



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

VIABILIDADE PRÁTICA DE *BACILLUS SUBTILIS* PARA
CONTROLE BIOLÓGICO DE *COLLETOTRICHUM ACUTATUM*,
AGENTE CAUSAL DA QUEDA PREMATURA DOS FRUTOS
CÍTRICOS

FRANCISCO EDUARDO CORRÊA

Araras/SP

(2010)



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

VIABILIDADE PRÁTICA DE *BACILLUS SUBTILIS* PARA
CONTROLE BIOLÓGICO DE *COLLETOTRICHUM ACUTATUM*,
AGENTE CAUSAL DA QUEDA PREMATURA DOS FRUTOS
CÍTRICOS

FRANCISCO EDUARDO CORRÊA

ORIENTADORA: PROF. Dra. Kátia Cristina Kupper

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

Araras/SP

(2010)

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

C824vp

Corrêa, Francisco Eduardo.

Viabilidade prática de *Bacillus subtilis* para controle biológico de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos / Francisco Eduardo Corrêa. -- São Carlos : UFSCar, 2010.
56 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2010.

1. Agroecologia. 2. Cítricos. 3. Podridão floral dos citros. 4. *Citrus sinensis*. 5. Agentes no controle biológico de pragas. I. Título.

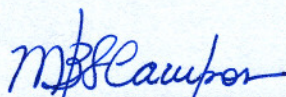
CDD: 630 (20^a)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
DE

Francisco Eduardo Corrêa

APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
AGROECOLOGIA E DESENVOLVIMENTO RURAL, DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DE SÃO CARLOS, EM **10 DE MAIO DE 2010.**

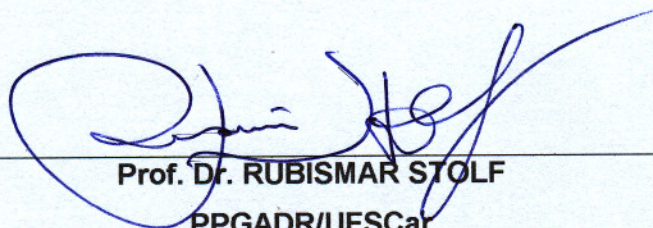
BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dra. MARIA BERNADETE SILVA DE CAMPOS

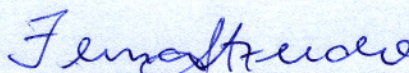
CO-ORIENTADORA

DBV/UFSCar



Prof. Dr. RUBISMAR STOLF

PPGADR/UFSCar



Prof. Dr. FERNANDO ALVES DE AZEVEDO

CAPTAC-SM/IAC

“A palavra tem que se parecer com a palavra. Atingí-la é o meu primeiro dever para comigo. E a palavra não pode ser enfeitada e artisticamente vã, tem que ser apenas ela. Bem, é verdade que também queria alcançar uma sensação fina e que esse finíssimo não se quebrasse em linha perpétua. Ao grosso e baixo, grave e terra, tão a troco de nada que por nervosismo de escrever eu tivesse um acesso incontrollável de riso vindo do peito. E quero aceitar minha liberdade sem pensar o que muitos acham: que existir é coisa de doido, caso de loucura. Porque parece. Existir não é lógico.

A ação desta história terá como resultado minha transformação em outrem e minha materialização enfim em objeto. Sim, e talvez alcance a flauta doce em que eu me enovelarei em macio cipó.”

Clarice Lispector

“Há muitas verdades, poucas resistem à luz do sol”

Chiquinho Corrêa

SUMÁRIO

Índice de tabelas.....	i
Índice de figuras.....	ii
Resumo.....	iii
Abstract.....	v
1 Introdução	14
2. Revisão da Literatura.....	16
2.1 Ocorrência e Importância da Doença.....	16
2.2 Sintomas	17
2.3 Agente Causal	18
2.4 Epidemiologia	20
2.5 Controle Químico	22
2.6 Controle Biológico	23
2.7 Citricultura Sustentável	26
3. Material e métodos.....	30
3.1 Efeito da concentração de <i>Bacillus subtilis</i> no controle de <i>Colletotrichum acutatum</i> , sob condições de campo (safra 2007/2008).....	30
3.2 Efeito de uma adição de uma fonte de carbono na pulverização de <i>Bacillus subtilis</i> para controle de <i>C. acutatum</i> (safra 2007/2008).....	32
3.3 Ponto de aplicação do produto biológico para controle de <i>Colletotrichum acutatum</i> safra (2007/2008).....	32

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	34
4.1 Efeito da concentração de <i>Bacillus subtilis</i> no controle de <i>C. acutatum</i> , sob condições de campo (safra 2007/2008)	34
4.2 Efeito da adição de uma fonte de carbono na pulverização de <i>Bacillus subtilis</i> para controle de <i>C. acutatum</i> (safra 2008/2009)	37
4.3 Ponto de aplicação do produto biológico para controle de <i>Colletotrichum acutatum</i> (safra 2008/2009)	39
5. CONCLUSÕES	46
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47

ÍNDICE DE TABELAS

	Pág
Tabela 1. Efeito dos agentes de controle biológico na porcentagem de flores com sintomas de infecção por <i>Colletotrichum acutatum</i> e no número médio de frutos efetivos (NMFE), em plantas de laranja ‘Valencia’, em condições de campo, no município de Botucatu, SP, na safra 2007/2008.....	35
Tabela 2. Efeito da adição de uma fonte de carbono durante a pulverização com <i>Bacillus subtilis</i> na porcentagem de flores com sintomas de infecção por <i>Colletotrichum acutatum</i> e no número médio de frutos efetivos (NMFE), em plantas de laranja ‘Valência’, no município de Botucatu, SP, Brasil (safra 2008/2009).....	38
Tabela 3. Efeito da época de aplicação de <i>Bacillus subtilis</i> na porcentagem de flores com sintomas de infecção por <i>Colletotrichum acutatum</i> e no número médio de frutos efetivos(NMFE), plantas de laranja ‘Valência’, no município de Botucatu, SP, na safra 2008/2009.....	40

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 01: Lesões em botões, pétalas e estrelinhas	17
Figura 02: Efeito da aplicação de <i>Bacillus subtilis</i> na porcentagem de flores com sintomas de infecção por <i>Colletotrichum acutatum</i> . A: testemunha B: Fungicida Padrão.....	44
Figura 03: Efeito da época de aplicação de <i>Bacillus subtilis</i> na porcentagem de flores com sintomas de infecção por <i>Colletotrichum acutatum</i> C: Cabeça de Alfinete D: Cabeça de fósforo.....	44
Figura 04: Efeito da época de aplicação de <i>Bacillus subtilis</i> na porcentagem de flores com sintomas de infecção por <i>C. acutatum</i> . E: Cabeça de Alfinete + Cabeça de Fósforo F: Cotonete.....	45
Figura 05: Efeito da época de aplicação de <i>Bacillus subtilis</i> na porcentagem de flores com sintomas de infecção por <i>C. acutatum</i> . G: Flor Aberta H: Todos os estágios.....	45

**VIABILIDADE PRÁTICA DE *BACILLUS SUBTILIS* PARA
CONTROLE BIOLÓGICO DE *COLLETOTRICHUM ACUTATUM*,
AGENTE CAUSAL DA QUEDA PREMATURA DOS FRUTOS
CÍTRICOS**

Autor: FRANCISCO EDUARDO CORRÊA

Orientadora: Dra. KATIA CRISTINA KUPPER

RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo estudar a viabilidade prática de *Bacillus subtilis* no controle de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da Queda Prematura dos Frutos Cítricos (QPFC), sob condições de campo. Primeiramente, a bactéria foi testada em duas concentrações diferentes, a 5 e 10%, em experimento realizado em plantas de laranja Valencia enxertada sobre limoeiro Cravo (11 anos de plantio), em propriedade particular localizada no município de Botucatu, São Paulo, Brasil, durante a safra de 2007/2008. Os mesmos tratamentos foram repetidos na safra subsequente, porém, acrescidos ou não de uma fonte de carbono (melaço a 5%), em plantas de laranjeira Valência enxertada sobre limão Cravo (15 anos de idade). Estudo adicional foi também realizado, nas mesmas condições, visando determinar o melhor estágio de desenvolvimento da flor para aplicação do agente de biocontrole, e, assim otimizar o controle da doença. As aplicações dos produtos foram realizados com uso de turboatomizador tratorizado, com o intuito

adicional de avaliar a sua praticidade. Verificou-se que a aplicação de *B. subtilis* a 5% semanalmente, a quantidade de flores com sintomas foi reduzida em 47%, enquanto o tratamento químico apresentou uma eficiência de apenas 18%, quando em comparação com a testemunha. Por outro lado, *B. subtilis* (a 10%) aplicado semanalmente ou, com uma semana antes da aplicação dos demais tratamentos biológicos, proporcionou maior número médio de frutos efetivos (NMFE). O acréscimo de uma fonte de carbono, no momento da aplicação, pode favorecer o antagonista da bactéria, no entanto, a adição é facultativa, principalmente, quando se avalia o NMFE. O melhor momento de aplicação do isolado ACB-69 para controle da PFC foi na fase de flor aberta, quando se avaliou a porcentagem de flores com sintomas, porém, quando a bactéria é aplicada em todos os estádios de florescimento, obtém-se uma maior quantidade de frutos efetivos na planta. A utilização do turboatomizador foi considerada eficiente para aplicação do antagonista, permitindo uma melhor distribuição do inoculo pela planta, não acarretando danificações nas células bacterianas, podendo, portanto, ser uma indicação para aplicações futuras do microrganismo para controle de doenças.

