
*alternata* f.sp. *citri***

**ÁLISSON QUEIROZ MOURA**

**Araras**

**2020**



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

**FORMULAÇÕES À BASE DE *Bacillus* SPP. PARA CONTROLE DE *Alternaria  
alternata* f.sp. *citri***

**ÁLISSON QUEIROZ MOURA**

**ORIENTADORA: Prof<sup>ª</sup> Dra. KATIA CRISTINA KUPPER  
COORIENTADORA: Prof<sup>ª</sup> Dra. ÉLIDA BARBOSA CORREA**

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

2020

Queiroz Moura, Álisson

Formulações à base de *Bacillus* spp., para controle de *Alternaria alternata*  
f.sp. citri / Álisson Queiroz Moura. -- 2020.  
68 f. : 30 cm.

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

Orientador: Dra. Katia Cristina Kupper

Banca examinadora: Dr. Victor Augusto Forti, Dra. Marinês Bastianel

Bibliografia

1. Controle biológico de doença em citros. 2. *Bacillus* spp., como agente  
de controle biológico. 3. Formulações biológicas. 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 do candidato Alisson Queiroz Moura, realizada em 13/03/2020:

---

Profa. Dra. Katia Cristina Kupper  
UFSCar

---

Prof. Dr. Victor Augusto Forti  
UFSCar

---

Profa. Dra. Marinês Bastianel  
IAC

**Aos meus pais,**

Cristina e Antônio

Dedico com todo amor e gratidão que um filho possa ter, pois nunca mediram esforços para que eu pudesse alcançar mais esse sonho,

em especial aos meus irmãos Anderson, Avanira e Alberto.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder a dádiva da vida e de mais uma experiência nesse plano terreo, sempre me guiando e abençoando por onde andei.

Aos meus pais, Cristina e Antônio e minha vó Luiza (*in memoria*) pelo amor passado da agricultura e por sempre semear em mim todos os sonhos do mundo, sem seus esforços eu não teria chegado a lugar algum. Amo muito vocês.

Aos meus irmãos, Anderson, Avanira, Alberto e “Iácome” por toda força, conselhos e afetos. Obrigado meus irmãos por me sentir amado e encorajado a persistir por tudo que almejo vocês são definitivamente meus anjos de guarda.

A minha grande amiga e namorada Anelim (Lays), por todo apoio incondicional e por sustentar a saudade de um amor fisicamente ausente.

A Dra. Kátia Cristina Kupper e Dra. Élide Barbosa Correa por todas as considerações e orientações, me capacitando profissionalmente e me lapidando pessoalmente. A vocês minha eterna gratidão.

À UFSCar - Câmpus de Ciências Agrárias e à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Agroecologia e Desenvolvimento Rural (PPGADR) pela oportunidade de realizar o mestrado. Em especial a secretária e grande amiga Cris, que sempre se mostrou solícita e aos professores Dr. Victor Forti e Dra. Josiane Rodrigues, sem duvida levarei pra sempre suas contribuições pessoais e profissionais. Sou eternamente grato a cada um de vocês.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) pela concessão da bolsa e financiamento do PPGADR (Código de Financiamento 001).

Aos amigos da Pós-Graduação em especial, Wolney Antunes, Igor Corsini, Diego Ruiz, Bruna Aparecida, Carlos Eduardo, Átila Ramirez e Renan Resende.

A minha segunda família, Ailsa, Filipe, Kadoshe e Ricardo por toda descontração e companheirismo ao longo dessa jornada. Meu muito obrigado à república Ôxente.

Ao Laboratório de Microbiologia Agrícola e Molecular da UFSCar-Araras, em especial a professora Dra. Sandra Antonini, Lucinha e Carina.

Ao Centro de Citricultura Sylvio Moreira pela oportunidade de estágio e desenvolvimento do projeto e ao Laboratório de Fitopatologia e Controle Biológico.

Aos amigos do Laboratório de Fitopatologia e Controle Biológico, Fernanda de Paula, Natália Castro, Vanessa Moura e Lucas Campos. Vocês foram decisivos para que alcançasse mais esse sonho, serei eternamente grato a cada um de vocês.

Aos amigos do Centro de Citricultura, em especial, Rosy, Bel, Vivian, Franciel, Gomes, QQ, Derik e Rodrigo Ferreira. Aos pesquisadores Dr. Fernando Azevedo e Dra. Marinês Bastianel.

A todos que fizeram parte direta e indireta desta dissertação, meu muito obrigado.

Não há evolução na agricultura sem ciência.

Dirceu Gassen

## SUMÁRIO

Página

<b>ÍNDICE DE TABELAS</b> .....	<b>i</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>iii</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>v</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>vii</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>3</b>
2.1 Produção de tangerinas e seus híbridos no Brasil.....	3
2.2 Mancha marrom de alternaria .....	4
2.2.1 Histórico e agente causal .....	4
2.2.2 Epidemiologia e sintomas.....	5
2.2.3 Medidas de controle.....	6
2.3 Controle biológico e Agroecologia.....	7
2.4 Controle biológico utilizando <i>Bacillus</i> spp.....	8
2.5 Formulações à base de <i>Bacillus</i> spp. ....	9
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>10</b>
3.1 Geral.....	10
3.2 Específico.....	10
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>11</b>
4.1 Microrganismos .....	11
4.2 Efeito de compostos nitrogenados e elementos traços na atividade antagônica de <i>Bacillus</i> spp. ....	11
4.3 Formulações e vida de prateleira .....	12
4.4 Eficiência das formulações no crescimento micelial de <i>Alternaria alternata</i> .....	13
4.5 Efeito das formulações na germinação dos conídios de <i>Alternaria alternata</i> .....	14
4.6 Eficiência das formulações à base de <i>Bacillus</i> spp. no controle da mancha marrom de alternaria .....	14
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>16</b>

5.1	Efeito de compostos nitrogenados e elementos traços na atividade antagônica de <i>Bacillus</i> spp. ....	16
5.2	Formulações e vida de prateleira .....	21
5.3	Eficiência das formulações no crescimento micelial de <i>Alternaria alternata</i> . 24	
5.4	Eficiência das formulações na germinação dos conídios de <i>A. alternata</i> .....	25
5.5	Eficiência das formulações à base de <i>Bacillus</i> spp. no controle da mancha marrom de alternaria .....	28
<b>6.</b>	<b>DISCUSSÕES</b> .....	<b>34</b>
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>40</b>
<b>8.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>41</b>

## ÍNDICE DE TABELAS

Página

<b>Tabela 1:</b> Análise de Variância do efeito de compostos nitrogenados, em diferentes concentrações, na atividade antagônica de <i>Bacillus subtilis</i> (ACB-01) e <i>B. amyloliquefaciens</i> (ACB-08), avaliado pela porcentagem de inibição do peso seco micelial de <i>Alternaria alternata</i> . .....	16
<b>Tabela 2:</b> Efeito de compostos nitrogenados, em diferentes concentrações, na atividade antagônica de <i>Bacillus subtilis</i> (ACB-01) e <i>B. amyloliquefaciens</i> (ACB-08), avaliado pela porcentagem de inibição do peso seco micelial de <i>Alternaria alternata</i> . .....	17
<b>Tabela 3:</b> Análise de Variância do efeito de elementos traços, em diferentes concentrações, na atividade antagônica de <i>Bacillus subtilis</i> (ACB-01) e <i>B. amyloliquefaciens</i> (ACB-08), avaliado pela porcentagem de inibição do peso seco micelial de <i>Alternaria alternata</i> . .....	18
<b>Tabela 4:</b> Efeito de elementos traços, em diferentes concentrações, na atividade antagônica de <i>Bacillus subtilis</i> (ACB-01) e de <i>B. amyloliquefaciens</i> (ACB-08), avaliado pela porcentagem de inibição do peso seco micelial de <i>Alternaria alternata</i> . .....	19
<b>Tabela 5:</b> Porcentagem de inibição do peso seco micelial da <i>Alternaria alternata</i> , após cultivo do fungo em meio batata-dextrose acrescido de diferentes aditivos. ....	21
<b>Tabela 6:</b> Porcentagem de inibição do peso seco micelial da <i>Alternaria alternata</i> pelos isolados de <i>Bacillus</i> spp.(ACB-01e ACB-08) cultivados em meio batata-dextrose acrescido de aditivos combinados ou sem aditivos. ....	21
<b>Tabela 7:</b> Análise de Variância do efeito de formulações, à base de <i>Bacillus</i> spp. com diferentes veículos de transporte e concentrações, no crescimento micelial de <i>Alternaria alternata</i> , após armazenamento a 22 °C por 2 meses. ....	24
<b>Tabela 8:</b> Eficiência das formulações à base de isolados de <i>Bacillus</i> spp. em diferentes veículos de transporte e concentrações no tamanho da colônia de <i>Alternaria alternata</i> . .....	25
<b>Tabela 9:</b> Análise de Variância do efeito de formulações, à base de <i>Bacillus</i> spp. com diferentes veículos de transporte e concentrações, na germinação de <i>Alternaria alternata</i> . .....	26

<b>Tabela 10:</b> Efeito das formulações à base de <i>Bacillus subtilis</i> (ACB-01) e <i>B. amyloliquefaciens</i> (ACB-08), em diferentes veículos de transporte e concentrações, na porcentagem de inibição da germinação dos conídios de <i>Alternaria alternata</i> . ....	27
<b>Tabela 11:</b> Efeito de aditivos e adjuvantes na geminação de conídios de <i>Alternaria alternata</i> . ....	28
<b>Tabela 12:</b> Análise de Variância para o efeito das formulações à base de <i>Bacillus subtilis</i> (ACB-01) e <i>B. amyloliquefaciens</i> (ACB-08), em diferentes veículos de transporte e, dois tipos de calda (mistura, ou não, das formulações com estrobilurina), avaliado pela Área Abaixo da Curva de Progressão da Doença (AACPD). ....	29
<b>Tabela 13:</b> Efeito das formulações à base de <i>Bacillus subtilis</i> (ACB-01) e <i>B. amyloliquefaciens</i> (ACB-08), combinadas ou não com estrobilurina, após aplicação em mudas de tangerina ‘Dancy’, para o controle da mancha marrom de alternaria, avaliado por meio da área abaixo da curva de progressão da doença (AACPD). ....	30
<b>Tabela 14:</b> Análise de Variância para o efeito das formulações à base de <i>Bacillus subtilis</i> (ACB-01) e <i>B. amyloliquefaciens</i> (ACB-08) em diferentes veículos de transporte e dois tipos de calda (mistura, ou não, das formulações com estrobilurina), avaliado pela incidência de folhas doentes (%). ....	30
<b>Tabela 15:</b> Efeito das formulações à base de <i>Bacillus subtilis</i> (ACB-01) e <i>B. amyloliquefaciens</i> (ACB-08), combinadas ou não com estrobilurina, após aplicação em mudas de tangerina ‘Dancy’, para o controle da mancha marrom de alternaria, avaliado pela porcentagem de folhas doentes (%). ....	31
<b>Tabela 16:</b> Efeito de tratamentos adicionais (água ou estrobilurina) aplicados em mudas de tangerina ‘Dancy’ enxertadas sobre limão Cravo no controle da mancha marrom de alternaria (MMA). Avaliado pela área abaixo da curva de progressão da doença (AACPD) e pela porcentagem de folhas doentes. ....	32

## ÍNDICE DE FIGURAS

Página

<b>Figura 1.</b> Porcentagem de inibição do peso seco micelial da <i>Alternaria alternata</i> pelo <i>Bacillus subtilis</i> (ACB-01) e <i>B. amyloliquefaciens</i> (ACB-08), cultivados em meio batata-dextrose acrescido de compostos nitrogenados. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ( $p \leq 0.01$ ). .....	17
<b>Figura 2.</b> Porcentagem de inibição do peso seco micelial da <i>Alternaria alternata</i> pelo <i>Bacillus subtilis</i> (ACB-01) e <i>B. amyloliquefaciens</i> (ACB-08), cultivados em meio batata-dextrose acrescido de elementos traços. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ( $p \leq 0.01$ ). .....	18
<b>Figura 3.</b> Porcentagem de inibição do peso seco micelial de <i>Alternaria alternata</i> por <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (ACB-08) cultivado em meio batata-dextrose em diferentes concentrações de sulfato de cobre. ....	20
<b>Figura 4.</b> Formulações à base de <i>Bacillus subtilis</i> (ACB-01) em diferentes veículos de transporte. Amido (A), talco (B) e caulim (C). Após dois meses de armazenamento a 22°C. Fonte: Autor, 2019. ....	22
<b>Figura 5.</b> Sobrevivência de isolados de <i>Bacillus</i> spp., em diferentes veículos de transporte e diferentes temperaturas (22 e 4°C), avaliada através da unidade formadora de colônia da bactéria por grama da formulação (UFC/g), durante seis meses de armazenamento. ....	23
<b>Figura 6.</b> Efeito das formulações à base de <i>B. subtilis</i> ACB-01 no crescimento micelial de <i>Alternaria alternata</i> . Formulações constituídas de (A) amido, (B) caulim, (C) talco e (D) testemunha. Fonte: Autor, 2019. ....	24
<b>Figura 7.</b> Efeito das formulações à base de <i>Bacillus subtilis</i> (ACB-01) e <i>B. amyloliquefaciens</i> (ACB-08) na porcentagem de inibição da germinação dos conídios de <i>Alternaria alternata</i> . Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ( $p \leq 0.01$ ). ....	26
<b>Figura 8.</b> Efeito das formulações na morfologia dos conídios de <i>Alternaria alternata</i> . (A) Testemunha; (B) ACB-08 + amido a 2,5%; (C) ACB-08 + talco a 10%; (D) ACB-01 + caulim a 0,5%; (E) ACB-01 + talco a 10%; (F) ACB-01 + talco a 5%; (G) ACB-01 + caulim a 2,5%; (H) Tween-20 a 3,8%. Visualização em microscópio óptico posicionado na objetiva de 10x. Fonte: Autor, 2019. ....	28

**Figura 9.** Efeito das formulações aplicadas de forma isoladas para o controle da mancha marrom de alternaria em mudas de tangerina ‘Dancy’ enxertadas sobre limão Cravo. 72 horas após a inoculação da *Alternaria alternata*. (A) Testemunha; (B) ACB-01 + caulim; (C) ACB-08 + talco. Tratamentos aplicados de forma isolada. Fonte: Autor, 2019. .... 33

**FORMULAÇÕES À BASE DE *Bacillus* SPP. PARA CONTROLE DE *Alternaria alternata* f.sp. *citri***

**Autor: ÁLISSON QUEIROZ MOURA**

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

**Coorientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. ÉLIDA BARBOSA CORREA**

**RESUMO**

Na safra de 2018, o Brasil produziu 996.872 toneladas de tangerinas e seus híbridos, sendo o estado de São Paulo e Minas Gerais responsáveis por 59% desta produção. No entanto, este potencial produtivo tem demandado a utilização de elevado número de aplicações anuais de fungicidas para controle de um dos principais problemas fitossanitários, a mancha marrom de alternaria (MMA), causada pelo fungo *Alternaria alternata* f. sp. *citri*. Porém, os resultados, além de não serem totalmente satisfatórios, podem causar impacto negativo para a saúde e o meio ambiente. A inserção de métodos alternativos, como o controle biológico, pode ser uma estratégia eficiente e socialmente correta para o controle da doença. Portanto, o presente trabalho teve por objetivo desenvolver formulações à base de *Bacillus subtilis* (ACB-01) e *B. amyloliquefaciens* (ACB-08), que em estudos prévios mostraram potencial para o controle da MMA. Para tal, avaliou-se: (i) a adição de compostos nitrogenados e elementos traços sobre a atividade antagonista das bactérias; (ii) o uso de diferentes veículos de transportes (talco, caulim e amido) na formulação; (iii) a vida de prateleira das formulações à base de *Bacillus* spp., em duas condições de armazenamento (22 e 4°C); (iv) o efeito das formulações no crescimento micelial e na germinação de conídios de *A. alternata* e, finalmente, (v) a eficiência das formulações à base de *Bacillus* spp., no controle da doença. Os resultados obtidos mostraram que: a maioria dos aditivos avaliados favoreceu o antagonismo dos isolados bacterianos, afetando o desenvolvimento micelial do fitopatógeno; a combinação de um composto nitrogenado e de um elemento traço apresentou uma menor atividade antagonista das bactérias, quando comparado com os aditivos utilizados individualmente; todas as formulações à base de *Bacillus* spp., independente do veículo de transporte da bactéria, foram eficientes em inibir a germinação e o desenvolvimento da colônia de *A. alternata*; a maioria das formulações se manteve viável até seis meses de armazenamento a 22 °C; formulações à base de *B.*

*amyloliquefaciens* ACB-08 não mantiveram a viabilidade, quando armazenadas durante seis meses a 4°C; houve diferença quanto à preferência de aditivo e do veículo de transporte para o desenvolvimento de formulações à base de espécies de *Bacillus*; as melhores formulações para controle da MMA compreenderam: *B. subtilis* ACB-01 cultivado com  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (1mM) + caulim e *B. amyloliquefaciens* ACB-08 cultivado com  $\text{CoCl}_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (0,2mM) + talco e, as mesmas foram compatíveis com estrobilurina, quando aplicadas em mistura de calda.

**Palavra chave:** vida de prateleira; adjuvantes; citros; estrobilurina; ‘Dancy’

**FORMULATIONS BASED ON *Bacillus* SPP. FOR CONTROL OF *Alternaria alternata* f.sp. *citri***

**Author: ÁLISSON QUEIROZ MOURA**

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

**Co-adviser: Prof<sup>a</sup> Dra. ÉLIDA BARBOSA CORREA**

**ABSTRACT**

In the 2018 harvest, Brazil produced 996.872 tons of tangerines and their hybrids, with the state of São Paulo and Minas Gerais responsible for 59% of this production. However, this productive potential requires the use of a high number of fungicide applications to control one of the main phytosanitary problems, an *Alternaria* Brown Spot (ABS), caused by the fungus *Alternaria alternata* f.sp. *citri*. However, the results, besides it not being entirely satisfactory, can have a negative impact on health and the environment. The insertion of alternative methods, such as biological control, can be an efficient and socially correct strategy for controlling the disease. Therefore, the present study aimed to develop *Bacillus subtilis* (ACB-01) and *B. amyloliquefaciens* (ACB-08) based formulations, which in previous studies showed potential for controlling ABS. For this, it was evaluated: (i) the addition of nitrogen compounds and trace elements on the antagonistic activity from bacteria; (ii) the use of different carrier materials (talc, kaolin and starch) in the formulation; (iii) the shelf life of *Bacillus* spp.-based formulations, in two storage conditions (22 and 4 °C); (iv) the effect of formulations on mycelial growth and germination of *A. alternata* conidia and, finally, (v) the efficiency of *Bacillus* spp.-based formulations, in the control of the disease. The results obtained showed that: most of the evaluated additives favored the antagonism of the bacterial isolates, affecting the mycelial development of the phytopathogen; the combination of a nitrogenous compound and a trace element showed a lower antagonistic activity of the bacteria, when compared with the additives used individually; all *Bacillus* spp.-based formulations, regardless of the bacterium carrier material, were efficient in inhibiting the germination and development of the *A. alternata* colony; most formulations remained viable until six months of storage at 22 °C; *B. amyloliquefaciens* ACB-08-based formulations did not maintain viability when stored for six months at 4 °C; there was a difference regarding the preference of additive and carrier material for the

development of formulations from *Bacillus* species; the best formulations for Alternaria Brown Spot control included: *B. subtilis* ACB-01 grown with  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (1mM) + kaolin and *B. amyloliquefaciens* ACB-08 grown with  $\text{CoCl}_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (0.2mM) + talc and they were compatible with strobilurin, when applied in mixture.