VIABILITY OF *BACILLUS SUBTILIS* TO BIOLOGICAL CONTROL OF *COLLETOTRICHUM ACUTATUM*, CAUSAL AGENT OF POSTBLOOM FRUIT DROP

Author: FRANCISCO EDUARDO CORRÊA

Adviser: Dra. KATIA CRISTINA KUPPER

ABSTRACT

The objective of the present research was to study the practical viability of *Bacillus subtilis* (ACB-69) to control *Colletotrichum acutatum*, the casual agent of postbloom fruit drop (PFD) under field conditions. First, the bacteria was tested in two different concentrations, one at 5% and the other at 10 %, in the experiment conducted on Pera Sweet orange plants grafted on cravo lemon trees (11 years of planting), in a private property located in Botucatu, São Paulo State, Brazil during the 2007/2008 season. The same treatments were repeated in the following season, however, with or without adding a carbon source (molasses at 5%), on Valencia orange plants grafted on Rangpur lime trees (15 years old). Additional studies were also carried out under the same conditions, aiming to determine the most appropriate growth stages of flowers to apply the biocontrol agent, for the best disease control. For all experiments, the biological products were applied with an air assisted sprayer with the additional intent of evaluating its practicality. It was verified that

the weekly application of *B. subtilis* at 5% reduced the quantity of symptomatic flowers by 47%, while the chemical treatment only showed an 18% efficiency when compared to the control. On the other hand, weekly applications of *B. subtilis* (at 10%) or with one week before the application of the other biological treatments caused a greater average number of effective fruits (ANEF). The addition of a carbon source at the moment of application may favor the antagonism of the bacteria; however, the addition is optional, particularly when its ANEF is evaluated. The best moment to apply the ACB-69 isolate to control PFD was in the open flower stage, when the percentage of symptomatic flowers was evaluated, however, when the bacteria is applied during all flowering stages there is a greater quantity of effective fruits per plant. The use of the air assisted sprayer was considered efficient for the antagonistic application, allowing a better distribution of the inoculum on the plant without damaging the bacterial cells, hence, enabling it to be an indication for future microorganism applications to control diseases.

1.INTRODUÇÃO

O Brasil se destaca como um dos maiores produtores de citros do mundo, tanto em termos de área de cultivo, produção e quantidade de frutas processadas. Cerca de 85% da produção de laranja é destinada à industrialização, cujo suco produzido é exportado para vários países, incluindo-se principalmente Bélgica, Estados Unidos, Japão, Suíça e China (AGRIANUAL, 2009).

Entretanto, apesar de toda importância dessa cultura, o setor citrícola enfrenta sérios problemas fitossanitários e, dentre as doenças mais importantes encontra-se a queda prematura dos frutos cítricos (QPFC), causada por *Colletotrichum acutatum* Simmonds.

No Brasil, a doença foi relatada inicialmente no Rio Grande do Sul (DORNELLES, 1977) e, atualmente, está presente em todos os municípios de São Paulo, além de outros Estados, como Rio de Janeiro, Paraná, Bahia, Minas Gerais, Goiás e Amazonas, causando perdas na produção superior a 80% (GOES & KUPPER, 2002).

A medida predominante de controle é a pulverização com defensivos fungicos (benzimidazóis) na época da florada. No entanto, os custos financeiros e ambientais de tais tratamentos, aliado às crescentes restrições à presença de resíduos, estão a exigir o estudo de novas alternativas.

No intuito de minimizar os impactos do uso indiscriminado de defensivos, buscamos através desta pesquisa, um controle mais sustentável para *C. acutatum*, utilizando o controle biológico como uma ferramenta alternativa, visando uma citricultura sustentável, que além da sua coerência ecológica, tal alternativa, em muitos casos, apresenta um apelo econômico e de sustentabilidade apreciáveis.

Dentre os agentes antagonistas mais estudados visando o controle de fitopatógenos incluem-se a bactéria *Bacillus subtilis*, a

que vem se destacando no controle de doenças do filoplano, e também em pós-colheita (PUSEY et al., 1986; FERREIRA et al., 1991; BETTIOL et al., 1994; SONODA & GUO, 1996; KALITA et al., 1996; KUPPER & GIMENES-FERNANDES, 2002; KUPPER et al., 2003; KUPPER et al., 2004 e 2005).

No Brasil, KUPPER & GIMENES-FERNANDES (2002) estudaram a potencialidade antagonística de 64 isolados de *B. subtilis* a *C. acutatum*, *in vitro* e em flores destacadas de lima ácida 'Tahiti'. Segundo os autores, *in vitro* todos os isolados produziram metabólitos capazes de inibir o crescimento micelial do fitopatógeno, assim como, em alguns casos houve 100% de controle da doença em flores destacadas.

De acordo com KUPPER et al. (2003), dentre sete isolados de *B. subtilis* testados para o controle da QPFC, em condições naturais de ocorrência da doença, um deles, o ACB-69, diferiu da testemunha (sem controle) e equiparou-se, estatisticamente, ao fungicida benomyl, proporcionando menor porcentagem de flores com sintomas e maior retenção de frutos.

Diante do exposto, este trabalho teve por objetivos: (i) testar a viabilidade de *B. subtilis* (ACB-69), sob condições de campo em duas concentrações diferentes; (ii) testar o efeito do acréscimo de uma fonte de carbono durante a aplicação do agente de biocontrole; (iii) verificar a viabilidade da bactéria em ser aplicada por turboatomizador e, em escala comercial, e, finalmente, (iv) determinar o melhor estágio de desenvolvimento da flor de citros para ser aplicado o agente de biocontrole.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 - Ocorrência e importância da Queda Prematura dos Frutos Cítricos

A doença “Queda Prematura dos Frutos Cítricos” (QPFC) vem causando sérias perdas em países da América Central e, nos últimos anos, tornou-se o principal problema fitossanitário nos pomares.

A QPFC foi descrita inicialmente em 1979, em Belize, na América Central. (FAGAN, 1979), infectando principalmente laranjeiras “Valencia”. No mesmo ano, DENHAM (1979) relatou-a no Panamá. Em meados de 1980, OROZCO SANTOS & GONZÁLES GARZA (1986) descreveram a doença no México, infectando principalmente laranjeiras “Valencia”.

No Brasil, os primeiros relatos de ocorrência da doença foram no Rio Grande do Sul (DORNELLES, 1977) e, atualmente, a enfermidade ocorre em praticamente todos os municípios de São Paulo, além de outros estados, como Rio de Janeiro, Paraná, Bahia, Minas Gerais, Goiás e Amazonas (MORETTO, 2000).

Segundo PRATES et al. (1993), foi a partir de 1990 e nos anos de 1991 e 1992 que a enfermidade começou a causar graves prejuízos no estado de São Paulo, ocasionando perdas de até 70% na produção, sob condições favoráveis (intensas chuvas).

No estado de São Paulo, ocorreram perdas significativas na safra de 1977/78, principalmente na região de Limeira, Araraquara, Taquaritinga e Cândido Rodrigues (FEITCHENBERGER, 1991). Na safra de 1990/91, verificou-se perdas significativas de produção nos pomares localizados nas regiões de Limeira, Campinas, Mogi Guaçu, Araras e Pirassununga; as safras subsequentes até 1993/94, a enfermidade afetou severamente as principais regiões produtoras paulistas, causando perdas de até 80% (FEITCHENBERGER, 1994; PRATES et al., 1993; GOES & KUPPER, 2002).

Em condições extremamente favoráveis ao fungo, as perdas de produção podem chegar a até 100%, nos pomares mais seriamente afetados (TIMMER, 1993).

(TIMMER, 1993).

2.2 - Sintomas



Em flores infectadas, os primeiros sintomas aparecem nas pétalas, sob a forma de lesões encharcadas de coloração alaranjada; as pétalas afetadas adquirem uma consistência rígida e ficam firmemente aderidas ao disco basal (figura B). Quando as condições são favoráveis os sintomas podem aparecer antes mesmo que a flor se abra, podendo as lesões ocorrer em botões florais fechados (figura A) (TIMMER et al., 1994). Após o florescimento, os frutos recém formados amarelecem, se destacam da base do ovário e caem, deixando os discos basais, os cálices e os pedúnculos aderidos ao ramo da planta (figura C). Os cálices retidos continuam a crescer, tomando o aspecto final de estruturas dilatadas, que comumente recebem o nome de “estrelas” ou “estrelinhas”. Essas estruturas podem permanecer na planta por muitos anos.

Praticamente todas as variedades de laranja doce são afetadas pela doença, entretanto os maiores danos são verificados em variedades que apresentam vários surtos de floração como, por exemplo, os

limões verdadeiros, as limas ácidas Tahiti (*Citrus latifolia* Tanaka) e Galego (*aurantifolia* Swing) e a laranja Pêra. Nestas variedades os restos de cultura da produção temporã contribuem para o aumento da quantidade do fungo que irá atacar a florada seguinte. Ramos severamente afetados apresentam folhas amareladas, coriáceas e lanceoladas, cujas brotações no ano seguinte mostram-se irregulares e atrasadas (GOES & CRESTE, 2000).

2.3 - Agente Causal

FAGAN (1979) foi o primeiro pesquisador a demonstrar que o agente causal da QPFC era o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* Penz (1988). demonstrou, ainda, que somente os isolados obtidos das pétalas provocavam a doença. Esporos do fungo obtidos a partir de folhas não infectavam as flores. Sugeriu a existência de duas linhagens do referido fungo, uma que atacava e outra que não atacava flores.

AGOSTINI et al. (1992) descreveram três linhagens de *C. gloeosporioides* presentes em pomares cítricos da Flórida (EUA). Segundo os autores, a linhagem mais comum, denominada de "Fast-Growing-Gray" (FGG), ocorre em tecidos necróticos e senescentes e não causa dano, a não ser em tecidos enfraquecidos. Os conídios desta linhagem germinam na superfície das folhas e frutos, formam apressórios e permanecem como uma infecção latente. Quando os tecidos morrem ou são enfraquecidos por qualquer agente, eles são rapidamente colonizados. Esta linhagem não pode, portanto, ser considerada um patógeno dos citros. Verificaram que esta linhagem crescia rapidamente em meio de cultura, com uma coloração que variava do cinza ao cinza escuro, sem pigmentação alaranjada. Segundo os autores, todos os isolados de FGG produziam conídios grandes, com ambas extremidades arredondadas, abundantes setas e formavam apressórios lobulados. A linhagem associada à queda prematura dos frutos foi denominada de "Slow-Growing-Orange" (SGO), por apresentar crescimento lento em meio de

cultura, colônias com pigmentação alaranjada clara, produção de conídios menores, com ápice fusiforme e raramente com produção de setas. Quanto aos apressórios, os mesmos são clavados e fortemente pigmentados. Descreveram ainda, uma terceira linhagem chamada de “Key Lime Antracnose” (KLA), associada à antracnose da lima ácida, semelhante à SGO quanto ao tipo e crescimento da colônia e dos conídios, porém com apressórios menores e arredondados.

BROWN et al. (1996) propõem que os isolados, anteriormente designados de *Colletotrichum gloeosporioides*, pertencentes aos grupos KLA e SGO, sejam considerados patotipos de *Colletotrichum acutatum* Simmonds enquanto que, os do grupo FGG, permaneçam como *C. gloeosporioides*.

Posteriormente, GOES & KIMATI (1997 a, b), ao trabalharem com isolados de várias regiões do Brasil, constataram a existência das mesmas três linhagens constatadas por AGOSTINI et al. (1992) na Flórida, constando inclusive diferenças morfológicas. Quanto às características patogênicas, os autores verificaram sintomas típicos da QPFC, apenas em plantas onde foram inoculados isolados dos grupos SGO e KLA, excluindo, portanto a participação de isolados do grupo FGG associados à doença.

GOES & KIMATI (1998) verificaram, ainda, que a linhagem FGG é totalmente inibida por Benomyl à concentração de $1 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ em meio de cultura, enquanto que as linhagens SGO e KLA se comportaram como insensíveis, havendo crescimento micelial a $2500 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$. Observaram, ainda, que as linhagens SGO e KLA têm, inclusive, sua esporulação aumentada quando cultivadas em BDA (Batata-Dextrose-Ágar) acrescido de Benomyl a $10 \mu\text{g}/\text{mL}$. Os autores avaliaram o crescimento micelial de diferentes isolados de *C. acutatum* (SGO), obtidos de pomares com históricos diferentes quanto à regularidade do uso do fungicida, em concentrações de 100 e $500 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ de Benomyl e

não observaram diferença estatisticamente significativa entre os isolados, fato este que indica não se tratar de resistência e, sim de insensibilidade do fungo ao produto.

Dados de literatura relatam que a maior dificuldade é distinguir as linhagens que causam a queda prematura dos frutos das estirpes saprofíticas que se reproduzem sobre tecidos mortos ou senescentes. AGOSTINI & TIMMER (1992), num estudo de sobrevivência e dinâmica de populações de *C. gloeosporioides* em citros, desenvolveram um meio semi-seletivo para facilitar a distinção entre as linhagens do fungo e verificaram que a adição de hidróxido de cobre mais estreptomomicina ao meio BDA, seguido de incubação a 18°C por quatro dias mais um dia a 27°C, promovia maior desenvolvimento de conídios alaranjados de SGO, facilitando dessa maneira a separação das duas estirpes.

2.4. Epidemiologia

Pouco se conhece a respeito do modo de sobrevivência do fungo na parte aérea das árvores de citros entre os períodos de florescimento. DENHAM & WALLER (1981) sugeriram que o fungo persistia na forma de conídios sobre as superfícies das folhas ou em infecções latentes. No entanto, segundo AGOSTINI & TIMMER (1992), a sobrevivência seria na forma de apressórios nas folhas das plantas ou em cálices remanescentes do ano anterior. Exsudados das primeiras flores ou de floradas extemporâneas, trazidos pelo escorrimento de água, atingem as folhas ou cálices remanescentes e estimulam a formação de esporos que, dispersos por respingos, atingem novas flores, onde penetram diretamente nas pétalas, sem formar apressórios, com formação de lesões necróticas onde o fungo esporula abundantemente, em 4 - 5 dias, formando novos conídios para dar continuidade ao ciclo (TIMMER et al., 1994). As flores são suscetíveis em todos os estádios, desde botão floral (6 - 8 mm de

diâmetro) até a queda de pétalas (FAGAN, 1979).

Condições que propiciam mais de uma florada, ou variedades que floresçam mais de uma vez por ano, favorecem a ocorrência da doença e, assim sendo, os danos são mais severos em regiões tropicais e em variedades que florescem o ano todo (TIMMER et al., 1994). Segundo FEICHTENBERGER (1991), no Brasil, a doença é mais severa nos limões verdadeiros, em lima ácida Tahiti, na Lima ácida e na laranja 'Pêra', pois estas variedades apresentam vários surtos de floração e as infecções provocadas pelo fungo, em floradas precoces, contribuem para um aumento exponencial do inóculo do patógeno que irá afetar as floradas principais. Na realidade, o que se tem observado é que os prejuízos sobre uma dada espécie ou variedade podem variar de um ano para outro, em função da coincidência da maioria da floração com os períodos de chuva ou seca.

A temperatura ótima para o crescimento do fungo *in vitro* está em torno de 22 a 25°C (GOES, 1995) ou de 24 a 27°C de acordo com FAGAN (1979), todavia para TIMMER et al. (1994), a estirpe SGO cresce bem até em temperatura abaixo de 15 °C.

A doença é favorecida por chuvas durante o período de florada e pela quantidade de inóculo inicial das árvores. A dispersão do inoculo para flores saudáveis, pelo impacto das gotas de chuva, é que irá determinar a incidência da doença (TIMMER et al., 1994).

TIMMER & ZITKO (1996) desenvolveram um modelo de previsão para controle da doença, o qual foi muito útil na determinação da necessidade e da época adequada de aplicação de fungicidas. Eles verificaram alta correlação de porcentagem de flores doentes observadas e as previstas pelo modelo matemático, justificando, portanto, a aplicação de produtos. Para o desenvolvimento do modelo, os autores verificaram a importância da presença e dispersão do inoculo pela chuva, muito mais do que as condições para a infecção, como temperatura e umidade foliar,

considerados fatores importantes em outros sistemas de previsão. Pelo modelo de previsão foi possível reduzir a doença, aumentar a produção de frutos e eliminar aplicações desnecessárias de fungicidas.

2.5 - Controle Químico

A medida predominante de controle da doença baseia-se em pulverização com produtos químicos na época da florada (DENHAM, 1979; FAGAN, 1984).

No Brasil, estudos demonstraram que os fungicidas captafol e benomyl, aplicados isoladamente ou em combinações variadas, foram considerados como um dos produtos mais eficientes para o controle da doença (PORTO et al., 1979; SOUZA FILHO et al., 1979; PORTO, 1981a, 1981; ROSSETTI et al., 1981; MELLO & MORAIS, 1991; GOES et al., 2000; ROBERTO & BORGES, 2001). Foram também observados na Florida, Estados Unidos da América resultados semelhantes (McMILLAN Jr, 1991; TIMMER & ZITKO, 1991, 1992, 1996; PERES et al., 2002). Mas o uso desses fungicidas foi proibido desde as décadas de 80 e 90, do século XX. Outros fungicidas foram, também, citados com a mesma finalidade: thiabendazole e chlorothalonil (DENHAM, 1989).

Fungicidas a base de mancozeb, ferban, folpet, carbendazin, difenoconazole, trifloxystrobin, em combinação ou isolados, têm-se mostrado eficiente no controle da doença (GOES et al., 2000; PERES et al., 2002; GALLI et al., 2002; GOES et al., 2008).