**Keyword:** shelf-life; adjuvants; citros; strobilurin; ‘Dancy’

## 1. INTRODUÇÃO

Frente o cenário nacional na produção de tangerinas e seus híbridos, o Brasil produziu 996.872 toneladas em 2018, sendo os estados de São Paulo e Minas Gerais responsáveis por 59% da produção (IBGE, 2018). Apesar deste potencial produtivo, as tangerinas e seus híbridos enfrentam sérios problemas fitossanitários, como a mancha marrom de alternaria (MMA), doença fúngica causada por *Alternaria alternata* f. sp. *citri* (REIS et al., 2007; COLTURATO et al., 2009; BASTIANEL et al., 2014; AZEVEDO et al., 2015).

O fungo *A. alternata* é disseminado através de esporos assexuados e produz uma toxina de caráter seletivo ao hospedeiro. Dependendo da intensidade da doença, pode ocasionar desfolha, morte dos ramos e queda parcial dos frutos, no entanto, os que se mantêm na planta perdem seu valor para o mercado *in natura* (CUENCA et al., 2016).

Diversas são as medidas de controle para mancha marrom de alternaria, como a utilização de cultivares resistentes (MICHIELIN et al., 2016; CAMPOS et al., 2017), o controle cultural (TIMMER et al., 2003; AZEVEDO et al., 2015) e, principalmente, o controle químico (COLTURATO et al., 2009). Dependendo do clima e da susceptibilidade da cultivar pode ser estabelecido um elevado número de aplicações anuais de fungicidas, podendo, em algumas situações, não apresentar um controle satisfatório (MICHIELIN et al., 2016; CHITOLINA et al., 2019).

Pulverizações com produtos químicos podem ocasionar problemas relacionados à saúde pública; ao meio ambiente (LOPES; ALBUQUERQUE, 2018); aumento nos custos de produção, devido ao elevado número de aplicações; além do surgimento de linhagens resistentes do fitopatógeno aos ingredientes ativos utilizados (COLTURATO et al., 2009; CHITOLINA et al., 2019). Atualmente, são indicados seis fungicidas para controle da MMA no Brasil, formulados com os seguintes ingredientes ativos: estrobilurina, triazol, óxido cuproso e sulfato de cobre (BRASIL, 2019).

Neste contexto, o uso do controle biológico tem se tornado uma promissora ferramenta no controle de doenças em plantas e, entre os antagonistas encontram-se as bactérias do gênero *Bacillus*. Tais bactérias são gram-positivas cosmopolitas, capazes de produzir inúmeros metabólitos secundários e substâncias antagônicas, estruturalmente distintas e, suportam as adversidades do ambiente por formarem endósporos (FIRA et al., 2018). No entanto, ao mesmo tempo em que muito se tem estudado quanto à sua eficiência como agente de controle biológico (KUPPER et al., 2009; KUPPER et al.,

2012; GAUTAM et al., 2019; KLEIN et al., 2016; EL-BENDARY; MOHARAM, 2019; BAYSAL et al., 2013; ALVAREZ et al., 2011), pouco se tem de formulações disponíveis no mercado (GOTOR-VILA et al., 2017; DROBY et al., 2016).

A disponibilidade dessas formulações depende da alta estabilidade em seu período de armazenamento, do transporte e distribuição, manuseio, entrega e persistência no campo, da aplicação, do baixo custo de atividade e considerável vida de prateleira (EL-BENDARY; MOHARAM, 2019). No entanto, a viabilidade do antagonista, nas formulações armazenadas por um longo período, não garante sua eficiência de controle, uma vez que, embora o antagonista sobreviva na formulação, muitas vezes pode perder sua capacidade de antagonismo, sendo, desta forma, um entrave para a aceitação comercial do produto (GOTOR-VILA et al., 2017).

Formulações à base de *Bacillus* spp. têm sido proposto na literatura, pela utilização de diferentes veículos de transportes, aditivos, adjuvantes e condições de armazenamento, apresentando, inclusive, resultados satisfatórios (LEE et al., 2006; KLEIN et al., 2016; GOTOR-VILA et al., 2017; GOTOR-VILA et al., 2019). Isso se deve ao grau de seletividade de aditivos na formulação, que pode otimizar o antagonista e aportar sua viabilidade durante o período de armazenagem (KLEIN et al., 2016), bem como, do veículo de transporte, dos adjuvantes e das condições de armazenamento, fatores esses decisivos na estabilidade e eficiência das formulações (LEE et al., 2006).

O processo de formulação também parece ser um entrave em sua disponibilidade no mercado, uma vez que métodos como leito fluidizado e spray dryer (GOTOR-VILA et al., 2019; MENG et al., 2015) tende a encarecer os custos de produção e, conseqüentemente, seu preço final, sendo necessário a busca por formulações caracterizadas como: suspensão concentrada (SC), concentrado emulsionável (EC) ou, mesmo emulsão de óleo em água (EW), possibilitando a adoção de alternativas com baixo custo e, que atendam a produção do antagonista, como os caldos bacterianos subsidiados com matérias primas simples e acessível no ambiente de produção (YÁNEZ-MENDIZÁBAL et al., 2012a).

Atualmente no Brasil são registrados 38 formulações à base de *Bacillus* spp., dentre os quais apenas três são indicadas para citros e nenhum é indicado para o controle da MMA (BRASIL, 2019), evidenciando, portanto, a necessidade de se desenvolver formulações biológicas, inclusive, para o controle de *A. alternata*.

Diante do exposto e, com base em resultados anteriores, quanto a eficiência dos isolados *Bacillus subtilis* (ACB-01) e *B. amyloliquefaciens* (ACB-08) no controle da

mancha marrom de alternaria (SOUZA, 2018), o objetivo deste estudo foi desenvolver formulações à base desses microrganismos (ACB-01 e ACB-08) para controle da mancha marrom de alternaria, estudando: (i) diferentes fontes de nitrogênio, elementos traços e suas combinações como aditivo para produção das bactérias (ACB-01 e ACB-08); (ii) diferentes veículos de transporte para os microrganismos; (iii) condições de armazenamento e vida de prateleira das formulações; e, finalmente, (iv) a eficiência das formulações *in vitro* e *in vivo* no controle da doença.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Produção de tangerinas e seus híbridos no Brasil

O cultivo de citros no Brasil apresenta importância econômica e social, representando 60% de todo suco de laranja consumido mundialmente (FAO, 2019). Frente o cenário nacional na produção de tangerinas e seus híbridos, o Brasil produziu 996.872 toneladas em 2018, sendo a região sudeste e sul do país responsável por 93,7% de toda produção (IBGE, 2018). Considerando as variedades, Tangor Murcott e Ponkan são responsáveis por 80% da produção de tangerina e seus híbridos no Brasil (REIS et al., 2007).

Algumas características intrínsecas das tangerinas e seus híbridos são requeridas pelo mercado *in natura*, como, intensa coloração, ausência de sementes, doçura, equilíbrio na acidez e viabilidade ao descascar, fomentando os programas de melhoramento genético em busca dessas demandas (GOLDENBERG et al., 2017).

As tangerinas e seus híbridos são ainda uma fonte de vitaminas e fibras, além de conter metabólitos secundários como o ácido ascórbico, compostos fenólicos, flavonoides e limonóides, importantes para a saúde humana (NEVES et al., 2018).

No cenário nacional destaca-se o tangor Murcott [*Citrus reticulata* Blanco x *C. sinensis* (L.) Osbeck] e as tangerinas Pokan (*C. reticulata* Blanco) e ‘Dancy’ (*C. reticulata* Blanco). Sendo variedades adaptadas ao clima tropical, apresentando frutos de qualidade e maturação mais tardia (PACHECO, 2015), porém, com alta susceptibilidade para a mancha marrom de alternaria (MMA) (REIS et al., 2007), o que tem levado à erradicação de aproximadamente 40 milhões de plantas (BASTIANEL et al., 2014).

## 2.2 Mancha marrom de alternaria

### 2.2.1 Histórico e agente causal

A mancha marrom de alternaria (MMA) foi relatada pela primeira vez em 1903, em um pomar de mandarina (*Citrus reticulata*) ‘Emperor’ na Austrália e anos mais tarde nos EUA, Israel, África do Sul, Turquia, Espanha, Brasil e Argentina (PEGG, 1966; TIMER; PEEVER; SOLEL, 2003; COLTURATO et al., 2009).

Segundo Peres, Agostini e Timer (2003) a MMA foi relatada no Brasil pela primeira vez em 2001 no Rio de Janeiro e, desde então vem sendo descrita como a principal doença fúngica dentre as tangerinas e seus híbridos. A doença atualmente está presente com importância econômica nos Estados Unidos, Brasil, Argentina, Colômbia, Cuba, Peru, China, Espanha, Itália, Grécia, Turquia e Israel (BASSIMBA; MIRA; VICENT, 2014).

Devido à severidade da doença, a produção de Murcott em algumas regiões do Brasil só é possível se o rendimento for suficiente para justificar o número demasiado de aplicações com fungicidas para o controle da doença (PERES; TIMEER, 2006; MICHIELIN et al., 2016).

O agente causal da doença pertence ao gênero *Alternaria*, sendo compreendido por fungos cosmopolitas e imperfeitos, pertencentes ao filo Ascomycetos. Caracterizado pela natureza saprófita e endofítica, este gênero é responsável por diversas doenças acometidas em plantas, dentre elas a mancha marrom de alternaria, causada pelo fungo *Alternaria alternata* f.sp *citri* (AZEVEDO et al., 2015; MEENA; SAMAL, 2019).

*Alternaria alternata* produz toxinas com baixo peso molecular e de caráter seletivo ao hospedeiro (HST) como as toxinas ACT I e II, com uma fração estrutural determinada pelo ácido 9,10-exo-8-hidroxi-9-metil-decatrienóico (MEENA; SAMAL, 2019).

Seus conídios apresentam formas e tamanhos variados (20-63 µm de comprimento x 9-18 µm de largura), com coloração de oliva a marrom escuro, contendo entre 4 e 6 septos transversais e 1 longitudinal (AKIMITSU; PEEVER; TIMMER, 2003). Os conídios apresentam uma parede espessa o que o torna mais resistente ao ressecamento, viabilizando sua sobrevivência no ambiente (SPÓSITO et al., 2003).

### 2.2.2 Epidemiologia e sintomas

Os conídios do fungo são produzidos na superfície das lesões até serem dispersos pela água ou pelo vento e encontrarem outra superfície de frutos ou folhas jovens que sejam suscetíveis. Havendo condições de umidade, os conídios germinam e, antes mesmo de penetrarem no tecido vegetal, iniciam a produção da toxina ATC (AKIMITSU; TIMMER, 2003).

A penetração nas folhas pode acontecer diretamente pela formação de apressórios ou, através dos estômatos na superfície abaxial das folhas. Tais dinâmicas de penetração são estabelecidas de acordo com o hospedeiro, condições ambientais e/ou características intrínsecas do próprio patógeno. Considerável parte da esporulação do fungo ocorre nas folhas, sendo otimizada pela presença de água ou alta umidade, enquanto muito pouco ocorre em frutos e ramos (AKIMITSU; TIMMER, 2003).

Segundo Canihos et al. (1999) sua infecção ótima acontece na temperatura de 27°C. À medida que essa temperatura oscila a  $\pm 5^\circ\text{C}$  maior será seu tempo para infecção e necessidade por umidade. Em uma temperatura mais elevada, como por exemplo, a 32°C, a infecção pelo fungo é relativamente baixa, mesmo que se tenham condições de alta umidade (AKIMITSU; TIMMER, 2003).

Os sintomas da doença, em genótipos suscetíveis, correspondem a pequenas lesões em brotos, folhas e frutos jovens, podendo ainda, ocasionar queda de folhas e, parcialmente dos frutos, porém, os frutos que permanecem fixos nas plantas perdem o seu valor comercial para o mercado *in natura* (DÓRIA et al., 2019; CUENCA et al., 2016).

Tais sintomas são definidos pela toxina ACT (*Alternaria Citri Toxin*) liberada durante o processo de germinação dos conídios, danificando a membrana celular e induzindo o vazamento dos eletrólitos das células cítricas, resultando em lesões necróticas (CUENCA et al., 2016; WANG et al., 2010; CHUNG, 2014).

A toxina ACT é a principal toxina ativa em tangerinas (*Citrus reticulata* Blanco), pomelo (*Citrus paradisi* Macfad) e híbridos (*Citris sinensis* (L.) Osbeck), sendo frequentemente translocada através do sistema vascular, produzindo clorose e necrose, seguindo as nervuras das folhas. Dependendo de sua intensidade, essas lesões continuam se expandindo até comprometer grande parte do tecido foliar, ocasionado morte das folhas para além dos locais específicos da infecção (LLORENS et al., 2013; CHUNG, 2014).

Após a infecção dependendo das condições ambientais os sintomas podem aparecer apenas 24 horas após. Em frutos, as lesões variam entre pequenas manchas a grandes lesões, com possíveis erupções (AKIMITSU; TIMMER, 2003).

Dependendo da severidade de infecção na folha, a planta hospedeira apresenta queda em sua produção, uma vez que, sua área superficial fotossintética é afetada pela ação do patógeno (PANE; ZACCARDELLI, 2015).

### **2.2.3 Medidas de controle**

Dependendo do clima da região e da suscetibilidade da cultivar, o controle da mancha marrom de alternaria é bastante crítico. No Brasil, este momento crítico pode ser compreendido entre os meses de outubro a março, onde ocorrem picos de umidade e temperaturas ótimas para o desenvolvimento do patógeno e, ao mesmo tempo, o surgimento das novas brotações da planta.

A doença pode ser amenizada por meio do controle cultural, por meio de podas, para que se tenha boa circulação de ar; pelo uso de irrigação adequada, evitando sistemas de aspersão aérea e, por uma adubação balanceada, a fim de se evitar picos de brotações (TIMMER et al. 2003; AKIMITSU; TIMMER, 2003; AZEVEDO et al., 2015).

A utilização de cultivar resistente também tem sido estudada como uma importante alternativa de controle da MMA (SOUZA; STUCHI; GOES, 2009; MICHIELIN et al., 2016; CAMPOS et al., 2017), assim como, a utilização de sais fosfitos e produtos naturais, como, também, pelo uso de quitosana (GARGANESE et al. 2019).

No entanto, a principal forma de controle é a utilização de fungicidas químicos, exigindo, muitas vezes, um grande número de aplicações, que nem sempre são eficientemente satisfatórias frente às condições ambientais já supracitadas (SOUZA; STUCHI; GOES, 2009; CUENCA, 2016; LLORENS et al., 2013).

Atualmente são registrados seis produtos químicos para o controle da doença, tendo como ingredientes ativos o sulfato de cobre (inorgânico), óxido cuproso, triazol e estrobilurina (BRASIL, 2019; AKIMITSU; TIMER, 2003).

O custo empregado no controle da MMA vai além do uso excessivo e da baixa eficiência de controle de fungicidas (MICHIELIN et al., 2016; CHITOLINA et al., 2019), refletindo ainda em custos ambientais a curto e longo prazo. Portanto, a

promoção de produtos alternativos, que reduzam os riscos e os impactos na saúde humana e meio ambiente, se faz necessário (LLORENS et al., 2013).

### **2.3 Controle biológico e Agroecologia**

A agroecologia tem proposto um desenvolvimento agrícola embasado em manejo dos agroecossistema de forma mais sustentável, resiliente, com foco na biodiversidade local e, que seja economicamente viável e socialmente justo (CHAVARRIA et al., 2018). Segundo Ferguson e Morales (2010), a agroecologia representa uma base científica, metodológica e tecnológica em busca de uma revolução agrária em todo o mundo.

Conceituada como a adoção de manejos baseados em processos biológicos em oposição ao uso de insumos externos e inorgânicos, a transição agroecológica tem sido requerida pela sociedade na busca por alimentos saudáveis e produzidos de forma que não comprometam o presente e as gerações futuras (DUPRÉ; MICHELS; GAL, 2017).

Dentre as vantagens com o cultivo em bases agroecológicas está o equilíbrio entre os organismos que coexistem no agroecossistema, fomentando o controle biológico de pragas e doença de plantas, utilizando as suas próprias funções no ecossistema (ALTIERI; NICHOLS, 2003; CHAVARRIA et al., 2018; BOERAEVE et al., 2020).

É preciso compreender as interações e serviços ecossistêmicos (promoção de crescimento, competição, ciclagem de nutrientes e da água, indução de resistência, etc.) dos organismos dentro do agroecossistema, prevendo o efeito direto e indireto que a remoção ou, adição de um organismo terá sobre o sistema como um todo (RIVERAS-SALINAS et al., 2018). Esta remoção ou adição é estabelecida de acordo com o manejo exercido, por exemplo, o uso demasiado de agrotóxico e de fertilizantes inorgânicos pode provocar a remoção de alguns organismos importantes dentro do sistema, por outro lado, práticas de conservação do solo e ou, o cultivo consorciado poderá promover a adição de organismos (ALTIERI; NICHOLS, 2003; CHAVARRIA et al., 2018).

Para tanto, apesar de todo conhecimento em torno do controle biológico e seus agentes de controle, faz necessário à busca pelo desenvolvimento de formulações biológicas que sejam prontamente disponíveis e eficientes para uso do agricultor. Jorge e Souza (2017) destacam a importância do desenvolvimento e de regularizações destas formulações biológicas para expandir os sistemas agrícolas de forma sustentáveis.

Segundo os autores, o emprego de tal ferramenta de controle será importante na consolidação da Política Nacional de Agroecologia e Produção Orgânica (Pnapo) e na conversão de agricultores convencionais para uma agricultura mais sustentável.

#### **2.4 Controle biológico utilizando *Bacillus* spp.**

O controle biológico pode ser definido como uma forma de manejo de pragas e doenças com base ecológica e que utiliza algum tipo de organismos, seja ele parasitoides, predadores, nematoides entomopatogênicos e microrganismos (BAKER; GREEN; LOKER, 2020).

Para Sharma, Singh e Singh (2009), o controle biológico com microrganismos, pode ser abordado pela utilização dos microrganismos já existente na planta ou, que possam ser introduzidos para o biocontrole. Os possíveis mecanismos de ação do antagonista contra fitopatógeno correspondem à competição por espaço e nutriente; antibiose; parasitismo direto e resistência induzida, que pode ser pela presença do microrganismo ou, por algum dos seus metabólitos produzidos (SHARMA; SINGH; SINGH, 2009).