Uma das dificuldades de se controlar a doença se origina quando há coincidência com longos períodos de chuva ou umidade elevada no pico de florescimento das plantas (DENHAM & WALLER, 1981). Nestas circunstâncias, além da dificuldade operacional, os produtos são facilmente lavados. Outra dificuldade é a ocorrência de varias floradas, o que exige um maior número de pulverizações, onerando sobremaneira o custo de produção, além do impacto negativo sobre o meio ambiente.

Sob condições ambientais favoráveis há uma elevada reprodução do patógeno, com conseqüente expressão; circunstâncias essas em que a doença se manifesta de forma exponencial, não permitindo assim atraso na execução do manejo do controle, mesmo com aporte de fungicidas adequados (GOES et al., 2008).

Observa-se que a eficiência de um manejo no controle da doença não é uma constante todos os anos, independente das combinações dos fungicidas avaliados (PORTO, 1981a). Para a tomada de decisão, necessário será levar em conta o histórico da presença da doença no talhão, estágio de desenvolvimento da flor, capacidade operacional, condições edafoclimáticas, variedade e potencial histórico de produtividade.

Com relação ao estágio de desenvolvimento da flor de citros, no momento da aplicação do produto químico, GOES et al. (2008) verificaram que o controle da QPFC foi efetivo quando se utilizou os fungicidas folpet e carbendazin, e, que uma única aplicação em flor aberta não controlou a doença. Segundo os autores, os fungicidas devem ser aplicados quando nos estádios de “cabeça-de-fósforo” e “cotonete”.

2.6. Controle Biológico

Dentre os gêneros mais utilizados em biocontrole de doenças de plantas, o *Bacillus*, mesmo não sendo superior em relação à sua atividade biocontroladora, tem grande vantagem em relação aos outros agentes de biocontrole, devido a sua capacidade de formar esporos, os quais são tolerante ao calor e ao frio, bem como às condições extremas de pH, defensivos, fertilizantes e ao tempo de estocagem. Essas vantagens permitem a utilização deste microrganismo na formulação de produtos mais estáveis e

viáveis e, sua aplicação no tratamento por via foliar (BACKMAN et al., 1997; KLOEPER et al., 1989). Outra vantagem do gênero *Bacillus* se deve ao seu rápido crescimento em meio líquido e à ausência de patogenicidade da maioria das espécies (SHODA, 2000).

Grande parte dos trabalhos enfocando controle biológico pelo gênero *Bacillus* enfatiza a espécie *B. subtilis*, que é tipicamente uma rizobactéria, que se associa às folhas formando biofilme com características ecológicas de simbiose (ASAKA & SHODA, 1996; DAVEY & O`TOOLE, 2000; KILIAN et al., 2000; GARDENER, 2004). É tida como uma das espécies biocontroladoras mais eficazes por apresentar atividade biológica contra uma serie de microrganismos causadoras de doenças de plantas, o que pode ser atribuído, em grande parte, à produção de lipopeptídicos ativos (ASAKA & SHODA, 1996; KILIAN et al., 2000; KONDOH et al., 2001; BERNAL et al., 2002; BAIS et al., 2004; GARDENER, 2004), bem como à habilidade de colonizar a planta.

BETTIOL & KIMATI (1989), em trabalho sobre a seleção de microorganismos antagônicos a *Pyricularia oryzae* para o controle de brusone do arroz, verificaram que todos os antagonistas selecionados quanto à eficiência em inibir o crescimento micelial do fitopatógeno, *in vitro*, eram da espécie *B. subtilis*.

FERREIRA et al. (1991) verificaram que um isolado de *Bacillus subtilis*, obtido do tronco da videira, inibiu o crescimento de *Eutypa lata*, agente causal da morte do ponteiro da videira. De acordo com os autores, *B. subtilis* causou 91,4% e 100% de inibição no crescimento micelial e na germinação de ascósporos do fitopatogeno, respectivamente. Em condições de campo, verificaram que se pulverizando uma suspensão da bactéria sobre ferimentos de poda, antes da inoculação com ascósporos de *E. lata*, a infecção foi reduzida significativamente, quando comparada com a testemunha, sem aplicação do agente de controle biológico.

BETTIOL et al (1994) obtiveram controle de 100% de

Hemileia vastatrix (ferrugem do cafeeiro), quando mudas de cafeeiro Catuai foram pulverizadas com 1.000 e 10.000 yg/ml de produto contendo metabólitos de *B. subtilis*.

KALITA et al. (1996) isolaram espécies de bactérias (*B. subtilis*, *B. polymyxa* e *Pseudomonas fluorescens*) e espécies de fungos (*Aspergillus terreus*, *Trichoderma viride* e *T. harzianum*) a partir da parte aérea de plantas cítricas, os quais mostraram antagonismo *in vitro* a *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. Dentre os antagonistas testados, *B. subtilis* foi o que produziu maior zona de inibição ao patógeno. Sob condições de casa de vegetação, a bactéria causou redução na incidência da doença em torno de 61,9%, quando aplicado simultaneamente à inoculação com células de *X. axonopodis*.

BETTIOL et al. (1997), em trabalho em que avaliaram o potencial de metabólitos concentrados de *B. subtilis* (CMBS) e um produto formulado contendo células e metabolitos (WPBS) de *B. subtilis* para controle de oídio de pepino e abóbora, verificaram que aplicações de CMBS a 5.000ug/mL^{-1} , uma e 24 horas antes ou depois de inoculações com *Sphaerotheca fuliginea*, reduziram o numero de lesões nas folhas de pepino entre 90 a 99%. Para abobora, o CMBS pulverizados a cada 2, 4 e 6 dias, na mesma concentração, reduziu a porcentagem de área foliar lesionada em 100, 98,3 e 94,7%, respectivamente.

Ainda, segundo BETTIOL (1997), de modo geral, para as culturas perenes, existem indicações de que o uso de antagonistas que atuam através de parasitismo conduzem a resultados mais promissores, pois o estabelecimento do antagonistas é facilitado e pode suprimir a sobrevivência do patógeno, como também a infecção.

2.7. Citricultura Sustentável

Segundo EHLERS (1999), a agricultura moderna, na fase conhecida como primeira Revolução Verde, em substituição à agricultura de pousio, surgiu a partir dos séculos XVIII e XIX, com o uso de rotação de culturas com plantas forrageiras e leguminosas, aproximando as atividades agrícola e pecuária. No início do século XX surge a segunda revolução, com novas descobertas científico-tecnológicas como os fertilizantes químicos, o melhoramento genético e os motores de combustão interna. Isto provocou o abandono gradual dos sistemas rotacionais, com crescente distanciamento da produção animal e vegetal, resultando, na década de 70, na Revolução Verde, monoculturista, provocando problemas sócio-econômicos e ambientais, como a progressiva destruição das florestas, surgimento de erosões e contaminação dos recursos naturais.

De acordo com COSTA (2001), na agricultura, a entrada do capitalismo no campo, em consonância com o modelo industrial, e suas mudanças estruturais, foi o reflexo da já citada Revolução verde, que uniu de um vez por todas, a agricultura à indústria e, dentre um dos exemplos, encontra-se a citricultura moderna.

Para sair da citricultura moderna monoculturista, com uso de defensivos, energia fóssil e biotecnologia, com pacotes tecnológicos definidos, cunhados como insustentável por uns, e, passar para a uma citricultura sustentável, com baixa entrada energética nas propriedades devido à disponibilidade de mão-de-obra somada à reciclagem de material no campo, em que cada agroecossistema necessita de interações diferenciadas, deverá levar um bom tempo.

O emprego indiscriminado, e muitas vezes criminoso, de defensivos, provoca desequilíbrios biológicos e abrevia a vida de bons defensivos, favorecendo, ainda mais o aparecimento de

pragas e doenças resistentes. Como exemplo cita-se o uso de inseticidas, aplicado via avião, por grandes produtores, e o famigerado "fog" contra cigarrinhas.

Aquela segurança compulsiva do produtor agroquímico, o qual acredita que para cada praga, ou doença, existe um antídoto rápido e seguro eternamente, não mais existe. Tanto pelos custos, como pelos desequilíbrios criam-se progressivamente problemas maiores, cujos controles são inviáveis.

Ao romper com a capacidade de auto-regulação e auto-manutenção devido à simplificação ecológica, o uso de defensivos torna-se necessário para, artificialmente, simular o equilíbrio ecológico, que antes era realizado pelas numerosas relações ecológicas benéficas. A afirmação da monocultura rompe definitivamente com a estabilidade ecológica dos agroecossistema "(...) ao ignorar a natureza biológica dos processos agrícolas (...)" (PASCHOAL, 1983)

Por outro lado, a sustentabilidade está na modificação do indivíduo (citros), já que modificou-se tanto o meio que ele não sobrevive bem. Ou ainda, está em tempo de retornar parcialmente às origens, obedecendo, imitando e respeitando a Natureza. A proposta é justamente a de praticar uma citricultura que altere o mínimo possível o ecossistema, que seja economicamente viável, que possa persistir no futuro, sem mudanças contínuas e repentinas, e que na atualidade se consiga regenerar os estragos cometidos no meio ambiente citricola.

Proposta prática e simples, está em todo lugar, é só observar a natureza e copiá-la melhor, com o uso das ferramentas que a inteligência do homem vem desenvolvendo.

Como se sabe, na natureza, e em nossas vidas, "não há mal que sempre dure ou bem que nunca se acabe". Acredita-se poder entrar em um período melhor, desde que tenhamos a capacidade de nos unir e trabalhar para isto. Os sacrificados são

e serão em grande parte dos pequenos e médios produtores, cuja agricultura sustentável defende, como os verdadeiros viabilizadores desta prática.

Dessa forma, a citricultura agroecológica como uma forma básica de atendimento das necessidades do homem supõe uma relação necessária com o meio ambiente e com outros homens. A citricultura, além de ser uma forma de produção, é fruto de uma forma de relação social e uma forma de exploração.

Entretanto, a maior restrição à citricultura sustentável é a de que, mesmo levando a uma redução das suas externalidades, através da redução de uso de defensivos, ela não dá respostas às questões centrais que originam a crise ecológica. Por um lado, essas concepções supra-referidas de citricultura agroecológica, ao se prenderem à necessidade de substituição de defensivos por outros menos impactantes (biológicos), não consideram a lógica capitalista de exploração dos recursos naturais e dos homens como principal responsável pela crise social e ecológica que vivemos. O que ocorre, em muito casos, é a substituição de insumos ou de algumas técnicas e a reprodução da mesma lógica industrial, sem ao menos a promoção da reestruturação ecológica do agroecossistema (ALTIERE, 2002; GUZMÁN CASADO et al., 2000).

É pelo pensamento alternativo que surge a citricultura sustentável – e é nesse nível de abrangência que ela constitui-se como uma orientação teórica, cujo universo problemático vai além da produção de frutos livres de contaminantes através de sistemas produtivos restritos a utilização de defensivos. O que se propõe é uma forma de entender a crise ecológica e social da modernidade e formular estratégias de transformação e de embate como modelo industrial de produção, através da busca de outras formas de conhecimento que considerem o conjunto das relações sociais em suas dimensões tanto econômicas quanto políticas e culturais e, portanto, para além de uma perspectiva

subparadigmática – norteadoras de uma ação técnica e social efetiva.

Para o enfoque de uma citricultura agroecológica é necessário considerar que, se a crise ecológica no campo é um reflexo da própria racionalidade científica moderna, a superação desta crise passa necessariamente pelo entendimento de que racionalidade é essa e quais são os pressupostos epistemológicos que guiaram a prática científica dos profissionais e cientistas que tem, mesmo inconscientemente, como premissas filosóficas (NORGAARD; SIKOR, 2002).

A principal questão identificada na leitura destes autores é a necessidade de analisar criticamente a ciência moderna como o resultado e uma construção histórica, e a necessidade de repensá-la para entender de forma mais ampla a crise sócio-econômica-ambiental no campo e as estratégias de atuar para resolução da mesma. Ao recusar a racionalidade técnico-científica-instrumental, a citricultura agroecológica volta-se para o entendimento e a formulação de propostas de enfrentamento dos problemas rurais, tratadas nesta dissertação como instrumento para um manejo mais sustentável.

No intuito de minimizar os impactos do uso indiscriminado de agrotóxico, buscamos através da pesquisa, um controle mais racional para *Colletotrichum acutatum*, agente causal de uma das mais importantes doenças fúngicas dos citros, utilizando o controle biológico como uma ferramenta alternativa dentro de uma citricultura sustentável.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Efeito da concentração de *Bacillus subtilis* no controle de *Colletotrichum acutatum*, sob condições de campo (safra 2007/2008)

Utilizou-se pomar de plantas de laranjeira 'Pêra' [*Citrus sinensis* L. Osbeck] enxertada sobre limoeiro Cravo (*C. limonia* Osbeck), localizado no município de Botucatu, São Paulo, Brasil.

Para a produção das suspensões do antagonista, colônias de *Bacillus subtilis* (ACB-69) foram repicadas para frascos de vidro com capacidade para 20 L, contendo 15L de meio, constituído a base de adubo foliar, denominado de Ajifol (N=10%; K=2%; Zn=5%; Mn=2%; B=1%; S=6% e MO=30%) a 5% (v/v). Este meio foi utilizado para multiplicação do antagonista por conter fontes de carbono, nitrogênio e sais, além de ser de baixo custo e utilizado em muitos pomares de citros, como fonte de nutrientes.

Após a repicagem, procedeu-se a incubação em ambiente de laboratório, no escuro, sob agitação constante por 72 horas. Em seguida, o inoculo, contendo 10^8 ufc/mL⁻¹ foi multiplicado, nas mesmas condições e por igual período de incubação, alcançando uma concentração final de

10^{10} ufc/mL⁻¹.

Os tratamentos corresponderam ao isolado ACB-69 em duas concentrações diferentes, a 5 e 10%, que foram aplicados semanal e quinzenalmente, durante o período de florescimento. Um tratamento adicional foi constituído pela aplicação de ACB-69 a 10%; outro com o ACB-69 (na concentração de 10%), porém aplicado com uma semana de antecedência dos demais tratamentos, totalizando, portanto, cinco tratamentos com agentes de controle biológico. Tais tratamento tiveram como padrão as

estratégias adotadas pela propriedade, com duas aplicações em intervalo quinzenal, sendo a primeira mancozeb + fomaxadone e segunda com carbendazin. Às plantas correspondentes à testemunha foram aplicadas somente água, nas mesmas condições anteriores apontadas para os demais tratamentos

Ao todo, foram realizadas 12 aplicações para os tratamentos que corresponderam a ACB69 semanalmente, 13 aplicações quando da aplicação de *B. subtilis* iniciado com uma semana de antecedência, e seis aplicações para os tratamentos de intervalos quinzenais. Utilizou-se um delineamento experimental de blocos ao acaso, com sete tratamentos, quatro repetições, sendo cada parcela experimental constituída por dez plantas.

Os tratamentos foram aplicados por meio de turboatomizador, calibrado para volume de aplicação de 3800 litros/há⁻¹, resultando numa deposição aproximada de 8,0 L/planta. A pressão de trabalho utilizada foi de 100 lb/pol², com rotação do motor suficiente para proporcionar 540 rpm na tomada de potência do trator.

As avaliações consistiram na contagem do número de flores doentes e sadias, em uma amostra de quatro ramos por planta, nas três plantas centrais da parcela. Posteriormente determinou-se a porcentagem de flores com sintomas, seguindo a metodologia adaptada de TIMMER & ZITKO (1996). Uma avaliação adicional foi realizada cerca de 90 dias após a primeira, efetuando-se a contagem do número de frutos fixados e do número de cálices retidos e/ou amarelecidos devido à doença, a fim de se obter o número médio de frutos efetivos: $NMFE^{(2)} = (A/(A + B)) \times 100$, onde A = nº de frutos fixados e B = nº de cálices retidos e/ou nº de frutos amarelecidos devido à doença, de acordo com GOES (1995).

3.2. Efeito da adição de uma fonte de carbono(melaço a 5%) na pulverização de *B. subtilis* para controle de *C. acutatum* (safra 2008/2009)

O presente ensaio foi instalado em pomar de plantas de Laranjeira Valência enxertada sobre Limoeiro Cravo, localizado no município de Botucatu, São Paulo, Brasil.

Os tratamentos corresponderam ao isolado ACB-69 (10%) em duas concentrações, a 5 e 10%, acrescidos de melaço a 5% aplicados semanalmente, totalizando, portanto, quatro tratamentos com agentes de controle biológico. Como referências de controle foram utilizados: o tratamento químico padrão, empregado pela fazenda, e o tratamento testemunha, no qual foi aplicado água.

A produção das suspensões do antagonista, as aplicações dos tratamentos e as avaliações seguiram os mesmos procedimentos do ensaio anterior.

3.3. Ponto de aplicação do produto biológico para controle de *Colletotrichum acutatum* (safra 2008/2009)

Para esse estudo, o ensaio foi instalado em um pomar de laranjeira Valência enxertada sobre limoeiro Cravo, localizado no município de Botucatu, São Paulo, Brasil.

A aplicação do produto biológico e os demais ensaios teve início em quatro estádios diferentes de desenvolvimento das flores e seguiu a aplicação normal do produto, de acordo com o período de suscetibilidade. Os diferentes estádios compreenderam cabeça de alfinete, cabeça de fósforo, cotonete e flor aberta, tais

tratamentos foram comparados com o tratamento químico (carbendazin), utilizado pela fazenda e o tratamento testemunha que correspondeu à aplicação com água. Ao todo foram testados nove tratamentos.

Os procedimentos para produção de inóculo, aplicação e avaliação seguiram os mesmos procedimentos dos ensaios anteriores.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Efeito da concentração de *Bacillus subtilis* no controle de *Colletotrichum acutatum*, sob condições de campo (safra 2007/2008)

Os dados relativos ao efeito da concentração de *B. subtilis* no controle de *C. acutatum*, sob condições de campo, avaliados por meio da porcentagem de flores com sintomas de QPFC e número médio de frutos efetivos (NMFE) encontram-se na Tabela 1. Os resultados revelaram que a doença ocorreu com grande intensidade e que, houve efeito dos tratamentos na incidência da mesma.