O microrganismo ideal, para o controle biológico de doenças de plantas, deve ser geneticamente estável; ser eficaz em baixas concentrações; ser pouco exigente nutricionalmente; ser resiliente; não produzir toxinas, que possam ser prejudiciais a saúde humana; não ser patogênico ao hospedeiro; ser compatível com os tratamentos químicos e físicos normalmente utilizados para controle; ser prontamente estável em formulações e, finalmente, apresentar vantagem competitiva sobre o patógeno (SHARMA; SINGH; SINGH, 2009).

Dentre os antagonistas, destaca-se a utilização de bactérias do gênero *Bacillus* spp. (KLEIN et al., 2016; FIRA et al., 2018; GAUTAM et al., 2019; CHUN et al., 2019). Tais bactérias são capazes de produzir metabólitos secundários, como os lipopeptídeos, iturina, fengicina e surfactina, sendo os mais importantes compostos envolvidos na atividade de biocontrole exercida contra fungos fitopatogênicos (MASMOUDI et al., 2017).

Segundo Fira et al. (2018), algumas estirpes de *B. subtilis* e de *B. amyloliquefaciens* possuem de 4 a 5% e 8%, respectivamente, de todo seu genoma dedicado à síntese de metabólitos secundários. Isso se deve a busca constante de espécies de *Bacillus* que apresentem maior eficiência de energia e produção desses

metabólitos (CHUN et al., 2019). Em estudo para controle do cancro em tomate (*Clavibacter michiganensis*), a cepa de *B. amyloliquefaciens* teve efeito direto na severidade da doença, com 70% de inibição de área lesionada, utilizando como mecanismos de ação: a antibiose, o parasitismo direto e a competição por espaço e nutrientes (GAUTAM et al., 2019).

## 2.5 Formulações à base de *Bacillus* spp.

Diversas tecnologias têm surgido no último século com a garantia de maiores produtividades e possibilidade de alimentar o atual sistema de produção, porém, nem todas estão livres dos impactos negativos a curto e longo prazo, sendo necessário o desenvolvimento de ferramentas estáveis, resilientes, sustentáveis e eficientes (BAKER; GREEN; LOKER, 2020), como o desenvolvimento de formulações biológicas à base de microrganismos antagonistas.

Espécies do gênero *Bacillus* spp. pelo fato de formarem endósporos, que dão ao microrganismo a capacidade de sobreviver em condições adversas; de produzirem metabólitos secundários, e de serem cosmopolitas, se apresentam como organismos ideais para compor formulações (GAUTAM et al., 2019).

Lee et al. (2006) apontam que uma formulação à base de *B. licheniformis* controlou em 90,5% *Botrytis cinerea* em tomate, além de otimizar o peso e tamanho dos frutos sendo, inclusive, mais efetivo que o controle químico (dietifencarbe e carbendazim), que apresentou 77% de controle. Klein et al. (2016) desenvolveram uma formulação à base de *B. subtilis*, que controlou em até 73% o fungo *Colletotrichum acutatum*, em citros. Gotor-Vila et al. (2019) verificaram que formulações à base de *B. amyloliquefaciens* controlaram em até 100% a severidade de *Monilinia fructicola* em frutos de nectarinas.

Dado os resultados promissores encontrados, as formulações à base de *Bacillus* spp. têm detido 70% das formulações biológicas no mercado, destacando-se o *B. thurungiensis* no controle de pragas e insetos, assim como, *B. subtilis* e *B. amyloliquefaciens* têm sido usado frequentemente no controle de doenças em plantas (EL-BENDARY; MOHARAM, 2019; KLEIN et al., 2016; LOCATELLI et al., 2018; GAUTAM et al., 2019).

Porém, apesar de todo conhecimento de espécies de *Bacillus* spp., como agentes de biocontrole, faz-se necessário à busca por produtos que garantam sua eficiência,

ofertando opções adicionais ao controle de doenças em plantas e um aumento contínuo na produção de produtos biológicos. Dados recentes mostram que o Brasil movimentou, em termos de produtos biológicos, R\$ 464,5 milhões em 2019, aportando um crescimento de 70%, se comparado com o ano de 2017, onde o setor apresentou crescimento de 17% (BRASIL, 2020).

A utilização e comercialização destes produtos em larga escala têm sido limitado, devido à impossibilidade de sobrevivência do antagonista, aplicabilidade dos produtos sob condições de campo, distribuição e armazenamento, quando comparado com os defensivos químicos (LEE et al., 2006; GOTOR-VILA et al., 2019).

Além disso, alguns fatores são decisivos durante o processo de produção das formulações, como a seleção de aditivos, adjuvantes, condições de armazenamento e veículos de transporte, de modo que atendam prontamente o antagonista e as demandas de eficiência de controle (KLEIN et al. 2016; LOCATELLI et al. 2018; JAYARAJ et al., 2005; ZHANG et al. 2003).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Geral**

Desenvolver formulações à base de *Bacillus* spp. a serem aplicadas em mudas de tangerina ‘Dancy’, inoculadas artificialmente, para o controle de mancha marrom de alternaria.

#### **3.2 Específico**

- Avaliar a adição de compostos nitrogenados e elementos traços sobre a atividade antagônica de *Bacillus* spp. à *Alternaria alternata*;
- Avaliar a combinação de um composto nitrogenado e de um elemento traço sobre a atividade antagônica de *Bacillus* spp. à *Alternaria alternata*;
- Desenvolver formulações à base de *Bacillus* spp., com diferentes veículos de transportes;
- Avaliar a vida de prateleira das formulações à base de *Bacillus* spp.
- Avaliar o efeito das formulações à base de *Bacillus* spp. no crescimento micelial e na germinação de conídios de *Alternaria alternata*;

- Avaliar a eficiência das formulações à base de *Bacillus* spp., no controle da mancha marrom de alternaria.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Microrganismos

Os isolados bacterianos *B. subtilis* (ACB-01) e *B. amyloliquefaciens* (ACB-08) e o isolado monospórico de *A. alternata* utilizados neste estudo pertencem à coleção de Microrganismo do Laboratório de Fitopatologia e Controle Biológico do Centro Avançado de Pesquisa de Citros Sylvio Moreira/IAC, localizado no município de Cordeirópolis/SP.

### 4.2 Efeito de compostos nitrogenados e elementos traços na atividade antagônica de *Bacillus* spp.

Foram utilizados como compostos nitrogenados, ureia, sulfato de amônio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e nitrato de amônio (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>), nas concentrações de 0%, 0,02%, 0,1% e 0,5% (v/v). Os elementos traços testados foram ácido bórico (H<sub>3</sub>BO<sub>4</sub>), sulfato de cobre (CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O), sulfato de manganês (MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O), cloreto de cobalto (CoCl<sub>2</sub>.12H<sub>2</sub>O) e molibdato de amônio (H<sub>24</sub>Mo<sub>7</sub>N<sub>6</sub>O<sub>24</sub>), nas concentrações finais de 0mM, 0,05mM, 0,2mM e 1mM.

Seguindo a metodologia proposta por Wiyono et al. (2008), colônias de *Bacillus* spp. contendo (1 x 10<sup>7</sup> células/mL) foram cultivadas em 50 mL de batata-dextrose (BD), juntamente com os respectivos compostos nitrogenados ou, elementos traços e as culturas foram incubadas a 25°C, durante 72 horas e, posteriormente, centrifugadas à 4000g por 20 min.

O pH dos sobrenadantes obtidos foram ajustados a 6,5 com soluções de HCl e NaOH (1mM) e filtrados em membrana de celulose estéril (poro com tamanho de 0,22 µm). Os filtrados da cultura (2mL) foram adicionados a Erlenmeyers contendo 18 mL de caldo de batata-dextrose (BD) juntamente com um disco (0,7 cm) de *A. alternata*, obtido de colônias ativas do fungo.

A testemunha foi composta por um tratamento com BD + *A. alternata* (sem antagonista e sem aditivo). Após o cultivo por 48 horas, a massa micelial foi retirada e adicionada sobre um papel de filtro estéril (9 cm de diâmetro) e pesada, após secagem em estufa a 120°C por 12 horas, adaptação da metodologia descrita por Wiyono et al. (2008).

Com base nos resultados obtidos a partir dos ensaios de compostos nitrogenados e elementos traços, foram selecionados quatro aditivos, sendo  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (0,02%) e  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (1mM) para ACB-01 e,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (0,1%) e  $\text{CoCl}_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (0,2mM) para o ACB-08. Estes aditivos foram avaliados quanto ao seu efeito direto (sem bactéria), assim como, a combinação dos aditivos, considerando cada isolado de *Bacillus* spp., para o crescimento micelial de *A. alternata*. Tais ensaios seguiram a metodologia supracitada.

Foi utilizado um delineamento em esquema fatorial para cada ensaio: para o efeito do composto nitrogenado na atividade antagônica, utilizou-se o esquema 2 (*Bacillus*) x 3 (compostos nitrogenados) x 4 (concentrações) enquanto que, para os elementos traços seguiu o esquema 2 (*Bacillus*) x 5 (elementos traços) x 4 (concentrações), ambos com três repetições. Realizou-se ainda uma análise de regressão para a interação entre o ACB-08 +  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  e suas concentrações, uma vez que a concentração de 1mM deste elemento favoreceu o crescimento da *A. alternata*. Para análise estatística utilizou-se a média do tratamento testemunha (BD + *A. alternata*) para calcular a porcentagem de inibição do peso seco micelial, referente a cada repetição dentro de cada tratamento. Para o efeito direto (sem bactéria) e combinação (com bactéria) dos melhores aditivos no crescimento do fungo foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições. As médias de todos os ensaios foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

### **4.3 Formulações e vida de prateleira**

Os isolados de *Bacillus* spp. foram cultivados em meio BD, suplementado com os melhores aditivos ( $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (1mM) para o ACB-01 e  $\text{CoCl}_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (0,2mM) para o ACB-08), sob agitação constante à 25°C, por 48h. Posteriormente, suspensões do caldo bacteriano contendo  $5 \times 10^8$  células/mL foram adicionada nas formulações.

A confecção das formulações obedeceu ao seguinte procedimento: 43,6% de caldo bacteriano (suplementado com  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (1mM) para o ACB-01 e

CoCl<sub>2</sub>.12H<sub>2</sub>O (0,2mM) para o ACB-08), 34,9% do veículo de transporte (amido de milho, caulim ou talco), 17,3% de glicerol, 3,4% de monolaurato de polietilenoglicol sorbitano (Twenn-20) e 0,8% de carboximetilcelulose, metodologia adaptada de Jayaraj et al. (2005). Posteriormente, as formulações foram acondicionadas em sacos de polietileno, previamente esterilizados, e armazenadas em condições de ambiente controlado a 22 ± 2 e 4°C por seis meses, seguindo a metodologia adaptada de Gotor-Vila et al. (2017).

A avaliação da sobrevivência dos isolados de *Bacillus* spp. foi realizada nas duas condições de armazenamento, após 2, 3, 4, 5 e 6 meses de armazenamento, seguindo a metodologia de Locatelli et al. (2018), de modo que, 1 g do produto formulado foi dissolvido em 9 mL de água destilada e esterilizada, e em seguida, diluídas em séries até 10<sup>-6</sup> em solução salina (0,9 g NaCl/L de água destilada). Posteriormente, alíquotas (0,1 mL) de cada diluição foram plaqueadas em meio BDA (batata-dextrose-ágar) e as culturas incubadas em estufa para BOD a 27°C, por 48h. A sobrevivência da bactéria foi avaliada pela determinação das unidades formadoras de colônias e, sua densidade populacional expressa em UFC/g .

#### **4.4 Eficiência das formulações no crescimento micelial de *Alternaria alternata***

Após dois meses de armazenamento, concentrações das formulações (0; 0,5; 2,5; 5 e 10%), após armazenamento a 22°C, foram transferidas para meio BDA fundente e vertidos para placas de Petri. Para tal, 1 g do formulado + 9mL de água destilada e esterilizada foi considerada como 100% e a partir daí realizados os cálculos das demais concentrações. Após a solidificação do meio, um disco (0,7cm) contendo BDA + *A. alternata* (7 dias de idade) foi depositado no centro de cada placa. Em seguida, as culturas foram incubadas em estufa para BOD, com fotoperíodo de 12h a 27°C, por 7 dias. A avaliação consistiu na medição do diâmetro médio da colônia do fungo, em dois sentidos perpendiculares, determinando-se a porcentagem de inibição da colônia do fitopatógeno, em relação ao tratamento testemunha.

Foi utilizado um delineamento em esquema fatorial 2 (*Bacillus*) x 3 (veículos de transporte) x 5 (concentrações), com cinco repetições. A comparação de médias foi feita pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

#### **4.5 Efeito das formulações na germinação dos conídios de *Alternaria alternata***

Para esse ensaio, foram testadas diferentes concentrações (0; 0,1; 0,5; 1; 2,5; 5 e 10%,) das formulações, quanto ao seu efeito na germinação de conídios de *A. Alternata*.

Frações de 10 µL do formulado, conforme a concentração utilizada, juntamente com 10 µL de suspensão de esporos de *A. Alternata* ( $1 \times 10^5$  conídios/mL) foram depositadas, simultaneamente, em áreas previamente demarcadas de lâminas de microscopia, contendo meio ágar-água. Para o tratamento testemunha foi depositado gotas de água destilada e esterilizada no lugar das formulações. Em seguida, as culturas foram incubadas em estufa para BOD, com fotoperíodo de 12h, a 27°C, por 14 horas. Posteriormente, foi adicionado 10 µL de azul láctico, a fim de suspender a germinação. Foi realizada a avaliação através da contagem de esporos germinados e não germinados, em um total de 100 conídios ao acaso, efetuando-se o cálculo da porcentagem de germinação. Considerando germinado o conídio cujo tamanho do tubo germinativo era maior ou igual à largura do conídio, metodologia descrita por Kupper et al. (2009).

Paralelamente foi avaliado, também, o efeito direto dos aditivos ( $MnSO_4 \cdot H_2O$  (1mM) e  $CoCl_2 \cdot 12H_2O$  (0,2 mM)) e dos adjuvantes (glicerol (17,3%) e Twenn-20 (3,4%)) na germinação de conídios de *A. alternata*.

Foi utilizado um delineamento em esquema fatorial 2 (*Bacillus*) x 3 (veículos de transporte) x 7 (concentrações), com oito repetições. Para o efeito direto dos melhores aditivos e adjuvantes foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado com oito repetições. Para ambos os ensaios as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

#### **4.6 Eficiência das formulações à base de *Bacillus* spp. no controle da mancha marrom de alternaria**

Para esse ensaio, foram utilizadas mudas de tangerina ‘Dancy’ (*Citrus reticulata* Blanco) enxertadas sobre limão Cravo (*Citrus limonia* Osbeck) com 18 meses de idade, cultivadas previamente em sacos de 2,5 litros contendo o substrato Multiplant Citrus®.

Antes de cada ensaio de controle *in vivo*, as mudas foram podadas previamente, com o objetivo de forçar a brotação e obtenção de tecidos jovens, para aplicação dos tratamentos e inoculação.

O inóculo da *A. alternaria* foi produzido a partir do cultivo do patógeno em meio BDA, sob condições de incubação a 27°C, fotoperíodo de 12h, por um período de 7 a 14 dias. Posteriormente, 10mL de água destilada e esterilizada foi transferido para cada placa de Petri contendo a colônia do fungo, a qual foi raspada suavemente com uma lâmina de microscopia estéril. A suspensão obtida foi então filtrada através de duas camadas de gazes estéreis e ajustadas a  $1 \times 10^5$  conídios/ mL, com auxílio de um hemocitômetro.

De modo a manter a patogenicidade do isolado de *A. alternata*, folhas destacadas de tangerina ‘Dancy’ foram inoculadas e o fungo re-isolado, purificado e conservado em meio BDA, para posterior uso (VAN ZYL; FOURIE; SCHUTTE, 2013).

Para os ensaios de controle, mudas de tangerina ‘Dancy’ foram inoculadas com suspensões de *A. alternata* ( $1 \times 10^5$  conídios/mL) e, posteriormente, submetidas a câmara úmida por 24 horas.

Para o tratamento das mudas, foram utilizadas as formulações (na concentração de 10% v/v) que haviam sido armazenadas por seis meses em temperatura ambiente a  $22^\circ\text{C} \pm 2$ .

Com base nos resultados apresentados anteriormente por Souza (2018), cada isolado de *Bacillus* spp. utilizado no presente estudo, apresentou um maior nível de controle, quando aplicado 24 horas antes (ACB-08) e 24h após (ACB-01) à inoculação do fitopatógeno. Assim, as formulações à base de ACB-01 e ACB-08 foram pulverizadas de forma curativa e preventiva, respectivamente. Como controle positivo foi utilizado estrobilurina QoI (Comet®, BASF) em sua dose recomendada de 300mL/2000L de água, de forma preventiva e, como controle negativo, foi aplicado apenas água. Foi aplicado 1mL/planta de cada um dos tratamentos.

Cada formulação foi aplicada, também, em mistura com meia dose de estrobilurina (150 mL/2000L). Após os tratamentos, as plantas foram mantidas em condições de temperatura ambiente a  $28^\circ\text{C} \pm 2$  e umidade relativa de  $57\% \pm 5$ , durante todo o ensaio.

As avaliações iniciaram-se 48 horas após a inoculação e se estenderam diariamente até o quinto dia. Foi avaliado a severidade da doença, com o auxílio de uma escala diagramática variando entre 0 e 9 (0-0%; 1-0,1 à 0,49%; 2-0,5 à 1%; 3-1.1 à 2%; 4-2.1 à 4%; 5-4.1 à 8%, 6-8,1 à 18%; 7-18,1 à 30%; 8-30,1 à 50% e 9-50,1 à 90,0%), proposta por Perina et al. (2019) e adaptada para o presente estudo, a fim de se

determinar a área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD) proposta por Shaner e Finney (1977). A incidência da doença foi determinada pela porcentagem de folhas doentes em cada planta.

Foi realizado o seguinte esquema fatorial: 2 (*Bacillus*) x 2 (veículos de transporte: caulim e talco) x 2 (caldas de aplicação, correspondente a aplicação isolada das formulações e aplicação em mistura das formulações + estrobilurina) + 1 controle positivo (estrobilurina) + 1 controle negativo (testemunha, sem aplicação), com três repetições, sendo uma planta/repetição. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. O presente experimento foi repetido três vezes.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Efeito de compostos nitrogenados e elementos traços na atividade antagônica de *Bacillus* spp.

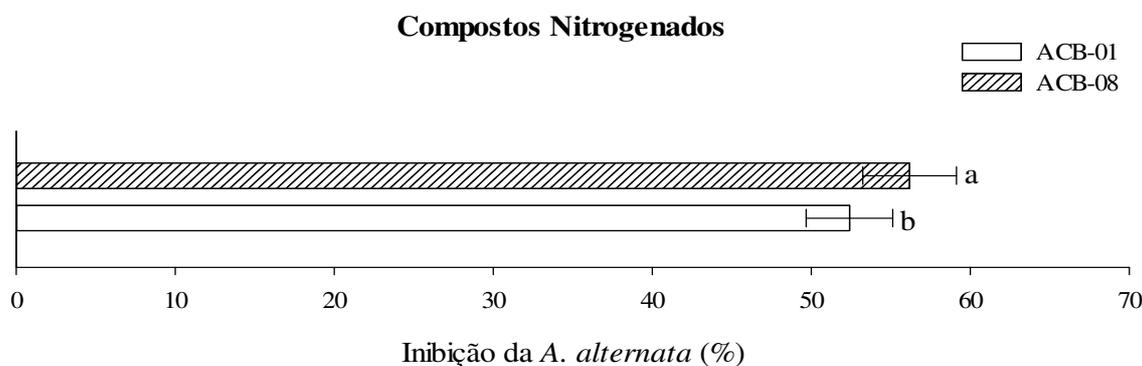
Observa-se que, a adição de compostos nitrogenados, em diferentes concentrações, junto ao meio de cultivo dos isolados de *Bacillus* spp. (ACB-01 e ACB-08), apresentaram interações significativas entre todos os fatores analisados, apresentando, inclusive, interações duplas e triplas, quanto ao desenvolvimento micelial de *A. Alternata* (Tabela 1).

**Tabela 1:** Análise de Variância do efeito de compostos nitrogenados, em diferentes concentrações, na atividade antagônica de *Bacillus subtilis* (ACB-01) e *B. amyloliquefaciens* (ACB-08), avaliado pela porcentagem de inibição do peso seco micelial de *Alternaria alternata*.

FV	GL	SQ	QM	F
<b>Isolados de <i>Bacillus</i> spp. (B)</b>	1	258,024	258,0245	8,56**
<b>Composto Nitrogenado (N)</b>	2	1008,19	504,0987	16,73**
<b>Concentração (C)</b>	3	886,451	295,4837	9,81**
<b>Interação: B x N</b>	2	903,909	451,9546	15,00**
<b>Interação: B x C</b>	3	1580,48	526,8276	17,48**
<b>Interação: N x C</b>	6	1286,98	214,4972	7,12**
<b>Interação: B x N x C</b>	6	1277,10	212,8505	7,06**
<b>Tratamentos</b>	23	7201,15	-	-
<b>Resíduo</b>	48	1446,51	30,1357	-
<b>Total</b>	71	8647,66	-	-

\*\*significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < 0.01$ ) FV = fonte de variação; GL = grau de liberdade; SQ = soma de quadrados; QM = quadrado médio; F = teste F.

Isolados de *Bacillus* spp. afetaram o desenvolvimento micelial da *A. Alternata*, no entanto, ACB-08 foi o que apresentou a maior porcentagem (56,18%) de inibição do peso seco micelial do fitopatógeno, quando comparado ao ACB-01 (52,40%) (Figura 1).



**Figura 1.** Porcentagem de inibição do peso seco micelial da *Alternaria alternata* pelo *Bacillus subtilis* (ACB-01) e *B. amyloliquefaciens* (ACB-08), cultivados em meio batata-dextrose acrescido de compostos nitrogenados. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ( $p \leq 0.01$ ).

A eficiência do antagonismo dos isolados ACB-01 e ACB-08 dependeu do tipo do composto nitrogenado e suas concentrações adicionado ao meio de cultivo da bactéria. Para o isolado ACB-01, a maior inibição (77%) ocorreu quando adicionou  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (0,02%) ao meio de cultivo. A maior inibição (80%) do peso micelial do fitopatógeno foi observada quando o isolado ACB-08 foi previamente cultivado em meio contendo  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (0,1%) (Tabela 2)

**Tabela 2:** Efeito de compostos nitrogenados, em diferentes concentrações, na atividade antagônica de *Bacillus subtilis* (ACB-01) e *B. amyloliquefaciens* (ACB-08), avaliado pela porcentagem de inibição do peso seco micelial de *Alternaria alternata*.

%	Compostos nitrogenados					
	ACB-01			ACB-08		
	Ureia	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	$\text{NH}_4\text{NO}_3$	Ureia	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	$\text{NH}_4\text{NO}_3$
<b>0</b>	54 aA $\alpha$	54 aA $\alpha$	54 aC $\alpha$	54 aB $\alpha$	54 aB $\alpha$	54 aBC $\alpha$
<b>0,02</b>	56 bA $\alpha$	41 cB $\alpha$	77 aA $\alpha$	51 aB $\beta$	46 bC $\beta$	55 aBC $\beta$
<b>0,1</b>	55 bA $\alpha$	45 cB $\beta$	63 aB $\alpha$	50 cB $\beta$	80 aA $\alpha$	62 bA $\alpha$
<b>0,5</b>	32 cB $\beta$	40 bB $\beta$	52 aC $\beta$	58 abA $\alpha$	54 abB $\alpha$	59 aAB $\alpha$
<b>CV (%)</b>	10,11					

(CV) Coeficiente de variação. Médias seguidas da mesma letra minúscula para linha e maiúscula para coluna, para cada *Bacillus* spp. (ACB-01 e ACB-08), e letras gregas ( $\alpha$  e  $\beta$ ), para o mesmo composto nitrogenado entre os *Bacillus* spp. (ACB-01 e ACB-08), não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ( $p \leq 0.01$ ).

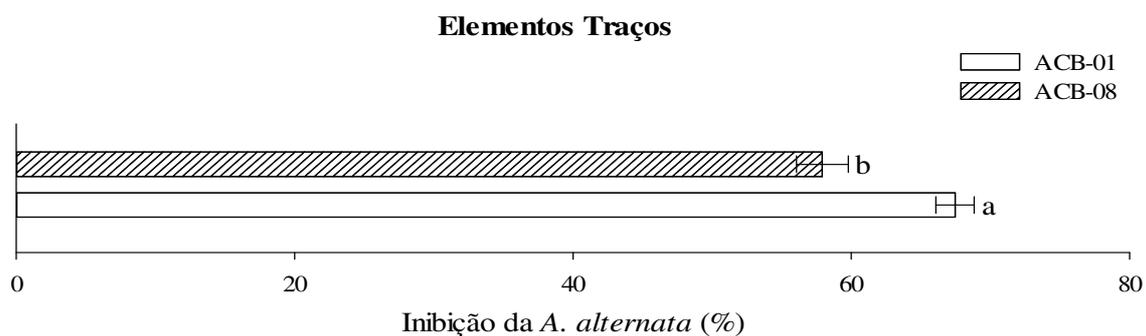
A adição de elementos traços, em diferentes concentrações, junto ao meio de cultivo dos isolados de *Bacillus* spp. (ACB-01 e ACB-08), apresentaram interações significativas entre todos os fatores analisados, apresentando, inclusive, interações duplas e triplas, quanto ao desenvolvimento micelial de *A. alternata* (Tabela 3).

**Tabela 3:** Análise de Variância do efeito de elementos traços, em diferentes concentrações, na atividade antagônica de *Bacillus subtilis* (ACB-01) e *B. amyloliquefaciens* (ACB-08), avaliado pela porcentagem de inibição do peso seco micelial de *Alternaria alternata*.

FV	GL	SQ	QM	F
<b>Isolados de <i>Bacillus</i> spp. (B)</b>	1	2737,42	2737,42	232,00**
<b>Elemento traço (E)</b>	4	8742,22	2185,55	185,23**
<b>Concentração (C)</b>	3	9686,55	3228,85	273,65**
<b>Interação: B x E</b>	4	6232,70	1558,17	132,06**
<b>Interação: B x C</b>	3	2313,37	771,124	65,35**
<b>Interação: E x C</b>	12	13339,3	1111,60	94,21**
<b>Interação: B x E x C</b>	12	6534,84	544,570	46,15**
<b>Tratamentos</b>	39	49586,4	-	-
<b>Resíduo</b>	80	943,933	11,7991	-
<b>Total</b>	119	50530,3	-	-

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < 0.01$ ) FV = fonte de variação; GL = grau de liberdade; SQ = soma de quadrados; QM = quadrado médio; F = teste F.

A adição de elementos traços, no meio de cultivo dos isolados de *Bacillus* spp., favoreceu a inibição do desenvolvimento micelial de *A. alternata*. *B. subtilis* ACB-01 apresentou maior antagonismo quando comparado com *B. amyloliquefaciens* ACB-08, com inibições de peso micelial do fungo de 67e 58%, respectivamente (Figura 2).



**Figura 2.** Porcentagem de inibição do peso seco micelial da *Alternaria alternata* pelo *Bacillus subtilis* (ACB-01) e *B. amyloliquefaciens* (ACB-08), cultivados em meio batata-dextrose acrescido de elementos traços. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ( $p \leq 0.01$ ).

A maior inibição (98%) do peso micelial de *A. alternata* pelo isolado ACB-01 ocorreu quando sulfato de manganês (1mM) foi previamente acrescido ao meio de cultivo da bactéria. Por outro lado, a maior porcentagem de inibição (98%) do peso micelial do fitopatógeno pelo isolado ACB-08 ocorreu quando o mesmo foi previamente cultivado em meio acrescido de cloreto de cobalto a 0,2mM (Tabela 4).

Observa-se, ainda que, ACB-01 cultivado com o ácido bórico nas menores concentrações (0,05 e 0,2mM) apresentou inibições entre 89 e 91% do peso seco micelial do fungo. ACB-08 em meio de cultivo contendo molibdato de amônio na concentração de 0,05mM provocou inibição de 88% no peso seco micelial de *A. alternata* (Tabela 4).

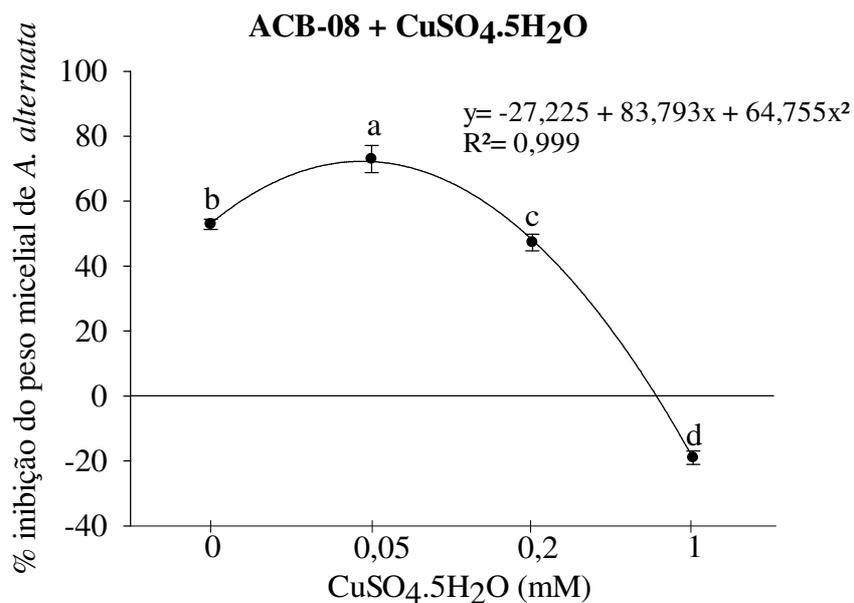
**Tabela 4:** Efeito de elementos traços, em diferentes concentrações, na atividade antagônica de *Bacillus subtilis* (ACB-01) e de *B. amyloliquefaciens* (ACB-08), avaliado pela porcentagem de inibição do peso seco micelial de *Alternaria alternata*.

mM	Elementos traços								
	ACB-01				ACB-08				
	SM	SC	MA	AB	CC	SM	MA	AB	CC
0	53 aD $\alpha$	53 aB $\alpha$	53 aB $\alpha$	53 aC $\alpha$	53 aC $\alpha$	53 aC $\alpha$	53 aC $\alpha$	53 aB $\alpha$	53 aC $\alpha$
0,05	73 bC $\alpha$	78 bA $\beta$	53 cB $\beta$	91 aA $\alpha$	52 cC $\beta$	69 cB $\alpha$	88 aA $\alpha$	59 dA $\beta$	77 bB $\alpha$
0,2	91 aB $\alpha$	56 cB $\beta$	72 bA $\alpha$	89 aA $\alpha$	78 bA $\beta$	72 bB $\beta$	69 cB $\alpha$	59 dA $\beta$	98 aA $\alpha$
1	98 aA $\alpha$	56 dB $\beta$	40 eC $\beta$	72 b B $\alpha$	61 cB $\alpha$	81 aA $\beta$	53 bC $\alpha$	58 bA $\beta$	44 cD $\beta$
CV (%)	5,47								

(CV) Coeficiente de variação. (SM) Sulfato de manganês -  $MnSO_4 \cdot H_2O$ . (SC) Sulfato de cobre -  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ . (MA) molibdato de amônio -  $H_24Mo_7N_6O_{24}$ . (AB) Ácido bórico -  $H_3BO_4$ . (CC) Cloreto de cobalto -  $CoCl_2 \cdot 12H_2O$ . Médias seguidas da mesma letra minúscula para linha e maiúscula para coluna, para cada *Bacillus* spp. (ACB-01 e ACB-08), e letras gregas ( $\alpha$  e  $\beta$ ), para o mesmo composto nitrogenado entre os *Bacillus* spp. (ACB-01 e ACB-08), não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ( $p \leq 0.01$ ).

Os dados relacionados ao efeito do elemento traço  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  na atividade antagônica de *B. amyloliquefaciens* ACB-08 a *A. alternata* encontram-se apresentados na Figura 3.

Os resultados obtidos se ajustaram melhor ao modelo quadrático, com a otimização da eficiência do antagonismo quando a concentração de 0,05 mM do elemento foi adicionada ao meio de cultivo. Nota-se que, à medida que se aumentou a concentração ocorreu diminuição na porcentagem de inibição do peso seco micelial de *A. alternata*. Observa-se que para a concentração de 1 mM, o  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  além de desfavorecer o antagonismo do ACB-08, favoreceu um maior desenvolvimento do fungo em até 19% em relação à ausência do elemento no meio (Figura 3).



**Figura 3.** Porcentagem de inibição do peso seco micelial de *Alternaria alternata* por *Bacillus amyloliquefaciens* (ACB-08) cultivado em meio batata-dextrose em diferentes concentrações de sulfato de cobre.

Quando se observa o efeito direto dos melhores compostos (nitrogenado e elemento traço) sobre o peso micelial do fitopatógeno sem a interferência da bactéria, os aditivos (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O inibiram, significativamente, o desenvolvimento da *A. alternata*. Inferindo-se que dentre os 98% de inibição com o ACB-01 cultivado com MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O a 1mM e 80% de inibição com o ACB-08 cultivado com (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 0,1% (Tabela 4 e 2), 30,3 e 24,2% destas inibições podem ser atribuídas ao próprio aditivo (Tabela 5).

Fato que não ocorre para adição do NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> na concentração de 0,02% e CoCl<sub>2</sub>.12H<sub>2</sub>O na concentração de 0,2Mm que ao não diferir do tratamento testemunha (Tabela 5), atribui os 77 e 98% de inibição do peso seco micelial apenas ao ACB-01 e ACB-08, respectivamente (Tabela 2 e 4) .

**Tabela 5:** Porcentagem de inibição do peso seco micelial da *Alternaria alternata*, após cultivo do fungo em meio batata-dextrose acrescido de diferentes aditivos.

Aditivos	Peso seco micelial (g)	Inibição (%)
Testemunha	0,0330 A	-
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> (0,02%)	0,0396 A	0,00 A
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (0,1%)	0,0233 B	30,3 B
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O (1mM)	0,0248 B	24,2 B
CoCl <sub>2</sub> .12H <sub>2</sub> O (0,2mM)	0,0335 A	0,00 A
CV (%)	8,33	

(CV) Coeficiente de variação. Médias seguidas das mesmas letras para coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Quando os aditivos foram combinados NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (0,02%) + MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O (1mM), a atividade antagônica do ACB-01 foi menor do que quando não houve aditivos no meio de cultivo. Para o ACB-08, o cultivo do antagonista em meio utilizando a combinação dos aditivos (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,1%) + CoCl<sub>2</sub>.12H<sub>2</sub>O (0,2mM), apresentou a eficiência de antagonismo estatisticamente similar quando não houve aditivos. (Tabela 6).

**Tabela 6:** Porcentagem de inibição do peso seco micelial da *Alternaria alternata* pelos isolados de *Bacillus* spp.(ACB-01e ACB-08) cultivados em meio batata-dextrose acrescido de aditivos combinados ou sem aditivos.

Combinações	Peso micelial (g)	Inibição (%)
Testemunha	0,0560 A	-
ACB01 - NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> (0,02%) + MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O (1mM)	0,0374 B	33,21 A
ACB08 - Sem aditivos	0,0201 C	64,10 B
ACB01 - Sem aditivos	0,0176 C	68,57 B
ACB08 - (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (0,1%) + CoCl <sub>2</sub> .12H <sub>2</sub> O (0,2mM)	0,0161 C	71,25 B
CV (%)	9,6	

(CV) Coeficiente de variação. Médias seguidas pelas mesmas letras para coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Frente o exposto foram selecionados dois elementos traços para compor as formulações: MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O (1mM) para o ACB-01 e CoCl<sub>2</sub>.12H<sub>2</sub>O (0,2mM) para o ACB-08.

## 5.2 Formulações e vida de prateleira

Após dois meses de vida de prateleira, as formulações à base de *Bacillus* spp (ACB-01 ou ACB-08) contendo amido como veículo de transporte e, independente da temperatura de armazenamento, apresentaram segregação entre os ingredientes,

dificultando seu processo de homogeneização, conforme ilustrado na Figura 4. Esta característica foi o suficiente para inviabilizar a aplicação destas formulações nos ensaios de controle da mancha marrom de alternaria.