Quando se analisaram os dados referentes à porcentagem de flores com sintomas, verificou-se que, os únicos tratamentos que diferiram estatisticamente do tratamento testemunha (sem controle) foram os que utilizaram a bactéria na concentração de 5%, com aplicações semanais ou quinzenais ou, quando se aplicou *Bacillus* (a 10%) com uma semana de antecedência, em relação aos demais tratamentos. Observa-se que, quando as plantas foram tratadas semanalmente com ACB-69 (5 %), a quantidade de flores com sintomas foi reduzida em 47% enquanto, que, o tratamento químico apresentou uma eficiência de apenas 18%, quando em comparação com os dados da testemunha.

Tabela 1- Efeito dos agentes de controle biológico na porcentagem de flores com sintomas de infecção por *Colletotrichum acutatum* e no número médio de frutos efetivos (NMFE), em plantas de laranja 'Pêra', em condições de campo, no município de Botucatu, SP, na safra 2007/2008.

Tratamentos	Porcentagem de flores com sintomas de <i>C. acutatum</i>	NMFE(2)
Testemunha	35,12 a (1)	46,50 b
Controle Químico	28,69 ab	51,81 ab
ACB69 a 10% (Quinzenal)	27,26 ab	62,69 ab
ACB69 a 10% (Semanal)	22,75 ab	73,57 a
ACB69 a 05% (Quinzenal)	22,05 b	64,73 ab
ACB69 a 10% (13 aplic.)	19,40 b	76,72 a
ACB69 a 05% (Semanal)	18,72 b	57,24 ab

(1) Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si (Duncan, $P \geq 0,05$).

Com relação aos dados apresentados pelo número médio de frutos efetivos, os melhores tratamentos foram obtidos quando o isolado ACB-69 (a 10%) foi aplicado com uma semana de antecedência dos demais e, quando o mesmo tratamento foi aplicado semanalmente. Tais tratamentos não diferiram dos

demais que, por sua vez, não diferiram da testemunha.

Quanto às metodologias de avaliações empregadas, a porcentagem de flores com sintomas, utilizada por TIMMER & ZITKO (1996), avalia diretamente o efeito da doença, enquanto que, pelo método do NMFE, proposto por GOES (1995), além do efeito direto da doença, está envolvido, também, o efeito da fixação do fruto. Considerando-se que, a porcentagem de flores que vingam e permanecem em desenvolvimento até o fruto maduro é ao redor de 0,1 a 3% (GUARDIOLA, 1992), o efeito do “pegamento” no cálculo do NMFE pode ser significativo e pode explicar o resultado obtido neste trabalho. Quando se observa que um maior número de frutos vingados foi obtido pelo tratamento com uma aplicação a mais, sugere-se que, o meio a base de adubo foliar, no qual foi multiplicado o agente de controle biológico, possa ter favorecido a planta, dando a ela maior vigor e proteção ao ataque do patógeno e, conseqüentemente, proporcionado maior “pegamento” dos frutos cítricos.

KUPPER et al. (2003) ao desenvolverem um trabalho, utilizando sete isolados de *B. subtilis* e três isolados de espécies diferentes de *Trichoderma*, todos na concentração de 10% e aplicados por meio de pulverizador manual na época da florada para controle de *C. acutatum*, relataram que, o isolado bacteriano ACB69 diferiu da testemunha, equiparando-se estatisticamente ao benomyl, proporcionando menor porcentagem de flores com sintomas e maior número de frutos efetivos.

O presente trabalho, quando comparado ao realizado por estes autores, apresentou maior ousadia em termos de instalação de ensaio, ou seja, no presente estudo, o inóculo foi pré produzido em laboratório, chegando a uma concentração de células de 10^8 ufc/mL e, em seguida, levado ao laboratório da fazenda para ser multiplicado, onde alcançou uma concentração

final de células de 10^{10} ufc/mL, de forma que fosse aplicado em plantas de citros em escala comercial e, com aplicações por meio de turboatomizador.

Diversos trabalhos são encontrados na literatura, comprovando a produção de metabólitos tóxicos por *B. subtilis* (HUANG & CHANG, 1975; BAKER et al., 1983; McKEEN et al., 1986; ARRAS & ARRU, 1997), metabólitos estes que podem inibir a germinação de esporos ou o crescimento de muitos fungos (CUBETA et al., 1985; BETTIOL & KIMATI, 1989; BETTIOL & KIMATI, 1990; KUPPER et al., 2003) o que, poderiam afetar as próprias células de *Bacillus*, quando em maior concentração na calda do biofungicida no sitio de ação. Diante deste contexto, a maior concentração de *B. subtilis* na calda não diminuiu a eficiência do produto biológico, fato esse observado quando dos resultados obtidos pelo número médio de frutos efetivos (Tabela 1), onde a aplicação semanal ou, com uma semana de antecedência do período indicado (início da formação da florada) para o controle da doença, mostrou-se eficiente para o controle de *C. acutatum*.

4.2. Efeito da adição de uma fonte de carbono na pulverização de *B. subtilis* para controle de *C. acutatum* (safra 2008/2009)

Os dados apresentados na Tabela 2 mostram que, o tratamento em que se adicionou uma fonte de açúcar, durante a aplicação do agente de controle biológico, não diferiu estaticamente do tratamento em que se aplicou apenas a bactéria a 10%, quando se avaliou a porcentagem de flores com sintomas, apresentando uma eficiência de controle que variou de 48 a 56%, em relação à testemunha.

Tabela 2- Efeito da adição de uma fonte de carbono durante a pulverização com *Bacillus subtilis* na porcentagem de flores com sintomas de infecção por *Colletotrichum acutatum* e no número médio de frutos efetivos (NMFE), em plantas de laranja 'Valência', no município de Botucatu, SP, Brasil (safra 2008/2009).

Tratamentos	Porcentagem de flores com sintomas de <i>C. acutatum</i>	NMFE(2)
ACB69 a 10%	42,31 b(1)	67,00 a
ACB69 a 10% + melaço a 5%	35,85 b	66,00 a
ACB69 a 5%	61,78 ab	37,00 b
ACB69 a 5% + melaço a 5%	57,75 ab	32,00 bc
Controle Químico	56,60 b	63,00 a
Testemunha	80,71 a	26,00 c

(1) médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si (Duncan, $P \geq 0,05$).

Quando se avaliou o número médio de frutos efetivos, o acréscimo do melaço durante a aplicação de *Bacillus* (10%), também, se mostrou indiferente. Por essa metodologia de avaliação utilizada, os melhores tratamentos foram: aplicação de ACB-69 (a 10%), ACB-69 (10%) + melaço (5%) e o controle químico, com porcentagens do número médio de frutos efetivos que variaram de 63 a 67%, não havendo diferença estatística entre os tratamentos citados. Levando-se em consideração que o

isolado de *B. subtilis*, empregado no presente trabalho, tenha sido obtido do filoplano de plantas cítricas, tudo indica que o mesmo possua adaptação para viver nesse ambiente. Os resultados positivos de *B. subtilis* na redução da porcentagem de flores com sintomas e no favorecimento da obtenção de maior número de frutos efetivos sugerem que o ACB69 é um agente em potencial para o controle biológico da QPFC e que, o acréscimo de uma fonte de carbono no momento da aplicação pode favorecer o antagonismo da bactéria, no entanto, a adição é facultativa, principalmente, quando se avalia o número de frutos efetivos na planta (Tabela 2).

Pelos dados observados no trabalho de BETTIOL et al. (2005) pode-se verificar, que, em termos de produção de células bacterianas, qualquer fonte de carbono ou nitrogênio que foi utilizado para a multiplicação de *B. subtilis*, proporcionou uma quantidade de células suficiente para ser empregada no controle biológico de *P. citricarpa*, agente causal da mancha preta dos frutos cítricos. No entanto, estudos devem ser complementados a respeito da produção de substâncias antifúngicas, como o mencionado no trabalho de AHMAD & MALIK (1997). Uma vez que, em alguns casos, a produção de células do agente de biocontrole em um determinado substrato pode ser inversamente proporcional à quantidade de substâncias produzidas e que, sejam ativas contra fitopatógenos.

4.3. Ponto de aplicação do produto biológico para controle de *Colletotrichum acutatum* (safra 2008/2009)

Tem se verificado na prática que, mesmo sob condições controladas durante a pulverização, muitas vezes não se tem alcançado o nível de controle desejado. Dentre alguns possíveis fatores que podem influenciar na efetividade dos tratamentos, inclui-se a aplicação do produto biológico, a época de pulverização e respectivo estágio de florescimento. Com relação aos dados da Tabela 3 e ilustrados nas Figuras de 01 a 04,

verificou-se que, o melhor momento de aplicação do isolado ACB-69 de *B. subtilis* para controle da doença foi na fase de flor aberta com uma redução de flores doentes em torno de 34%, tal tratamento não diferiu do controle químico, que apresentou, aproximadamente, 52 % de eficiência de controle, em relação ao tratamento testemunha (sem controle).