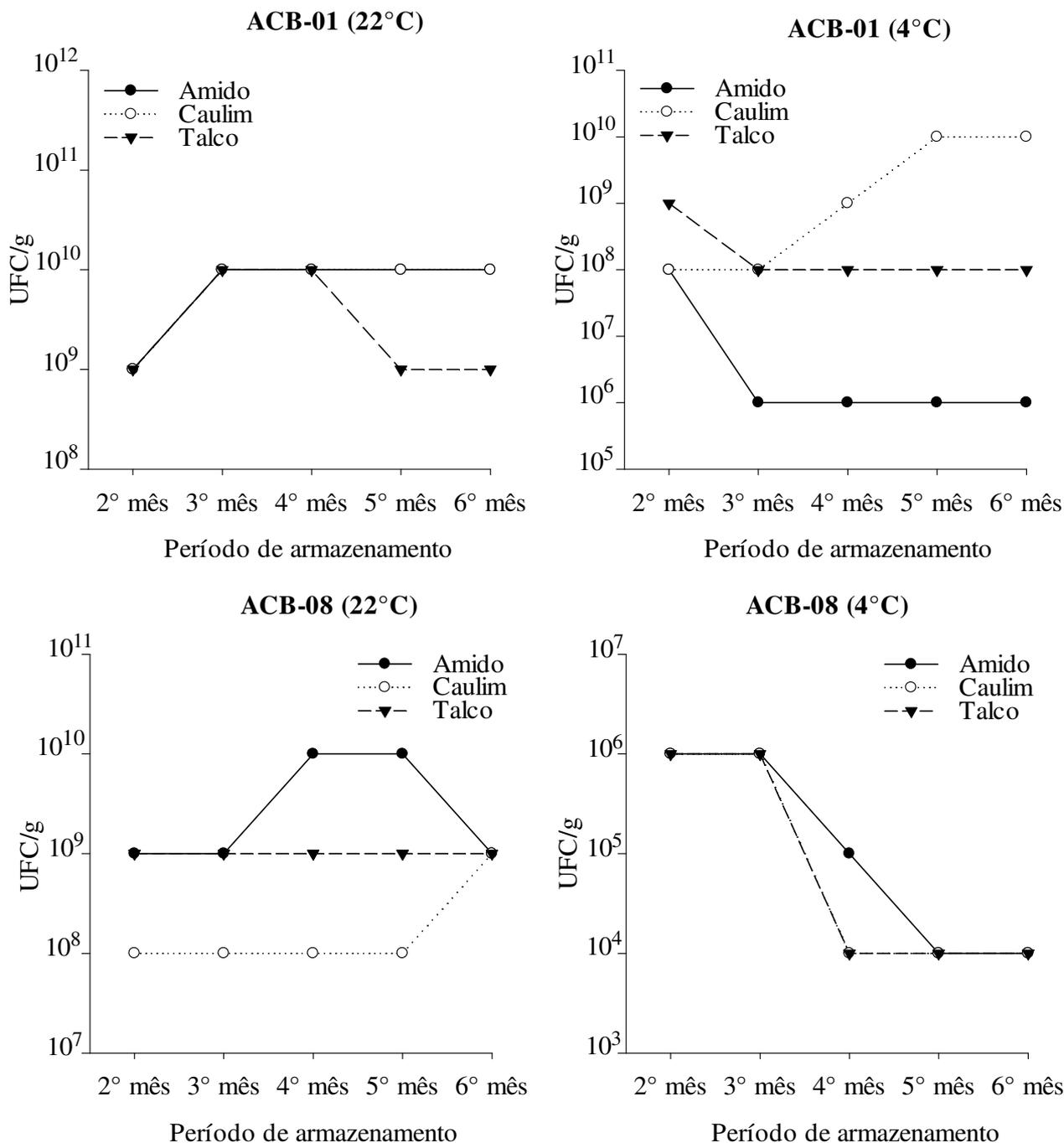


**Figura 4.** Formulações à base de *Bacillus subtilis* (ACB-01) em diferentes veículos de transporte. Amido (A), talco (B) e caulim (C). Após dois meses de armazenamento a 22°C. Fonte: Autor, 2019.

As formulações a base de ACB-01 e armazenadas a 22°C aumentaram sua viabilidade a partir do segundo mês. Destacando-se a formulação tendo caulim como veículo de transporte que além de aumentar, manteve sua sobrevivência ( $10^{10}$  UFC/g) até o sexto mês avaliado (Figura 5).

Todas as formulações à base do ACB-08 armazenadas a 4°C perderam sua viabilidade desde o segundo mês até o sexto mês avaliado ( $10^4$  UFC/g). Para as formulações à base do ACB-01 armazenadas a 4°C, esta perda foi observada apenas quando se utilizou o amido de milho como veículo de transporte, a partir do terceiro mês (Figura 5).

De maneira geral, pode-se observar que as formulações à base de ACB-01 e ACB-08 armazenadas a 22°C mantiveram e aumentaram a sua viabilidade até o sexto mês de armazenamento. Para o ACB-08 a temperatura de 4°C não favoreceu a sobrevivência da bactéria, independente do veículo de transporte (Figura 5).



**Figura 5.** Sobrevivência de isolados de *Bacillus* spp., em diferentes veículos de transporte e diferentes temperaturas (22 e 4°C), avaliada através da unidade formadora de colônia da bactéria por grama da formulação (UFC/g), durante seis meses de armazenamento.

### 5.3 Eficiência das formulações no crescimento micelial de *Alternaria alternata*

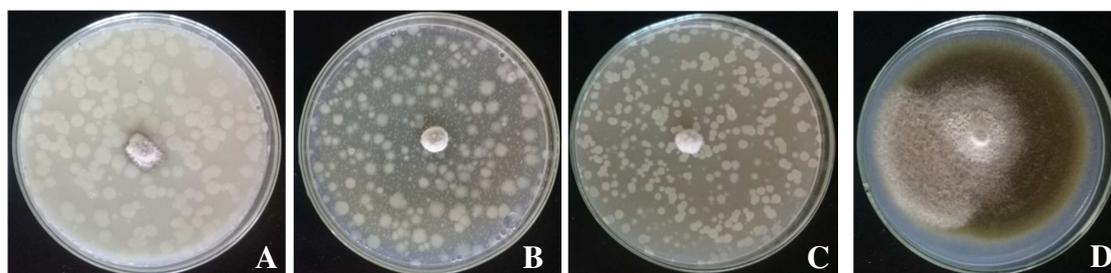
Pelos dados estatísticos apresentados na Tabela 7, verifica-se que, houve interação significativa para todos os fatores isolados e nas interações duplas e triplas, no estudo sobre o efeito das formulações no crescimento micelial da *A. Alternata*.

**Tabela 7:** Análise de Variância do efeito de formulações, à base de *Bacillus* spp. com diferentes veículos de transporte e concentrações, no crescimento micelial de *Alternaria alternata*, após armazenamento a 22 °C por 2 meses.

FV	GL	SQ	QM	F
Isolados de <i>Bacillus</i> spp. (B)	1	908,62581	908,62581	1842,07**
Veículo de Transporte (V)	2	132,96155	66,480776	134,78**
Concentrações (C)	4	134741,79	33685,449	68290,87**
Interação: B x V	2	262,84465	131,42232	266,43**
Interação: B x C	4	403,26455	100,81613	204,39**
Interação: V x C	8	207,92542	25,990677	52,69**
Interação: B x V x C	8	282,83567	35,354459	71,67**
Tratamentos	29	136940,25	-	-
Resíduo	120	59,191720	0,4932643	-
Total	149	136999,44	-	-

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < 0.01$ ) FV = fonte de variação; GL = grau de liberdade; SQ = soma de quadrados; QM = quadrado médio; F = teste F.

Todas as formulações à base de ACB-01 e ACB-08, tendo como veículo de transporte o amido, caulim e talco, em todas as concentrações testadas, diminuiram o crescimento micelial do fitopatógeno, quando comparado ao tratamento testemunha. Porém, quando se avalia o desempenho de cada isolado bacteriano individualmente, nota-se que as formulações à base de *B. subtilis* ACB-01 foram as que mais inibiram o desenvolvimento de *A. alternata*. (Figura 6 e Tabela 8).



**Figura 6.** Efeito das formulações à base de *B. subtilis* ACB-01 (2,5%) no crescimento micelial de *Alternaria alternata*. Formulações constituídas de (A) amido, (B) caulim, (C) talco e (D) testemunha. Fonte: Autor, 2019.

Foi observado, também, que as formulações à base de ACB-01, tendo o talco como veículo de transporte em concentrações acima de 5%, permitiram um pequeno aumento no desenvolvimento da colônia do fungo, porém, continuam diferindo, do tratamento testemunha (Tabela 8).

Para o isolado ACB-08, concentrações acima de 2,5% e 5% de caulim e amido, respectivamente diminuíram a inibição do tamanho da colônia de *A. alternata*. Formulações da bactéria contendo talco com veículo de transporte em concentrações que variam de 0,5 a 10% inibiram, significativamente, o desenvolvimento do fitopatógeno (Tabela 8).

**Tabela 8:** Eficiência das formulações à base de isolados de *Bacillus* spp., em diferentes veículos de transporte e concentrações, na porcentagem de inibição do tamanho da colônia de *Alternaria alternata*.

Formulação	ACB-01			ACB-08		
	% de inibição da colônia			% de inibição da colônia		
	Amido	Caulim	Talco	Amido	Caulim	Talco
0	0 aB $\alpha$	0 aB $\alpha$	0 aC $\alpha$	0 aD $\alpha$	0 aC $\alpha$	0 aB $\alpha$
0,5	100 aA $\alpha$	100 aA $\alpha$	100 aA $\alpha$	89 aA $\beta$	88 aA $\beta$	97 aA $\beta$
2,5	100 aA $\alpha$	100 aA $\alpha$	100 aA $\alpha$	88 aA $\beta$	84 bA $\beta$	99 aA $\alpha$
5	100 aA $\alpha$	100 aA $\alpha$	87 bB $\beta$	84 bB $\beta$	85 bA $\beta$	99 aA $\alpha$
10	100 aA $\alpha$	100 aA $\alpha$	89 bA $\beta$	72 cC $\beta$	80 bB $\beta$	100 aA $\alpha$
CV (%)				3		

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna, para cada *Bacillus* spp. (ACB-01 e ACB-08), e letras gregas ( $\alpha$  e  $\beta$ ), para concentração e veículos de transporte entre os isolados da bactéria, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ( $p \leq 0.01$ ).

#### 5.4 Eficiência das formulações na germinação dos conídios de *A. alternata*

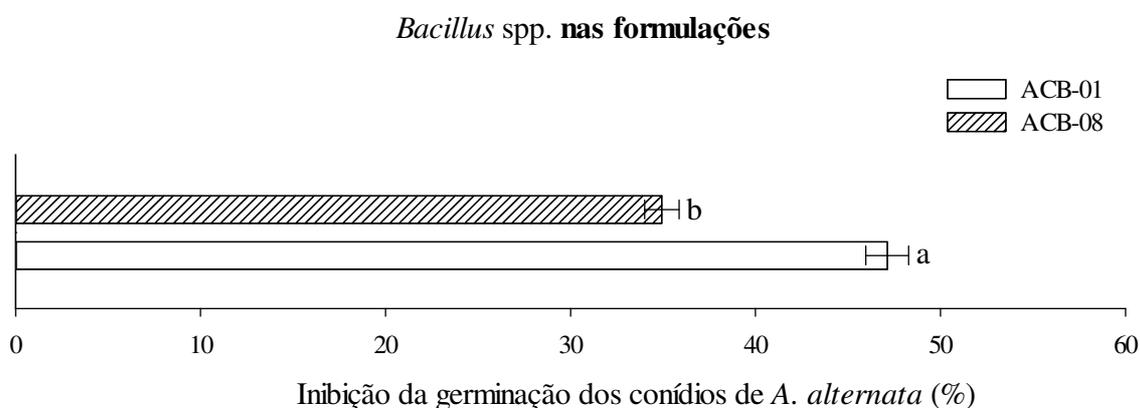
A adição das formulações em diferentes concentrações apresentou interação significativa entre todos os fatores isolados e entre as interações dupla e tripla, sobre a germinação dos conídios de *Alternaria alternata* (Tabela 9).

**Tabela 9:** Análise de Variância do efeito de formulações, à base de *Bacillus* spp. com diferentes veículos de transporte e concentrações, na germinação de *Alternaria alternata*.

FV	GL	SQ	QM	F
Isolados de <i>Bacillus</i> spp. (B)	1	12446,50	12446,50	756,34**
Veículo de Transporte (V)	2	12793,41	6396,705	388,71**
Concentrações (C)	6	90386,86	15064,47	915,43**
Interação: B x V	2	1978,220	989,1101	60,11**
Interação: B x C	6	3193,559	532,2599	32,34**
Interação: V x C	12	5214,630	434,5525	26,41**
Interação: B x V x C	12	3663,154	305,2628	18,55**
Tratamentos	41	129676,3	-	-
Resíduo	294	4838,125	16,45620	-
Total	335	134514,4	-	-

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < 0.01$ ) FV = fonte de variação; GL = grau de liberdade; SQ = soma de quadrados; QM = quadrado médio; F = teste F.

Todas as formulações afetaram a germinação da *A. alternata*, no entanto as formulações a base de ACB-01 mostraram maior eficiência quando comparada as formulações a base de ACB-08 com médias gerais de 47 e 35 % de inibição dos conídios de *A. alternata*, respectivamente (Figura 7).



**Figura 7.** Efeito das formulações à base de *Bacillus subtilis* (ACB-01) e *B. amyloliquefaciens* (ACB-08) na porcentagem de inibição da germinação dos conídios de *Alternaria alternata*. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ( $p \leq 0.01$ ).

Independente do veículo de transporte e *Bacillus* spp., utilizado nas formulações, todos os tratamentos inibiram a germinação dos conídios de *A. alternata*, enfatizando que, a medida que se aumentou as concentrações dos tratamentos, maior foi sua eficiência (Tabela 10).

Dentre os isolados de *Bacillus* spp., houve diferença estatística entre os veículos de transporte para cada concentração estudada, onde as formulações à base de ACB-01 contendo caulim e talco nas concentrações acima de 1% apresentaram os melhores resultados, diferindo estatisticamente do amido. Enquanto que as formulações à base de ACB-08 contendo caulim ou talco, acima de 2,5%, não diferiram entre si e apresentaram valores de inibição da germinação de conídios de *A. alternata* de 38 a 68%. A formulação com o isolado ACB-08, tendo o caulim como veículo de transporte na concentração de 10% apresentou o melhor resultado com 68% de inibição da germinação (Tabela 10).

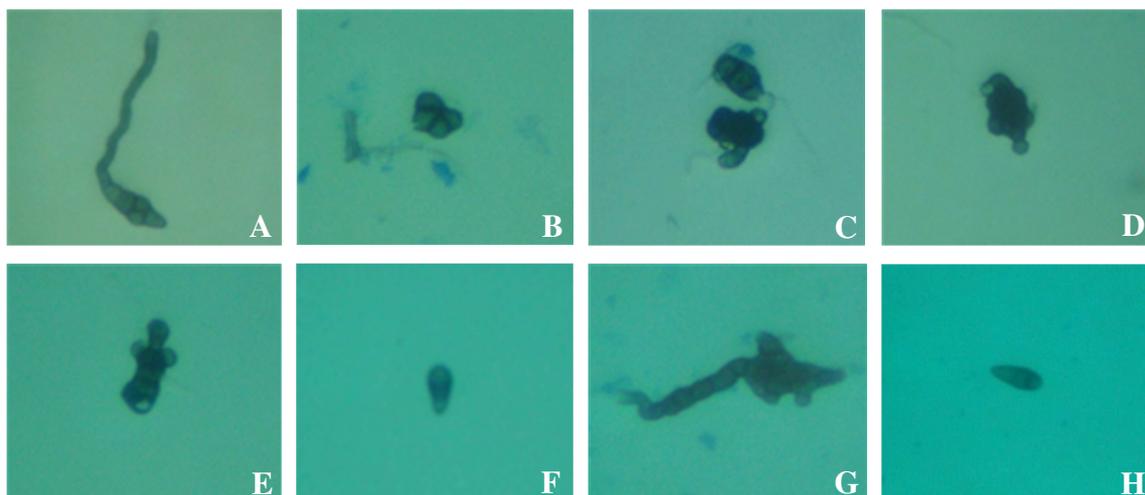
Quando se compara as formulações à base de cada isolado bacteriano, observa-se que, de forma geral, o isolado ACB-01 apresentou os melhores resultados do que ACB-08, tendo o talco e caulim como veículos de transportes (Tabela 10).

**Tabela 10:** Efeito das formulações à base de *Bacillus subtilis* (ACB-01) e *B. amyloliquefaciens* (ACB-08), em diferentes veículos de transporte e concentrações, na porcentagem de inibição da germinação dos conídios de *Alternaria alternata*.

(%)	ACB-01			ACB-08		
	Inibição dos conídios (%)			Inibição dos conídios (%)		
	Amido	Caulim	Talco	Amido	Caulim	Talco
0	-	-	-	-	-	-
0,1	20 cD $\alpha$	58 aB $\alpha$	49 bC $\alpha$	5 bE $\beta$	29 aD $\beta$	30 aC $\beta$
0,5	24 cD $\alpha$	62 aAB $\alpha$	53 bC $\alpha$	25 bD $\alpha$	32 aD $\beta$	31 aC $\beta$
1	35 bC $\alpha$	64 aA $\alpha$	62 aB $\alpha$	32 bC $\alpha$	39 aC $\beta$	32 bC $\beta$
2,5	39 bC $\alpha$	65 aA $\alpha$	64 aB $\alpha$	36 aC $\alpha$	38 aC $\beta$	41 aB $\beta$
5	55 bB $\alpha$	66 aA $\alpha$	72 aA $\alpha$	42 bB $\beta$	58 aB $\beta$	54 aA $\beta$
10	61 bA $\alpha$	69 aA $\alpha$	72 aA $\alpha$	49 cA $\beta$	68 aA $\alpha$	57 bA $\beta$
CV (%)	7,76					

(CV) Coeficiente de variação. Médias seguidas da mesma letra minúscula para linha e maiúscula para coluna, para cada *Bacillus* spp. (ACB-01 e ACB-08), e letras gregas ( $\alpha$  e  $\beta$ ), para formulação e veículo de transporte entre os *Bacillus* spp. (ACB-01 e ACB-08), não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ( $p \leq 0.01$ ).

Todas as formulações e independente da concentração, além de afetarem a germinação, causaram deformações morfológicas nos conídios de *A. alternata* (Figura 8).



**Figura 8.** Efeito das formulações na morfologia dos conídios de *Alternaria alternata*. (A) Testemunha; (B) ACB-08 + amido a 2,5%; (C) ACB-08 + talco a 10%; (D) ACB-01 + caulim a 0,5%; (E) ACB-01 + talco a 10%; (F) ACB-01 + talco a 5%; (G) ACB-01 + caulim a 2,5%; (H) Tween-20 a 3,8%. Visualização em microscópio óptico posicionado na objetiva de 10x. Fonte: Autor, 2019.

Os aditivos e adjuvantes utilizados nas formulações apresentaram potencial de inibição na germinação dos conídios de *A. alternata*. Enfatizando o  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  que apesar de não ter diferido estatisticamente do glicerol, apresentou a maior porcentagem de inibição com 19,5% (Tabela 11). Para este caso, não foram observadas deformações morfológicas dos conídios.

**Tabela 11:** Efeito de aditivos e adjuvantes na geminação de conídios de *Alternaria alternata*.

Aditivos e Adjuvantes	Conídios germinados	Inibição (%)
Testemunha	87 A	-
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (1mM)	70 C	19,5 A
$\text{CoCl}_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (0,2mM)	75 B	13,7 B
Glicerol (17,3%)	72 CB	17,2 AB
Tween-20 (3,8%)	75 B	13,7 B
CV (%)	5,29	

Coefficiente de variação (CV). Médias seguidas da mesma letra para coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ( $p \leq 0.01$ ).

### 5.5 Eficiência das formulações à base de *Bacillus* spp. no controle da mancha marrom de alternaria

Os dados de avaliação da severidade da mancha marrom de alternaria em mudas de tangerina ‘Dancy’, após inoculação com *A. alternata* e tratadas com as diferentes

formulações à base de *Bacillus* spp., combinadas ou não com o produto químico (estrobilurina) encontram-se nas Tabelas 12 e 13.

**Tabela 12:** Análise de Variância para o efeito das formulações à base de *Bacillus subtilis* (ACB-01) e *B. amyloliquefaciens* (ACB-08), em diferentes veículos de transporte e, dois tipos de calda (mistura, ou não, das formulações com estrobilurina), avaliado pela Área Abaixo da Curva de Progressão da Doença (AACPD).

FV	GL	SQ	QM	F
<b>Isolados de <i>Bacillus</i> spp. (B)</b>	1	0,0452	0,0452	0,17ns
<b>Veículo de Transporte (V)</b>	1	0,1739	0,1739	0,66ns
<b>Calda (C)</b>	1	5,2916	5,2916	19,97**
<b>Interação B x V</b>	1	0,0002	0,0002	0,00ns
<b>Interação B x C</b>	1	7,7740	7,7740	29,34ns
<b>Interação V x C</b>	1	0,1437	0,1437	0,54ns
<b>Interação B x V x C</b>	1	8,2240	8,2240	31,03**
<b>Fatorial</b>	7	21,652	3,0932	11,67**
<b>Adicional x Fatorial</b>	1	75,493	75,493	284,89**
<b>Adicional</b>	1	33,197	33,197	125,28**
<b>Tratamentos</b>	9	130,34	14,482	54,65**
<b>Resíduo</b>	20	5,2999	0,2649	-
<b>Total</b>	29	135,64	-	-

\*\* significativo e não significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < 0.01$ ); ns não significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < 0.05$ ); FV = fonte de variação; GL = grau de liberdade; SQ = soma de quadrados; QM = quadrado médio; F = teste F.

As plantas tratadas com formulação à base de *B. subtilis* ACB-01, tendo como veículo de transporte o caulim, apresentaram os menores tamanhos de lesões da doença, diferindo, estatisticamente da formulação à base do isolado mais o talco (Tabela 13).

Considerando a formulação à base de *B. amyloliquefaciens* ACB-08, as menores lesões da mancha marrom de alternaria foram obtidas quando o microrganismo teve o talco como veículo de transporte. (Tabela 13).

Essas duas formulações (ACB-01 + caulim e ACB-08 + talco) aplicadas sozinhas em mudas de tangerina ‘Dancy’ para controle da doença não diferiram das aplicações das formulações combinadas com o fungicida (estrobilurina), quando se avaliou a severidade da doença (Tabela 13).

**Tabela 13:** Efeito das formulações à base de *Bacillus subtilis* (ACB-01) e *B. amyloliquefaciens* (ACB-08), combinadas ou não com estrobilurina, após aplicação em mudas de tangerina ‘Dancy’, para o controle da mancha marrom de alternaria, avaliado por meio da área abaixo da curva de progressão da doença (AACPD).

AACPD				
Tratamentos	ACB-01		ACB-08	
	Caulim	Talco	Caulim	Talco
Formulações	2,36 bA $\beta$	3,88 aA $\alpha$	4,58 aA $\alpha$	1,49 bA $\beta$
Formulações + QoI	3,52 aA $\alpha$	2,39 aB $\alpha$	3,39 aA $\alpha$	2,33 aA $\alpha$
Controle da MMA em relação à testemunha sem aplicação (%)				
Tratamentos	ACB-01		ACB-08	
	Caulim	Talco	Caulim	Talco
Formulações	75 aA $\alpha$	58 bA $\beta$	51 bA $\beta$	84 aA $\alpha$
Formulações + QoI	62 aA $\alpha$	74 aB $\alpha$	63 aA $\alpha$	75 aA $\alpha$
CV (%)	13,58			

(CV) Coeficiente de variação. (Formulações + QoI), formulações e estrobilurina em uma mesma calda de aplicação. Médias seguidas da mesma letra minúscula para linha e maiúscula para coluna, para cada *Bacillus* spp. (ACB-01 e ACB-08), e letras gregas ( $\alpha$  e  $\beta$ ), para formulação e veículo entre os *Bacillus* spp. (ACB-01 e ACB-08), não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ( $p \leq 0.01$ ).

Os dados de incidência da doença, avaliada por meio da porcentagem de folhas doentes em mudas de tangerina ‘Dancy’, após inoculação com *A. alternata* e tratadas com as diferentes formulações, combinadas, ou não, com estrobilurina, encontram-se nas Tabelas 14 e 15.

**Tabela 14:** Análise de Variância para o efeito das formulações à base de *Bacillus subtilis* (ACB-01) e *B. amyloliquefaciens* (ACB-08) em diferentes veículos de transporte e dois tipos de calda (mistura, ou não, das formulações com estrobilurina), avaliado pela incidência de folhas doentes (%).

FV	GL	SQ	QM	F
Isolados de <i>Bacillus</i> spp. (B)	1	0,3534	0,3534	0,03ns
Veículo de Transporte (V)	1	73,162	73,162	5,25*
Calda (C)	1	267,99	267,99	19,22**
Interação B x V	1	386,29	386,29	27,71**
Interação B x C	1	697,55	697,55	50,03**
Interação V x C	1	28,214	28,214	2,02ns
Interação B x V x C	1	112,18	112,18	8,05*
Fatorial	7	1565,7	223,68	16,04**
Adicional x Fatorial	1	6342,4	6342,4	454,92**
Adicional	1	525,08	525,08	37,66**
Tratamentos	9	8433,2	937,02	67,21**
Resíduo	20	278,83	13,941	-
Total	29	8712,1	-	-

\*, \*\* significativo ao nível de 5 e 1% de probabilidade ( $p < 0.01$ ), ns não significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < 0.05$ ); FV = fonte de variação; GL = grau de liberdade; SQ = soma de quadrados; QM = quadrado médio; F = teste

As plantas tratadas com formulação à base de *B. subtilis* ACB-01, tendo como veículo de transporte o caulim, apresentaram as menores porcentagens de folhas doentes, diferindo, estatisticamente da formulação à base do isolado mais o talco (Tabela 15).

A formulação à base de *B. amyloliquefaciens* ACB-08, contendo o talco como veículo de transporte, apresentou as menores porcentagens de folhas doentes, quando comparado com ACB-08 tendo o caulim como veículo de transporte ou com ACB-01 com talco (Tabela 15).

A formulação à base de ACB-01 + caulim aplicada sozinha não diferiu, significativamente, da aplicação combinada com fungicida. No entanto, a formulação ACB-08 + talco aplicada sozinha nas mudas de Tangerina ‘Dancy’ proporcionou, significativamente, um maior controle da doença quando comparada com a combinação da formulação + estrobilurina (Tabela 15).

**Tabela 15:** Efeito das formulações à base de *Bacillus subtilis* (ACB-01) e *B. amyloliquefaciens* (ACB-08), combinadas ou não com estrobilurina, após aplicação em mudas de tangerina ‘Dancy’ para o controle da mancha marrom de alternaria, avaliado pela porcentagem de folhas doentes (%).

Tratamentos	Porcentagem de folhas doentes			
	ACB-01		ACB-08	
	Caulim	Talco	Caulim	Talco
Formulações	27,50 bA $\alpha$	38,09 aA $\alpha$	34,34 aB $\alpha$	14,72 bB $\beta$
Formulações + QoI	29,46 aA $\beta$	27,07 aB $\alpha$	43,70 aA $\alpha$	28,39 bA $\alpha$
CV (%)	9,90			

(CV) Coeficiente de variação. (Formulações + QoI), formulações e estrobilurina em uma mesma calda de aplicação. Médias seguidas da mesma letra minúscula para linha e maiúscula para coluna, para cada a *Bacillus* spp. (ACB-01 e ACB-08), e letras gregas ( $\alpha$  e  $\beta$ ), para formulação e veículo entre os *Bacillus* spp. (ACB-01 e ACB-08), não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

Todas as formulações testadas, independentes se foram, ou não, combinadas com estrobilurina, foram mais eficientes no controle da doença do que quando as plantas foram pulverizadas com o tratamento químico, indicado comercialmente para no controle da doença (Tabela 16).

**Tabela 16:** Efeito de tratamentos adicionais (água ou estrobilurina) aplicados em mudas de tangerina ‘Dancy’ enxertadas sobre limão Cravo no controle da mancha marrom de alternaria (MMA). Avaliado pela área abaixo da curva de progressão da doença (AACPD) e pela porcentagem de folhas doentes.

<b>Tratamentos adicionais</b>	<b>AACPD</b>	<b>Controle da MMA em relação à testemunha (%)</b>
Testemunha	9,31 A	-
Estrobilurina (QoI)	4,61 B	50,48
CV (%)		13,58
<b>Tratamentos adicionais</b>	<b>Porcentagem de folhas doentes (%)</b>	
Testemunha	76,11 A	
Estrobilurina (QoI)	57,40 B	
CV (%)	9,90	

(CV) Coeficiente de variação. (MMA) mancha marrom de alternaria. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ( $p \leq 0.01$ ).

Independente do antagonista, as formulações utilizando caulim, como veículo de transporte, apresentaram resíduos sobre a superfície das folhas que se mantiveram até o último dia de avaliação (Figura 9B).



**Figura 9.** Efeito das formulações aplicadas de forma isoladas para o controle da mancha marrom de alternaria em mudas de tangerina ‘Dancy’ enxertadas sobre limão Cravo. 72 horas após a inoculação da *Alternaria alternata*. (A) Testemunha; (B) ACB-01 + caulim; (C) ACB-08 + talco. Tratamentos aplicados de forma isolada. Fonte: Autor, 2019.

## 6. DISCUSSÕES

Buscando otimizar o desempenho dos agentes de controle biológico e, pensando na formulação futura de um bioproduto, a adição de aditivos em meio de cultivo do antagonista poderá proporcionar uma vantagem competitiva ou, uma inibição direta do patógeno, quando na interação entre os microrganismos, como, também, favorecer a elicitação da resistência sistêmica no tecido do hospedeiro, por meio de suas células ou, de metabólitos produzidos (LOCATELLI et al. 2018; GRAMISCI et al., 2018).

A fisiologia do microrganismo, a forma como o aditivo está disponível e sua dosagem, são fatores preponderantes a serem considerados na confecção de formulações biológicas (ZHANG et al. 2003). Diante do exposto, o presente estudo mostrou que, com exceção do sulfato de cobre (1mM) para *B. amyloquifaciens*-ACB-08, a maioria dos aditivos utilizados favoreceu o antagonismo dos isolados bacterianos, afetando o desenvolvimento micelial de *A. alternata*. É pertinente mencionar que cada antagonista apresentou uma resposta diferente para um mesmo aditivo e concentração. Esta resposta pode ser justificada pela diferença na fisiologia do isolado, como relatado acima pelos autores.

Estudos têm evidenciado a eficiência de compostos nitrogenados como aditivos em formulações biológicas. KLEIN et al. (2016) encontraram resultados positivos para o controle da podridão floral em citros (*Colletotrichum acutatum*), quando as formulações à base de *Bacillus subtilis* foram otimizadas utilizando ureia (0,02%), como aditivo. Por outro lado, Wiyono et al. (2008) ao estudarem o desenvolvimento de uma formulação à base de *Pseudomonas fluorescens*, verificaram que os compostos nitrogenados, como ureia, sulfato de amônio e nitrato de amônio, adicionadas em meio de cultivo da bactéria, reduziram o potencial antagônico do microrganismo e favoreceram o crescimento de *Pythium ultimum*. Esses estudos mostram a importância quanto à seleção prévia dos aditivos antes do desenvolvimento de uma formulação.

A adição de elementos traços ao meio de cultivo dos isolados de *Bacillus* spp. potencializou o antagonismo, diminuindo o desenvolvimento micelial de *A. alternata*. O resultado do respectivo estudo corrobora com Wiyono et al. (2008), de acordo com os autores, a adição de  $MnSO_4 \cdot H_2O$ ,  $ZnSO_4$  e  $H_3BO_3$  no cultivo de *P. fluorescens*, potencializou a produção de metabólitos pela bactéria e a atividade de biocontrole contra *P. ultimum*. Os resultados apresentados neste trabalho mostraram, ainda, o efeito

direto do  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (na ausência da bactéria) e da combinação dos melhores aditivos no cultivo da bactéria sobre a diminuição do peso micelial do fungo (Tabela 5 e 6).

Os aditivos à base de  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  e  $\text{H}_3\text{BO}_3$  têm sido utilizados na citricultura como importantes fontes nutricionais, aplicadas, principalmente, via fertilizantes foliares (SANTOS et al., 1999; MATTOS et al., 2017). Consta, ainda, nos resultados obtidos por Wiyono et al. (2009), que apesar de ambos os elementos traços potencializarem a atividade antagônica da *P. fluorescens* apenas o  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  apresentou aumento na altura e massa seca em mudas de beterrabas, atuando como promotor de crescimento.

Pelos dados apresentados no estudo, o  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (1mM), como aditivo para *B. amyloliquefacies*-ACB-08, desfavoreceu o antagonismo da bactéria e propiciou um maior desenvolvimento do fitopatógeno (Figura 3). Alguns autores sugerem que o tamanho e a morfologia de partículas de cobre, seu estado de oxidação e estabilidade, sob condições ambientais, solubilidade e liberação de íons desempenham papéis fundamentais na atividade antifúngica (VAN-ZYL et al. 2013; HERMIDA-MONTERO et al. 2019).

Apesar dos resultados satisfatórios obtidos com os compostos nitrogenados, nenhum deles foi utilizado para compor as formulações, uma vez que, os elementos traços foram os que apresentaram, de forma geral, um maior aporte na atividade antagônica dos *Bacillus* spp., inibindo em até 98% o peso seco micelial de *A. alternata* (Tabela 2 e 4). Além do que ao projetar a confecção das formulações em grandes quantidades, o custo empregado com a utilização dos compostos nitrogenados tenderia a ser maior se comparado com o elemento traço, em função da quantidade de gramas dos aditivos por quilograma da formulação.

A temperatura de armazenamento é o principal fator abiótico envolvido na vida de prateleira da formulação e um importante gargalo para a consolidação das formulações biológicas no mercado. Considerando que muitas vezes a comercialização dos produtos biológicos seguem os mesmos trâmites de um produto químico, é importante que tais produtos se mantenham estáveis e eficazes nas mesmas condições de armazenamento (GOTOR-VILA et al., 2019).

Historicamente tem se recomendado o armazenamento de produtos biológicos a baixas temperaturas, de modo a manter os microrganismos com baixas atividades metabólicas. No entanto, no presente estudo observa-se que, independente do veículo de transporte, todas as formulações à base de *B. amyloliquefacies*-ACB-08 perderam sua

viabilidade quando foi armazenada a 4°C, o que não ocorreu com as formulações à base de *B. subtilis*-ACB-01, tendo o talco e caulim como veículos de transporte. Tal fato talvez possa ser atribuído à diferença fisiológicas dos microrganismos, somado ou não, aos aditivos e/ou adjuvantes presentes nas formulações. Sabuquillo et al (2010), ao desenvolverem uma formulação à base de *Penicillium oxalicum*, verificaram uma perda de viabilidade da mesma, em função da mistura entre peptona, glicerol e metilcelulose na composição do formulado.

Por outro lado, Gotor-Vila et al. (2017) observaram que formulações à base de *B. amyloliquefaciens* após 15 meses de armazenamento à temperaturas de 4 e 22°C, permaneceram estáveis quanto à viabilidade ( $4,3 \times 10^8$  UFC). No entanto, diferente do proposto no respectivo estudo, as formulações desenvolvidas pelos autores foram secas por pulverização em leito fluidizado e previamente preparadas com endósporos do antagonista, o que permite maior estabilidade sob condições adversas.

Os resultados encontrados neste estudo podem ser mais um atrativo para as formulações à base de ACB-01 e ACB-08, pois ao se dispensar condições refrigeradas de armazenamento, além de diminuição dos custos, viabilizaria o armazenamento dos produtos em condições mais acessíveis para o produtor (GOTOR-VILA et al., 2019; YÁNEZ-MENDIZÁBAL et al. 2012b). Alguns autores têm correlacionado ainda o talco e caulim com a estabilidade e aumento da viabilidade de microrganismos (LARENA; CAL; MELGAREJO, 2006; KINAY; YILDIZ, 2008; KLEIN et al. 2016; BORA et al., 2004).

O amido de milho tem sido amplamente utilizado na formulação de produtos biológicos como veículo de transporte, protetores e aporte nutritivo para o antagonista (HALLMAN et al., 2019). Este aporte nutritivo parece ter sido decisivo no aumento da viabilidade apenas para as formulações armazenadas a 22°C. No entanto, após seis meses de armazenamento independente da temperatura, todas as formulações utilizando o amido, como veículo de transporte, apresentaram contaminação, o que não aconteceu para o caulim e talco. Por ser um veículo de transporte orgânico e ter considerável teor de nutrientes, o amido de milho pode suportar além dos isolados bacterianos o crescimento de contaminantes (SAHARAN et al., 2010).

As formulações à base de *B. amyloliquefaciens* ACB-08, independente do veículo de transporte e de *B. subtilis* ACB-01 com amido, quando armazenadas a 4°C, perderam a sua viabilidade, enquanto que, os demais formulados permaneceram viáveis em até seis meses de armazenamento. Alguns autores relataram que para uma

formulação biológica ter eficiência agrônômica, é recomendado que sua viabilidade no momento da aplicação seja no mínimo de  $1 \times 10^6$  UFC/g e que no mínimo se mantenha viável por seis meses de armazenamento (KHAN et al., 2011; KINAY; YILDIZ, 2008).

Todas as formulações foram eficientes na inibição do diâmetro da colônia de *A. alternata*, observando ainda a distribuição das unidades formadoras de colônias em relação ao veículo de transporte, o caulim e talco apresentaram uma distribuição mais individual das colônias, enquanto que, o amido uma distribuição mais aglomerada (Figura 6), corroborando com a função de agregação atribuída ao amido, já descrito por Gotor-Vila et al. (2017) e por Hallman et al. (2019).

As formulações obtidas, além de inibirem a germinação, causaram deformações na estrutura morfológica dos conídios de *A. alternata* (Figura 8). Tais deformações são comumente observadas na literatura e justificadas em favor de alguns fatores como secreção de proteínas envolvidas na degradação da parede celular do patógeno, compostos voláteis ou antibióticos (PANE; ZACCARDELLI, 2015; BAYSAL et al. 2013). Pelos resultados obtidos neste trabalho, a produção de substâncias antifúngicas pela bactéria parece ter sido o fator responsável dessas deformações. Segundo Alvarez et al. (2011) ao estudarem uma linhagem de *B. amyloliquefaciens* para o controle de *Sclerotinia sclerotiorum* relataram que a inibição e deformação dos conídios do fungo forem decorrentes da produção de compostos antifúngicos como iturina, fengicina e surfactina pela bactéria.

O potencial de inibição da germinação dos conídios de *A. alternata* pelas formulações é fator decisivo para o sucesso do controle da mancha marrom de alternaria, uma vez que, a produção da toxina ACT responsável por toda sintomatologia da doença é liberada pelo patógeno durante a germinação dos conídios (CUENCA et al. 2016).