Tabela 3: efeito da aplicação de *Bacillus subtilis* na porcentagem de flores com sintomas de infecção por *Colletotrichum acutatum* e no número médio de frutos

Efetivos (NMFE), em plantas de laranja Valência (Botucatu, SP na safra 2008/2009)

Tratamentos	Porcentagem de flores com sintomas de <i>C. acutatum</i>	NMFE
Cabeça de Fósforo	15,85 abc(1,2)	42,00 d (2)
Todos os estádios de floração	17,10 abc	75,00 ab
Fase de cotonete	20,43 ab	66,75 bc
Fase de Cabeça de alfinete	15,84 abc	59,00 bcd
Cab. Alfinete+ cab. Fósforo	15,06 abc	57,75 cd
Fase de flor aberta	14,45 bc	51,25 cd
Cab.Alf.+cab. Fósf.+cotonete	15,94 abc	49,25 d
Testemunha	21,73 a	48,00 d
Controle Químico	10.54 c	86,00 a

(1)Dados transformados em $\arcsin \sqrt{x+0.5}$; (2)médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si(Duncan $P \geq 0,05$)

Segundo KUPPER et al. (2003), *B. subtilis*, especialmente o isolado ACB-69, age por antibiose sobre o fungo *C. acutatum*, dessa maneira, acredita-se que, a eficiência de controle é maior quando o agente de biocontrole encontra-se na presença do patógeno. Conseqüentemente, a atuação do produto biológico deve ser na prevenção da infecção e no desenvolvimento inicial do fungo.

Diante deste contexto, quando se avalia o controle da doença pelo método da porcentagem de flores com sintomas (TIMMER & ZITKO, 1996), é de se supor que o melhor momento de aplicação da bactéria deverá ser na fase de flor aberta, como demonstrado neste trabalho, considerando que é nesta fase que ocorre a maior esporulação do patógeno e, uma vez que, as condições ambientes sejam favoráveis, essa é, também, a fase em que a flor encontra-se mais suscetível ao ataque do fungo. De acordo com ZULFIQAR et al. (1996), após a infecção inicial de *C. acutatum* em flores de citros, as pétalas são rapidamente colonizadas e os primeiros sintomas aparecem em menos de 48 horas, portanto, a ação antagônica de *B. subtilis* por antibiose é fundamental nessa fase para a supressão da doença em condições naturais. A eficiência do isolado ACB-69, equiparando-se ao fungicida padrão, confirmou mais uma vez, a potencialidade verificada, previamente, em testes *in vitro* e em flores destacadas (KUPPER & GIMENES-FERNANDES, 2002; KUPPER et al., 2003) e sob condições de campo (KUPPER et al, 2003).

Quando se avaliou o número médio de frutos efetivos, verificou-se que, os melhores resultados foram obtidos com a aplicação do produto químico e com aplicações da bactéria em todos os estádios de florescimento, com uma quantidade média de frutos vingados de 86% e 75%, respectivamente. Vários fatores podem ser levados em consideração para tentar explicar a necessidade de aplicação de *B. subtilis* durante todos os estádios de florescimento, primeiro, diz respeito ao comportamento

etiológico do patógeno, uma das formas de sobrevivência de *C. acutatum* é na forma de apressórios, os quais germinam e produzem hifas e conídios na superfície de folhas, quando na presença de umidade e extratos de pétalas (TIMMER et al., 1994), condições essas presentes durante o tempo todo da realização do ensaio; segundo, o longo período de florescimento das plantas cítricas na região de Botucatu, expondo as mesmas a um tempo mais longo de suscetibilidade, quando comparado com outras regiões e, terceiro, o mecanismo de ação empregado pela bactéria, a antibiose, como mencionado anteriormente, que requer ação mais rápida e na presença do fitopatógeno.

O longo período de exposição das flores, associado a um período crítico de infecção relativamente curto e longos períodos de chuva, durante o período de florescimento dificultam o planejamento e a execução das pulverizações com produtos químicos, acarretando em grandes dificuldades para o controle do patógeno, que sob condições ambientais favoráveis, se reproduzem de forma intensa, com conseqüente expressão de sintomas. Nessas circunstâncias a doença manifesta-se de forma exponencial, o que não permite um atraso na execução de programas de controle, mesmo quando são utilizados fungicidas adequados (GOES et al., 2008). Considerando que a bactéria foi obtida do mesmo habitat e, portanto, adaptada às mesmas condições do fitopatógeno, as chances de se estabelecer e de exercer suas atividades antagônicas são maiores, diante das circunstâncias citadas acima.

Por outro lado, os resultados obtidos neste trabalho divergem dos trabalhos com produtos químicos, os quais são citados em literatura. De acordo com GOES et al. (2008), os fungicidas carbendazin e folpet foram eficientes no controle da queda prematura dos frutos cítricos, quando aplicados em 'cabeça-de-fósforo' e 'cotonete', sob condições de campo; enquanto que, para ROBERTO & BORGES (2001) o melhor

controle foi obtido com benomyl, quando plantas de laranjeiras doces foram pulverizadas nos estágios de predominância de botões redondos brancos até cotonetes, em floradas temporãs.

Quanto à possibilidade de utilização do turboatomizador para aplicação da bactéria, pode-se considerar um método eficiente de aplicação, que além de permitir uma melhor distribuição do inoculo pela planta, não acarreta danificações nas células de *Bacillus*, podendo, portanto, ser uma indicação para aplicações futuras com o microrganismo, conforme pode ser confirmado neste trabalho, onde todos os ensaios de campo foram aplicados com turboatomizador .

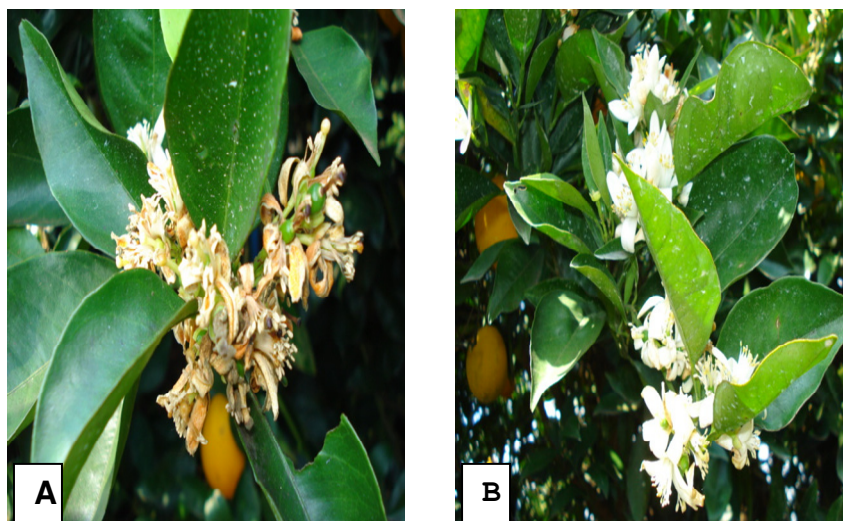


Figura 2: Efeito da época de aplicação de *Bacillus subtilis* na porcentagem de flores com sintomas de infecção por *Colletrochum acutatum*, em plantas de laranja 'Valência', no município de Botucatu, SP, na safra 2008/ 2009. A- Flores testemunhas; B- Flores tratadas com o fungicida padrão.



Figura 3: Efeito da época de aplicação de *Bacillus subtilis* na porcentagem de flores com sintomas de infecção por *Colletrichum acutatum*, em plantas de laranja 'Valência', no município de Botucatu, Sp, na safra 2008/ 2009. C- Flores tratadas no estágio de cabeça de alfinete; D- Flores tratadas no estágio de cabeça de fósforo.

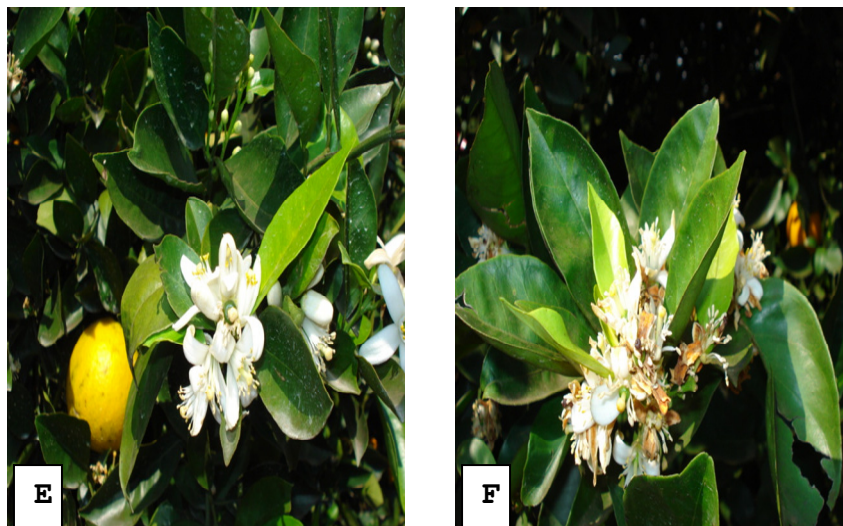


Figura 04: Efeito da época de aplicação de *Bacillus subtilis* na porcentagem de flores com sintomas de infecção por *Colletotrichum acutatum*, em plantas de laranja 'Valência', no município de Botucatu, SP, na safra 2008/ 2009.

E- Flores tratadas nos estágios de cabeça de alfinete e cabeça de fósforo;
F- Flores tratadas no estágio cotonete.



Figura 05: Efeito da época de aplicação de *Bacillus subtilis* na porcentagem de flores com sintomas de infecção por *Colletotrichum acutatum*, em plantas de laranja 'Valência', no município de Botucatu, SP, na safra 2008/ 2009.