É de pleno conhecimento os diferentes papéis dos adjuvantes nas formulações como surfactantes, redutores da tensão superficial, aumento da molhabilidade, boa distribuição sobre o alvo, propriedades adesivas, nutricionais e protetores ao antagonista (ZHANG et al. 2003). Embora os adjuvantes não tenham apresentado deformações na morfologia dos conídios de *A. alternata*, eles inibiram a germinação do fungo, quando avaliados individualmente. Reafirmando, portanto, que possivelmente as deformações dos conídios foram em função dos compostos antifúngicos produzidos pelos isolados bacterianos (ACB-01 e ACB-08) (Figura 8).

Ao apresentar características indesejáveis, como segregação do caldo bacteriano e rigidez acentuada, as formulações à base de amido refutaram a proposta inicial de constituir formulações que não precisassem ser submetidas a processos complexos de secagem. Fato esse que pode ser corroborado com as considerações descritas na literatura, em que os autores relatam a utilização do amido, em função da sua capacidade de aglomeração em processo de leito fluidizado e spray dryer, viabilizando formulação em grãos ou pó molhável (GOTOR-VILA et al. 2019; GOTOR-VILA et al. 2017; LEE et al. 2006; MENG et al. 2015). Este agravante em suas características físicas é o suficiente para causar rejeição do produto no mercado (GOTOR-VILA et al., 2019).

Ao estudarem diferentes formulações à base de *Penicillium frequentans* para controle de *Monilinia laxa* em pêssego, Guijarro et al. (2007) utilizaram sílica gel e caulim como veículos de transporte e, observaram que, o caulim mostrou menos eficiência de controle comparado à sílica gel além de, apresentar resíduos no fruto, reduzindo seu valor comercial *in natura*.

No presente estudo observa-se que o ACB-01 tendo caulim como veículo de transporte proporcionou 75% de controle da mancha marrom de alternaria e 27,5% de incidência de folhas doentes (Tabela 13 e 15), além de apresentarem também resíduos sobre as folhas (Figura 9B). No entanto, nesse caso específicos esses resíduos poderiam contribuir na fisiologia da planta, uma vez que o caulim possui propriedades reflexivas que reduzem a temperatura da copa da planta, otimizando a fotossíntese. Mesmo tendo a folha superficialmente coberta com o caulim, o mesmo não interfere nas trocas gasosas, além de ser amplamente utilizado no controle de pragas, proporcionando um maior rendimento na cultura dos citros (LAPOINTE; MCKENZIE; HALL, 2006; D'AQUINO et al., 2011; RAMÍREZ-GODOY; PUENTES-PERÉZ; RESTREPO-DÍAZ, 2018; GLENN; PUTERKA, 2010).

A formulação à base de ACB-08, tendo o talco como veículo de transporte e aplicada de forma isolada, proporcionou 84% de controle da mancha marrom de alternaria, quando avaliada a severidade da doença. Apresentando assim, resultados mais promissores do que os dispostos na literatura com oxicloreto de cobre (75% de controle) (VAN ZYL; FOURIE; SCHUTTE, 2013). A aplicação do produto químico em plantas de tangerina 'Dancy' proporcionou 50,5% de controle (Tabela 16). Com relação aos resultados de incidência de doença, as plantas tratadas com a formulação à base de ACB-08 apresentaram apenas 14,7% de folhas doentes, enquanto que, os tratamentos

testemunha e químico (estrobilurina) apresentam 76 e 57% de folhas doentes, respectivamente (Tabela 15 e 16).

Dados similares de controle da podridão floral dos citros (*Colletotrichum acutatum*) foram obtidos por Klein et al. (2016). Os autores desenvolveram uma formulação à base de *B. subtilis*, utilizando o talco como veículo de transporte acrescido de ureia (0,02%), que proporcionou 93% de controle da doença em flores destacadas, sob condições de laboratório; 73% de flores sadias e 57% de número médio de frutos efetivos, em condições de campo. Dados positivos de controle foram encontrados por Yáñez-Mendizábal et al. (2012b) ao desenvolverem formulações (secas por pulverização) à base de *Bacillus* spp. no controle da *Monilinia fructicola* em nectarinas e pêssegos

Observa-se ainda que todas as formulações aplicadas isoladas ou, em mistura com a estrobilurina, apresentaram maiores níveis de controle, quando comparado com a aplicação isolada do produto químico (Tabela 13, 15 e 16). Tal resultado mostra a compatibilidade entre os produtos, o que pode facilitar o manejo da doença dentro do pomar (DUBEY; SINGH; TRIPATHI, 2018), e esta compatibilidade parece ser a chave do sucesso para aceitação do produto e uma importante ferramenta no processo de transição para uma agricultura sustentável (DUMONT; GASSELIN; BARET, 2020).

A compatibilidade entre agentes de controle biológicos e controle químico oferece, ainda, a opção de reduzir a dose do produto químico, como proposto no presente estudo, auxiliando na redução considerável de resíduos químicos no meio ambiente e na superfície da fruta (SHARMA; SINGH; SINGH, 2009).

Alguns casos de compatibilidade já foram descritos na literatura com formulações a base de *B. subtilis*, sendo eficiente em mistura de tanque com hidróxido de cobre para controle de *Alternaria solani* (ABBASI; WESELOWSKI, 2014) e no manejo integrado de pragas e doenças com neonicotinóide, estrobilurina e triazol (MYRESIOTIS; VRYZAS; PAPADOPOULOU-MOURKIDOU, 2015; GAVA; ALVES; DUARTE, 2019). Conferindo um maior aporte às formulações, uma vez que, os ingredientes ativos citados anteriormente fazem parte do manejo fitossanitário da citricultura brasileira (FUNDECITRUS, 2020).

Estes resultados mostram a importância da utilização dessas formulações para o controle da mancha marrom de alternaria, pois mesmo o produto químico indicado comercialmente para o controle da doença, teve uma ação de controle inferior às formulações avaliadas. Além disso, o grupo das estrobilurina (QoI) são suspeitos de

causarem risco à saúde humana (ÇAYDR; COSKUN; COSKUN, 2014), além de favorecer o surgimento de linhagens resistentes do fitopatógeno aos fungicidas deste grupo, em pomares de tangerinas do Estado de São Paulo (CHITOLINA et al., 2019), o que pode explicar os baixos níveis de controle da doença encontrados no presente estudo (Tabela 16).

Dessa forma as formulações biológicas propostas no presente estudo tornam-se promissoras, considerando a compatibilidade com a estrobilurina e por proporcionar níveis de controle maiores para MMA se comparado à aplicação do fungicida. Estes resultados reforçam a discussão da utilização do controle biológico no manejo fitossanitário do citros, uma vez que, essa ferramenta tem sido questionada devido o setor, ainda, optar por uma variedade de produtos químicos para o controle de pragas e doenças. Dessa maneira, a utilização de formulações à base de *Bacillus* spp. para o controle de doenças contribuirá para minimizar os riscos a saúde humana e ao meio ambiente.

## 7. CONCLUSÕES

Pelos resultados obtidos neste trabalho, conclui-se que:

- a) A maioria dos aditivos avaliados favoreceu o antagonismo dos isolados bacterianos, afetando o desenvolvimento micelial de *Alternaria alternata*;
- b) A combinação de um composto nitrogenado e de um elemento traço apresentou uma menor atividade antagônica de *Bacillus* spp., quando comparado com os aditivos utilizados individualmente;
- c) Todas as formulações à base de *Bacillus* spp., independente do veículo de transporte da bactéria, foram eficientes em inibir a germinação e o desenvolvimento da colônia de *A. alternata*,
- d) A maioria das formulações à base de *Bacillus* spp. se manteve viável até seis meses de armazenamento a 22 °C;
- e) Formulações à base de *B. amyloliquefaciens* ACB-08 não mantiveram a viabilidade, quando armazenadas durante seis meses a 4 °C;
- f) As melhores formulações para controle da mancha marrom de alternaria compreenderam: *B. subtilis* ACB-01 cultivado com  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (1mM) +

caulim e *B. amyloliquifaciens* ACB-08 cultivado com  $\text{CoCl}_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (0,2mM) + talco;

- g) As formulações testadas foram compatíveis com estrobilurina, quando aplicadas em mistura de calda.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBASI, P. A.; WESELOWSKI, B. Influence of foliar sprays of *Bacillus subtilis* QST 713 on development of early blight disease and yield of field tomatoes in Ontario. **Canadian Journal Of Plant Pathology**, [s.l.], v. 36, n. 2, p.170-178, 3 abr. 2014. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/07060661.2014.924027>.

AKIMITSU, K.; PEEVER, T. L.; TIMMER, L. W. Molecular, ecological and evolutionary approaches to understanding *Alternaria* diseases of citrus. **Molecular Plant Pathology**, [s.l.], v. 4, n. 6, p.435-446, nov. 2003. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1364-3703.2003.00189.x>

ALTIERI, M. A.; NICHOLLS, C. I. Soil fertility management and insect pests: harmonizing soil and plant health in agroecosystems. **Soil And Tillage Research**, [s.l.], v. 72, n. 2, p.203-211, ago. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0167-1987\(03\)00089-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0167-1987(03)00089-8).

ALVAREZ, F.; CASTRO, M.; PRÍNCIPE A.; BORIOLO, G.; FISCHER, S.; MORI, G.; JOFRE, E. The plant-associated *Bacillus amyloliquifaciens* strains MEP218 and ARP23 capable of producing the cyclic lipopeptides iturin or surfactin and fengycin are effective in biocontrol of sclerotinia stem rot disease. **Journal Of Applied Microbiology**, [s.l.], v. 112, n. 1, p.159-174, 22 nov. 2011. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05182.x>

AZEVEDO, F. A.; MARTELLI, I. B.; POLYDORO, D. A.; PACHECO, C. A.; SCHINOR, E. H.; BASTIANEL, M. Positive relationship between citrus leaf miner and alternaria brown spot. **Ciência Rural**, [s.l.], v. 45, n. 7, p.1160-1163, 22 maio 2015. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20141248>

BAKER, B. P.; GREEN, T. A.; LOKER, A. J. Biological control and integrated pest management in organic and conventional systems. **Biological Control**, [s.l.], v. 140, p.1-9, jan. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104095>.

BASSIMBA, D. D. M.; MIRA, J. L.; VICENT, A.. Inoculum Sources, Infection Periods, and Effects of Environmental Factors on *Alternaria* Brown Spot of Mandarin in Mediterranean Climate Conditions. **Plant Disease**, [s.l.], v. 98, n. 3, p.409-417, mar. 2014. Scientific Societies. <http://dx.doi.org/10.1094/pdis-09-13-0956-re>

BASTIANEL, M.; SIMONETTI, L. M.; Evandro Henrique SCHINOR, E. H.; GIORGI, R. O.; 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 alternaria. **Bragantia**, Campinas, v. 73, n. 1, p.23-31, 2014. <http://dx.doi.org/10.15090/brag.2014.004>

BAYSAL, Ö.; LAI, D.; XU, HH.; SIRAGUSA, M.; ÇALISHAN, M.; CARIMI, F.; SILVA, J. A. T.; TÖR, M. A Proteomic Approach Provides New Insights into the Control of Soil-Borne Plant Pathogens by Bacillus Species. **Plos One**, [s.l.], v. 8, n. 1, p.1-12, 3 jan. 2013. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0053182>

BOERAËVE, F.; DENDONCKER, N.; CORNÉLIS, J. T.; DEGRUNE, F.; DUFRÊNE, M. Contribution of agroecological farming systems to the delivery of ecosystem services. **Journal Of Environmental Management**, [s.l.], p.1-12, fev. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.109576>.

BORA, T. OZAKTAN, H.; GORE, E.; ASLAN, E. Biological Control of Fusarium oxysporum f. sp. melonis by Wettable Powder Formulations of the two Strains of Pseudomonas putida. **Journal Of Phytopathology**, [s.l.], v. 152, n. 8-9, p.471-475, set. 2004. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0434.2004.00877.x>.

BRASIL. MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/noticias/feffmercado-de-biodefensivos-cresce-em-mais-de-50-no-brasil>. Acesso em: 16 mar. 2020.

BRASIL Sistemas de Agrotóxicos Fitossanitários – AGROFIT. MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Disponível em: [http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons!/ap\\_praga\\_detalhe\\_cons?p\\_id\\_cultura\\_praga=4042](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons!/ap_praga_detalhe_cons?p_id_cultura_praga=4042). Acesso em: 29 jul. 2019.

CAMPOS, K. A. F.; AZEVEDO, F. A.; BASTIANEL, M.; CRISTOFANI-YALY, M. Resistance to alternaria brown spot of new citrus hybrids. **Revista Brasileira de Fruticultura**, [s.l.], v. 39, n. 5, p.604-613, 18 dez. 2017. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/0100-29452017613>

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**, [s.l.], v. 83, n. 5, p.429-433, maio 1999. Scientific Societies. <http://dx.doi.org/10.1094/pdis.1999.83.5.429>

ÇAYDR, A.; COSKUN, M.; COSKUN, M. Micronuclei, nucleoplasmic bridges, and nuclear buds induced in human lymphocytes by the fungicide signum and its active ingredients (boscalid and pyraclostrobin). **Environmental Toxicology**, [s.l.], v. 29, n. 7, p.723-732, 22 jun. 2012. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/tox.21789>

CHAVARRIA, D. N.; PÉREZ-BRANDAN, C.; SERRI, D. L.; MEIRELES, J. M.; RESTOVICH, S. B.; ANDRIULO, A. E.; JACQUELIN, L.; VARGAS-GIL, S. Response of soil microbial communities to agroecological versus conventional systems of extensive agriculture. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, [s.l.], v. 264, p.1-8, set. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.agee.2018.05.008>.

CHITOLINA, G. M.; SILVA-JUNIOR, G. J.; FEICHTENBERGER, E.; PEREIRA, R. G.; AMORIN, L. First Report on Quinone Outside Inhibitor Resistance of *Alternaria alternata* Causing Alternaria Brown Spot in Tangerines in São Paulo, Brazil. **Plant Health Progress**, [s.l.], v. 20, n. 2, p.94-94, jan. 2019. Scientific Societies. <http://dx.doi.org/10.1094/php-12-18-0079-br>

CHUN, B. H.; KIM, K. H.; JEONG, C. E.; JEON, C. O. Genomic and metabolic features of the *Bacillus amyloliquefaciens* group– *B. amyloliquefaciens*, *B. velezensis*, and *B. siamensis*– revealed by pan-genome analysis. **Food Microbiology**, [s.l.], v. 77, p.146-157, fev. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2018.09.001>

CHUNG, K. Reactive oxygen species in the citrus fungal pathogen *Alternaria alternata*: The roles of NADPH-dependent oxidase. **Physiological And Molecular Plant Pathology**, [s.l.], v. 88, p.10-17, out. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pmpp.2014.08.001>.

COLTURATO, A. B.; PAULOSSI, T.; VENÂNCIO, W. S.; FURTADO, E., L.. Eficiência e custo do controle químico da mancha de alternaria em tangor murcot. **Summa Phytopathologica**, [s.l.], v. 35, n. 3, p.210-215, set. 2009. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-54052009000300008>

CUENCA, J.; ALEZA, P.; GARCIA-LOR, A.; OLLITRAULT, P.; NAVARRO, L. Fine Mapping for Identification of Citrus Alternaria Brown Spot Candidate Resistance Genes and Development of New SNP Markers for Marker-Assisted Selection. **Frontiers In Plant Science**, [s.l.], v. 7, p.1-13, 23 dez. 2016. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2016.01948>

D'AQUINO, S.; COCCO, A.; ORTU, S.; SCHIRRA, M. Effects of kaolin-based particle film to control *Ceratitidis capitata* (Diptera: Tephritidae) infestations and postharvest decay in citrus and stone fruit. **Crop Protection**, [s.l.], v. 30, n. 8, p.1079-1086, ago. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2011.03.019>.

DÓRIA, M. S.; GUEDES, M. S.; SILVA, E. M. A.; OLIVEIRA, T. M.; PIROVANI, C. P., KUPPER, K. C., BASTIANEL, M., MICHELI, F. Comparative proteomics of two citrus varieties in response to infection by the fungus *Alternaria alternata*. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 136, p.410-423, set. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.06.069>.

DROBY, S.; WISNIEWSKI, M.; TEIXIDÓ, N.; SPADARO, D.; JIJAKLI, M. H. The science, development, and commercialization of postharvest biocontrol products. **Postharvest Biology And Technology**, [s.l.], v. 122, p.22-29, dez. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.postharvbio.2016.04.006>

DUBEY, S. C.; SINGH, B.; TRIPATHI, A. Integrated management of wet root rot, yellow mosaic, and leaf crinkle diseases of urdbean by seed treatment and foliar spray of insecticide, fungicide, and biocontrol agent. **Crop Protection**, [s.l.], v. 112, p.269-273, out. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2018.06.012>.

DUMONT, A. M.; GASSELIN, P; BARET, P. V. Transitions in agriculture: Three frameworks highlighting coexistence between a new agroecological configuration and

an old, organic and conventional configuration of vegetable production in Wallonia (Belgium). **Geoforum**, [s.l.], v. 108, p.98-109, jan. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.geoforum.2019.11.018>.

DUPRÉ, M.; MICHELS, T.; GAL, P. L. Diverse dynamics in agroecological transitions on fruit tree farms. **European Journal Of Agronomy**, [s.l.], v. 90, p.23-33, out. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.eja.2017.07.002>.

EL-BENDARY, M. A.; MOHARAM, M. E. Formulation of spore toxin complex of *Bacillus thuringiensis* and *Lysinibacillus sphaericus* grown under solid state fermentation. **Biological Control**, [s.l.], v. 131, p.54-61, abr. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.01.005>

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations FAOSTAT, Disponível em: [www.fao.org/economic/est/est-commodities/citrus-fruit/en/](http://www.fao.org/economic/est/est-commodities/citrus-fruit/en/)>. Acesso em: 29 set. 2019.

FERGUSON, B. G.; MORALES, H. Latin American Agroecologists Build a Powerful Scientific and Social Movement. **Journal Of Sustainable Agriculture**, [s.l.], v. 34, n. 4, p.339-341, 8 abr. 2010. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/10440041003680049>.

FIRA, D.; DIMKIC, I.; BERIC, T.; LOZO, J.; STANKOVIC, S. Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. **Journal Of Biotechnology**, [s.l.], v. 285, p.44-55, nov. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.07.044>

FUNDECITRUS – Fundo de Defesa da Citricultura. ProteCitrus – Produtos de Proteção da Citricultura. Disponível em: <https://www.fundecitrus.com.br/protectitrus>. Acesso em: 05 de fev. 2020.

GARGANESE, F.; SANZANI, S. M.; RELLA, D. D.; SCHENA, L.; IPPOLITO, A. Pre- and postharvest application of alternative means to control *Alternaria* Brown spot of citrus. **Crop Protection**, [s.l.], v. 121, p.73-79, jul. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2019.03.014>

GAUTAM, S.; CHAUHAN, A.; SHARMA, R.; SHIRKOT, C. K. Potential of *Bacillus amyloliquefaciens* for biocontrol of bacterial canker of tomato incited by *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*. **Microbial Pathogenesis**, [s.l.], v. 130, p.196-203, maio 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2019.03.006>

GAVA, C. A.; ALVES, Í. L. S.; DUARTE, N. C. Timing the application of *Bacillus subtilis* QST 713 in the integrated management of the postharvest decay of mango fruits. **Crop Protection**, [s.l.], v. 121, p.51-56, jul. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2019.03.013>.

GLENN, D. M.; PUTERKA, G. J. Particle Films: A New Technology for Agriculture. **Horticultural Reviews**, [s.l.], p.1-44, 28 jun. 2010. John Wiley & Sons, Inc. <http://dx.doi.org/10.1002/9780470650882.ch1>.

GOLDENBERG, L., YANIV, Y., PORAT, R., CARMI, N. Mandarin fruit quality: a review. **Journal Of The Science Of Food And Agriculture**, [s.l.], v. 98, n. 1, p.18-26, 19 jul. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.8495>.

GOTOR-VILA, A. TEIXIDÓ, N.; USALL, J.; DASHEVSKAYA, S.; TORRES, R. Development of a SCAR marker and a strain-specific genomic marker for the detection of the biocontrol agent strain CPA-8 *Bacillus amyloliquefaciens* (formerly *B. subtilis*). **Annals Of Applied Biology**, [s.l.], v. 169, n. 2, p.248-256, 27 abr. 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/aab.12298>.

GOTOR-VILA, A.; USALL, J.; TORRES, R.; SOLSONA, C.; TEIXIDÓ, N. Biocontrol products based on *Bacillus amyloliquefaciens* CPA-8 using fluid-bed spray-drying process to control postharvest brown rot in stone fruit. **Lwt - Food Science And Technology**, [s.l.], v. 82, p.274-282, set. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2017.04.034>

GOTOR-VILA, A.; USALL, J.; TORRES, R.; SOLSONA, C.; TEIXIDÓ, N. Enhanced shelf-life of the formulated biocontrol agent *Bacillus amyloliquefaciens* CPA-8 combining diverse packaging strategies and storage conditions. **International Journal Of Food Microbiology**, [s.l.], v. 290, p.205-213, fev. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.10.013>

GOWTHAM, H. G.; MURALI, M.; SINGH, S. B.; LAKSHMEESHA, T. R.; MURTHY, K. N.; AMRUTHESH, K. N.; NIRANJANA, S. R. Plant growth promoting rhizobacteria- *Bacillus amyloliquefaciens* improves plant growth and induces resistance in chilli against anthracnose disease. **Biological Control**, [s.l.], v. 126, p.209-217, nov. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.05.022>.

GRAMISCI, B. R.; LUTZ, M. C.; LOPES, C. A.; SANGORRIN, M. P. Enhancing the efficacy of yeast biocontrol agents against postharvest pathogens through nutrient profiling and the use of other additives. **Biological Control**, [s.l.], v. 121, p.151-158, jun. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.03.001>.

GUIJARRO, B.; MELGAREJO, P.; TORRES, R., LAMARCA, N.; USALL, J., DE-CAL.; A. Effects of different biological formulations of *Penicillium frequentans* on brown rot of peaches. **Biological Control**, [s.l.], v. 42, n. 1, p.86-96, jul. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2007.03.014>

HALLMANN, J.; GUTBERLET, V.; JAKOBS-SCHONWANDT, D.; VORLOP, K. D.; MULLER, J.; PATEL, A. V. Effect of additives on the efficacy of microencapsulated *Hirsutella rhossiliensis* controlling *Heterodera schachtii* on sugar beets. **Biological Control**, [s.l.], v. 128, p.40-47, jan. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.09.005>.

HERMIDA-MONTERO, L. A.; PARIONA, N.; MTZ-ENRIQUEZ, A. I.; CARRIÓN, G.; PARAGUAI-DELGADO, F.; ROSAS-SAITO, G. Aqueous-phase synthesis of nanoparticles of copper/copper oxides and their antifungal effect against *Fusarium oxysporum*. **Journal Of Hazardous Materials**, [s.l.], v. 380, p.1-9, dez. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.120850>

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Produção agrícola municipal. Rio de Janeiro, 2018. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/pam/tabelas>> Acesso em: 02 out. 2019.

JAYARAJ, J.; RADHAKRISHNAN, N.; V., KANNAN, R.; SAKTHIEL, K.; SUGANYA, D.; VENKATESAN, S.; VELAZHAHAN, R. Development of new formulations of *Bacillus subtilis* for management of tomato damping-off caused by *Pythium aphanidermatum*. **Biocontrol Science And Technology**, [s.l.], v. 15, n. 1, p.55-65, fev. 2005. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/09583150400015920>

JORGE, D. M.; SOUZA, C. A. V. O papel da regulamentação dos produtos de origem biológica no avanço da agroecologia e da produção orgânica no Brasil. In: SAMBUICHI, R. H. R. et al. (Org.). **A política nacional de agroecologia e produção orgânica no Brasil: uma trajetória de luta pelo desenvolvimento rural sustentável**. Brasília: Ipea, 2017. p. 463.

KHAN, M. R.; MAJID, S.; MOHIDIN, F. A.; KHAN, N. A new bioprocess to produce low cost powder formulations of biocontrol bacteria and fungi to control fusarial wilt and root-knot nematode of pulses. **Biological Control**, [s.l.], v. 59, n. 2, p.130-140, nov. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2011.04.007>.

KINAY, P.; YILDIZ, M. The shelf life and effectiveness of granular formulations of *Metschnikowia pulcherrima* and *Pichia guilliermondii* yeast isolates that control postharvest decay of citrus fruit. **Biological Control**, [s.l.], v. 45, n. 3, p.433-440, jun. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.03.001>.

KLEIN, M. N.; SILVA, A. C.; KUPPER, K. C. *Bacillus subtilis* based-formulation for the control of postbloom fruit drop of citrus. **World Journal Of Microbiology And Biotechnology**, [s.l.], v. 32, n. 12, p.2-11, 1 nov. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-016-2157-6>

KUPPER, K. C.; CORRÊA, F. E.; AZEVEDO, F. A.; SILVA, A. C. *Bacillus subtilis* to biological control of postbloom fruit drop caused by *Colletotrichum acutatum* under field conditions. *Scientia Horticulturae*. 134, p.139-143. 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2011.11.019>.

KUPPER, K., C.; GIMENES-FERNANDES, N.; GOES, A. Controle biológico de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. **Fitopatologia Brasileira**. 28, 251-257. 2009. <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-41582003000300005>.

LAPOINTE, S. L.; MCKENZIE, C. L.; HALL, D. G. Oviposition by *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae) and growth enhancement of citrus by Surround particle film. **Journal of Economic Entomology**, [s.l.], v. 99, n.1, p.109-116. [http://dx.doi.org/10.1603/0022-0493\(2006\)099\[0109:ROBDAC\]2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.1603/0022-0493(2006)099[0109:ROBDAC]2.0.CO;2)

LARENA, I.; CAL, A. de; MELGAREJO, P.. Effects of stabilizers on shelf-life of *Epicoccum nigrum* formulations and their relationship with biocontrol of postharvest

brown rot by *Monilinia* of peaches. **Journal Of Applied Microbiology**, [s.l.], v. 102, n. 2, p.570-582, fev. 2007. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03075.x>.

LEE, P. J.; LEE, S-W.; KIM, C. S.; FILHO, J. H.; CANÇÃO, J. H.; LEE, K. Y.; KIM, H. J.; JUNG, B. J.; MOON, B. J. Evaluation of formulations of *Bacillus licheniformis* for the biological control of tomato gray mold caused by *Botrytis cinerea*. **Biological Control**, [s.l.], v. 37, n. 3, p.329-337, jun. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2006.01.001>

LLORENS, E.; FERNÁNDEZ-CRESPO, E.; VICEDO, B.; LAPEÑA, L.; GARCÍA-AGUSTÍN. Enhancement of the citrus immune system provides effective resistance against *Alternaria* brown spot disease. **Journal Of Plant Physiology**, [s.l.], v. 170, n. 2, p.146-154, jan. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2012.09.018>.

LOCATELLI, G. O.; SANTOS, G. F.; BOTELHO, P. S.; FINKLER, C. L. L.; BUENO, L. A. Development of *Trichoderma* sp. formulations in encapsulated granules (CG) and evaluation of conidia shelf-life. **Biological Control**, [s.l.], v. 117, p.21-29, fev. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.08.020>.

LOPES, C. V. A.; ALBUQUERQUE, G. S. C. Agrotóxicos e seus impactos na saúde humana e ambiental: uma revisão sistemática. **Saúde em Debate**. 42, 518-534. 2018. <http://dx.doi.org/10.1590/0103-1104201811714>.

MASMOUDI, F.; KHEDHER, S. B.; KAMOUN, A.; ZOUARI, N.; TOUNSI, S.; TRIGUI, M. Combinatorial effect of mutagenesis and medium component optimization on *Bacillus amyloliquefaciens* antifungal activity and efficacy in eradicating *Botrytis cinerea*. **Microbiological Research**, [s.l.], v. 197, p.29-38, abr. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2017.01.001>

MATTOS, D.; HIPPLER, F. W. R; BOARETTO, R. M; STUCHI, E. S.; AQUAGGIO, J. Soil boron fertilization: The role of nutrient sources and rootstocks in citrus production. **Journal Of Integrative Agriculture**, [s.l.], v. 16, n. 7, p.1609-1616, jul. 2017. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s2095-3119\(16\)61492-2](http://dx.doi.org/10.1016/s2095-3119(16)61492-2).

MEENA, M; SAMAL, S. *Alternaria* host-specific (HSTs) toxins: An overview of chemical characterization, target sites, regulation and their toxic effects. **Toxicology Reports**, [s.l.], v. 6, p.745-758, 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxrep.2019.06.021>.

MENG, X.; YU, M. J.; YU, M.; YIN, X.; LIU, Y. Dry flowable formulations of antagonistic *Bacillus subtilis* strain T429 by spray drying to control rice blast disease. **Biological Control**, [s.l.], v. 85, p.46-51, jun. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.03.004>.

MICHIELIN, T. H. V.; CRISTOFANI-YALY, M.; CAMPOS, K. A. F.; SCHINOR, E. H.; AZEVEDO, F. A.; BASTIANEL, M. Reação de híbridos de citros à inoculação com *Alternaria alternata*. **Summa Phytopathologica**, [s.l.], v. 42, n. 4, p.313-320, dez. 2016. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/0100-5405/2191>.

MYRESIOTIS, C. K.; VRYZAS, Z.; PAPADOPOULOU-MOURKIDOU, E. Effect of specific plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) on growth and uptake of neonicotinoid insecticide thiamethoxam in corn (*Zea mays*L.) seedlings. **Pest Management Science**, [s.l.], v. 71, n. 9, p.1258-1266, 28 out. 2014. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ps.3919>.

NEVES, C. G.; AMARAL, D. O. J.; PAULA, M. F. B.; NASCIMENTO, L. S.; CONSTANTINO, G.; PASSOS, O. S.; SANTOS, M. A.; OLLITRAULT, P.; GESTEIRA, A. S.; LURO, F.; MICHELI, F. Characterization of tropical mandarin collection: Implications for breeding related to fruit quality. **Scientia Horticulturae**, [s.l.], v. 239, p.289-299, set. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2018.05.022>.

ONGENA, M.; JACQUES, P. *Bacillus lipopeptides*: versatile weapons for plant disease biocontrol. **Trends In Microbiology**, [s.l.], v. 16, n. 3, p.115-125, mar. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2007.12.009>

PACHECO, C. A.; MARTELLI, I. B.; POLYDORO, D. A.; SCHINOR, E. H.; PIO, R. M.; KUPPER, K. C., AZEVEDO, F. A. Resistance and susceptibility of mandarins and their hybrids to *Alternaria alternata*. **Scientia Agricola**, [s.l.], v. 69, n. 6, p.386-392, dez. 2012. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-90162012000600007>

PANE, C.; ZACCARDELLI, M. Evaluation of *Bacillus* strains isolated from *solanaceous phylloplane* for biocontrol of *Alternaria* early blight of tomato. **Biological Control**, [s.l.], v. 84, p.11-18, maio 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.01.005>.

PEGG, K. G. (1966). Studies of a strain of *Alternaria citri* Pierce, the causal organism of brown spot of Emperor mandarin. *Queensl. J. Agric. Anim. Sci.* 23, 15–28.

PERES, N. A. R.; AGOSTINI, J. P.; TIMMER, L. W.. Outbreaks of *Alternaria* Brown Spot of Citrus in Brazil and Argentina. **Plant Disease**, [s.l.], v. 87, n. 6, p.750-750, jun. 2003. Scientific Societies. <http://dx.doi.org/10.1094/pdis.2003.87.6.750c>.

PERES, N. A.; TIMMER, L. W. Evaluation of the Alter-Rater model for spray timing for control of *Alternaria* brown spot on Murcott tangor in Brazil. **Crop Protection**, [s.l.], v. 25, n. 5, p.454-460, maio 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2005.07.010>.

PERINA, F. J.; BELAN, L. L.; MOREIRA, S. I.; NERY, E. M.; ALVES E. POZZA, E. A. Diagrammatic scale for assessment of *alternaria* brown spot severity on tangerine leaves. **Journal Of Plant Pathology**, [s.l.], p.1-10, 13 maio 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s42161-019-00306-6>.

RAMÍREZ-GODOY, A.; PUENTES-PERÉZ, G.; RESTREPO-DÍAZ, H. Evaluation of the effect of foliar application of kaolin clay and calcium carbonate on populations of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) in Tahiti lime. **Crop Protection**, [s.l.], v. 109, p.62-71, jul. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2018.01.012>.

REIS, R. F.; ALMEIDA, T. F.; STUCHI, E. S.; GOES, A. Susceptibility of citrus species to *Alternaria alternata*, the causal agent of the Alternaria brown spot. **Scientia Horticulturae**, [s.l.], v. 113, n. 4, p.336-342, ago. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2007.04.005>.

RIVERA-SALINAS, I. S.; HAJIAN-FOROOSHANI, Z.; JIMÉNEZ-SOTO, E.; CRUZ-RODRÍGUEZ, J. A.; PHILPOTT, S. M. High intermediary mutualist density provides consistent biological control in a tripartite mutualism. **Biological Control**, [s.l.], v. 118, p.26-31, mar. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.12.002>.

SABUQUILLO, P.; CAL, A.; MELGAREJO, P. Development of a dried *Penicillium oxalicum* conidial formulation for use as a biological agent against Fusarium wilt of tomato: Selection of optimal additives and storage conditions for maintaining conidial viability. **Biological Control**, [s.l.], v. 54, n. 3, p.221-229, set. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2010.05.010>.

SANTOS, C. H.; DUARTE FILHO, J.; MODESTO, J. C.; GRASSI FILHO, H.; FERREIRA, G. Adubos foliares quelatizados e sais na absorção de boro, manganês e zinco em laranja 'Pera'. **Scientia Agricola**, [s.l.], v. 56, n. 4, p.999-1004, out. 1999. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-90161999000400031>.

SAHARAN, K.; SARMA, M. VRK.; SRIVASTAVA, R.; SHARMA, A. K.; JOHRI, B. N.; PRAKASH, A.; SAHAI, V.; BISARIA, V. S. Development of non-sterile inorganic carrier-based formulations of *fluorescent Pseudomonad* R62 and R81 and evaluation of their efficacy on agricultural crops. **Applied Soil Ecology**, [s.l.], v. 46, n. 2, p.251-258, out. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2010.08.004>.

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

SHARMA, R. R.; SINGH, D.; SINGH, R. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. **Biological Control**, [s.l.], v. 50, n. 3, p.205-221, set. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2009.05.001>.

SOUZA, M. C.; STUCHI, E. S.; GOES, A. Evaluation of tangerine hybrid resistance to *Alternaria alternata*. **Scientia Horticulturae**, [s.l.], v. 123, n. 1, p.1-4, dez. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2009.07.005>

SOUZA, A.; do Carmo. **Controle Biológico de *Alternaria alternata*, agente causal da mancha marrom de alternaria, por *Bacillus* spp.** 2018. 79 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Agroecologia e Desenvolvimento Rural, Universidade Federal de São Carlos, Araras, 2018. Disponível em: [https://repositorio.ufscar.br/bitstream/handle/ufscar/10473/SOUZA\\_Ariane\\_2018.pdf?sequence=4&isAllowed=y](https://repositorio.ufscar.br/bitstream/handle/ufscar/10473/SOUZA_Ariane_2018.pdf?sequence=4&isAllowed=y). Acesso em: 14 mar. 2020.

TIMMER, L. W.; PEEVER, T.; SOLEL, Z, A. K. *Alternaria* diseases of citrus - Novel pathosystems. *Phytopathologia Mediterranea*. 42, 99-112. 2003. <http://dx.doi.org/10.14601/Phytopathol.Mediterr-1710>

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T. D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal Of Biochemistry & Cell Biology**, [s.l.], v. 39, n. 1, p.44-84, jan. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>.

VAN ZYL, J. G.; FOURIE, P. H.; SCHUTTE, G. C. Spray deposition assessment and benchmarks for control of *Alternaria* brown spot on mandarin leaves with copper oxychloride. **Crop Protection**, [s.l.], v. 46, p.80-87, abr. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2012.12.005>.

WANG, N.; YANG, S. L.; LIN, C. H.; CHUNG, K. R. Gene inactivation in the citrus pathogenic fungus *Alternaria alternata* defect at the Ku70 locus associated with non-homologous end joining. **World Journal Of Microbiology And Biotechnology**, [s.l.], v. 27, n. 8, p.1817-1826, 28 dez. 2010. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-010-0640-z>.

WIYONO, S.; SCHULZ, D. F.; WOLF, G. A. Improvement of the formulation and antagonistic activity of *Pseudomonas fluorescens* B5 through selective additives in the pelleting process. **Biological Control**, [s.l.], v. 46, n. 3, p.348-357, set. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.04.020>.

YÁNEZ-MENDIZÁBAL, V., VIÑAS, I., USALL, J., TORRES, R., SOLSONA, C., TEIXIDÓ, N. Production of the postharvest biocontrol agent *Bacillus subtilis* CPA-8 using low cost commercial products and by-products. **Biological Control**, [s.l.], v. 60, n. 3, p.280-289, mar. 2012a. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2011.12.001>.

YÁNEZ-MENDIZÁBAL, V., VIÑAS, I., USALL, J., TORRES, R., SOLSONA, C., ABADIAS, M.; TEIXIDÓ, N. Formulation development of the biocontrol agent *Bacillus subtilis* strain CPA-8 by spray-drying. **Journal Of Applied Microbiology**, [s.l.], v. 112, n. 5, p.954-965, 6 mar. 2012b. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05258.x>.

ZHANG, W.; LOBO, T. M.; BAILEY, K.; MORTENSEN, K.; BOYETCHKO, S. M. Screening of adjuvants for bioherbicide formulations with *Colletotrichum* spp. and *Phoma* spp. **Biological Control**, [s.l.], v. 26, n. 2, p.95-108, fev. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1049-9644\(02\)00133-0](http://dx.doi.org/10.1016/s1049-9644(02)00133-0).