G- Flores tratadas no estágio de flor aberta; H- Flores tratadas em todos os estágios.

5. CONCLUSÕES

Em função dos resultados experimentais obtidos, conclui-se que:

- a) é tecnicamente viável a aplicação semanal de *Bacillus subtilis*, na concentração de 10%, durante o período de florescimento de citros, para controle de *Colletotrichum acutatum*;
- b) é facultativa a adição de uma fonte de carbono no momento da aplicação da bactéria, visando incrementar a eficiência de controle da doença, principalmente, quando se avalia o número de frutos efetivos nas plantas de citros;
- c) a utilização do turboatomizador para aplicação da bactéria mostrou-se eficiente e permitiu uma boa distribuição do agente de biocontrole nas plantas cítricas;
- d) *B. subtilis* deve ser aplicado em todos os estádios de florescimento para se obter uma maior quantidade de frutos efetivos na planta.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIANUAL, 2009. **Anuário da Agricultura Brasileira**. São Paulo: FNP, Consultoria & Comércio, 2009. p. 267-300.

AGOSTINI, J.P., TIMMER, L.W. Selective isolation procedures for differentiation of two strains of *Colletotrichum gloeosporioides* from citrus. **Plant Disease**, St. Paul, v.76, n.11, p.1176-1178, 1992.

AGOSTINI, J.P., TIMMER, L.W., MITCHELL, D.J. Morphological and pathological characteristics of strains of *Colletotrichum gloeosporioides* from citrus. **Phytopathology**, v.82, n.11, p.1377-1382, 1992.

AHMAD, M.S., MALIK, M.A., 1997. Formulation of a synthetic médium for the production of antifungal antibiotic from *Bacillus subtilis* AECL 69. *Pakistan-Journal-of-Zoology* 29, 15-21.

ALTIERI, M. A (Ed.). **Agroecologia: bases científicas para uma agricultura sustentável**. Guaíba: AS-PTA/Agropecuária, 2002. 592p.

ARRAS, G.; ARRU, S. Mechanism of action of some microbial antagonists against fungal pathogens. **Annali di Microbiologia ed Enzimologia**, Milan, v.47, p.97-120, 1997.

ASAKA, O.; SHODA, M. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping off of tomato with *Bacillus subtilis* RB14. **Applied and Environmental Microbioloy**, 62, 4081-4085, 1996.

BAIS, H.P. ; FALL, R. ; VIVANCO, J.M. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas*

syringae is facilitated by biofilm formation and surfactin production. **Plant Physiology**, 134, 307-319, 2004.

BAKER, J.C., STAVELY, JR., THOMAS, C.A., SASSER, M., Mac MACFALL, J.S. Inhibitory effect of *Bacillus subtilis* on *Uromyces phaseoli* and on development of rust pustules on bean leaves. **Phytopathology**, St. Paul, v. 73, n.8, p.1148-1152, 1983.

BERNAL, G.; ILLIANES, A.; CIAMP, L. Isolation and partial purification of a metabolite from a mutant strain of *Bacillus* sp. With antibiotic activity against plant pathogenic agents. **Electronic Journal of Biotechnology**, 5(1), 2002.

BETTIOL, W. Biocontrole na filosfera: problemas e perspectivas. In: LUZ, W.C. (Ed.) **Revisão anual de patologia de plantas**. Passo Fundo, 1997. v.5, p. 59-57.

BETTIOL, W., GARIBALDI, A., MIGHELI, Q. *Bacillus subtilis* for the control of powdery mildew on cucumber and zucchini squash. *Bragantia*, Campinas, v.56, n.2, p.281-287, 1997.

BETTIOL, W., KIMATI, H., 1990. Efeito de *Bacillus subtilis* sobre *Pyricularia oryzae* agente causal da brusone do arroz. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 25, p.1165-1174.

BETTIOL, W., KUPPER, K.C., GOES, A. DE, MORETTO, C., CORRÊA, E.B., 2005. Mass production of *Bacillus subtilis* and *Trichoderma viride* for the control of *Phyllosticta citricarpa* (teleomorph: *Guignardia citricarpa*). *Summa Phytopathologica* 31, p.276-278.

BETTIOL, W., KIMATI, H. Seleção de microrganismo antagônicos a *Pyricularia oryzae* Cav. Para controle do Brusone do arroz (*Oryza*

sativa L.) **Summa Phytopathologica**, v. 15, p. 257-266, 1989.

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

BROWN, A.E., SREENIVASAPRASAD, S., TIMMER, L.W. Molecular characterization of slow-growing orange and key Lime anthracnose strains of *Colletotrichum* from citrus as *C. acutatum*. **Phytopathology**, St. Paul, v.86, n.5, p.523-527, 1996.

COSTA, A.L. O Meio Ambiente, a Modernização Conservadora e a Educação Ambiental. Revista Eletrônica Mest. Educação Ambiental, v. 06, p.31-49, 2001.

CUBETA, M.A., HARTMAN, G.L., SINCLAIR, J.B. Interaction between *Bacillus subtilis* and fungi associated with soybean seeds. *Plant Disease*, St. Paul, v.69, n.6, p.506-509, 1985.

DAVEY, M.E.; O`TOOLE, G.A. Microbial biofilm: from ecology to molecular genetics. **Microbiology and Molecular Biology Review**, 64: 847-67, 2000.

DENHAM, T.G. Citrus production and premature fruit drop disease in Belize. **Pans**, London, v.25, n.1, p.30-36, 1979.

DENHAM. T.G., WALLER, J.W. Some epidemiological aspects of post-bloom fruit drop disease (*Colletotrichum gloeosporioides*) in citrus. **Annals of Applied Biology**, Londres, v.98, n.1, p.65-67, 1981.

DORNELLES, C.M.M. O problema da queda de frutos jovens de citros no Rio Grande do Sul. In: MESA Redonda para Estudo da

Queda de Frutos Jovens em Citrus. Taquari, RS, 1977. p.3-6.

FAGAN, H.J. Postbloom fruit drop of citrus, a new disease of citrus associated with a form of *Colletotrichum acutatum*. **Annual Applied Biology**, London, v.91,n.1, p.13-20, 1979.

FAGAN, H.J. Postbloom fruit drop of citrus in Belize: II. Disease control by aerial and ground spraying. **Turrialba**, Turrialba, v. 34, n. 2, p. 179-186, 1984.

FEICHTENBERGER,E. Queda de frutos jovens em citros. **Laranja**, Cordeirópolis, v.12, n.2, p. 513-521, 1991.

FEICHTENBERGER, E. Podridão floral dos citros: histórico, sintomatologia, etiologia e epidemiologia. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 15, n. 2, p. 109-28, 1994.

FERREIRA, J.H.S., MATTHEE, F.N., THOMAS, A.C. Biological control of *Eutypa lata* on grapevine by an antagonistic strain of *Bacillus subtilis*. **Phytopathology**, St. Paul, v.81, p.283-287, 1991.

GALLI, M.A.; PARADELA, A.L.; SIMA, Jr., J.C.; SALVO, S.; SCHERB, C.T. Avaliação de fungicidas no controle da podridão floral (*Colletotrichum acutatum*) em limão Taiti (*Citrus lantifolia*). **Revista Ecosystema**, Pinhal, v. 27, n. 1/2, p. 67-68, 2002

GARDENER, B.B.M. Ecology of *Bacillus* and related genera: the aerobic endospore forming bacteria. **Phytopathology**, 94(11), 1245-1248, 2004.

GOES, A. Queda prematura dos frutos cítricos: caracterização do agente causal, *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. [Sensu Arx, 1957], e controle da doença. 1995. 143f. Tese (Doutorado em

Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1995.

GOES, A., CRESTE, J.E. Uso do sistema integrado de diagnose e recomendação (DRIS) na avaliação de folhas de plantas cítricas com sintomas de queda prematura de frutas. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v.26, p. 237-240, 2000.

GOES, A. de, KIMATI, H. Caracterização morfológica de isolados de *Colletotrichum acutatum* e *C. gloeosporioides* associados à Queda Prematura dos Frutos Cítricos. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v.23, n.1, p.04-09, 1997a.

GOES, A. de, KIMATI, H. Caracterização patogênica de isolados de *Colletotrichum acutatum* e *C. gloeosporioides*, obtidos de plantas cítricas. Queda Prematura dos Frutos Cítricos. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v.23, n.1, p.10-14, 1997b.

GOES, A.; KIMATI, H. *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos: resistente ou insensível ao benomyl? **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 24, n. 3/4, p. 246-253, 1998.

GOES, A.; KUPPER, K.C. Controle das doenças causadas por fungos e bactérias na cultura dos citros. In. ZAMBOLIM, L. **Manejo integrado: fruteiras tropicais – Doenças e Pragas**. Viçosa, 2002. p. 353-412.

GOES, A.; MORETTO, K.C.K.; WIT, C.V.P. de. Effect of ferbam alone or in combination with benomyl for control of citrus postbloom fruit drop. In: INTERNATIONAL SOCIETY OF CITRICULTURE, 2000, Orlando. Proceedings... Orlando: Proceedings of International Society of Citriculture, ISC, 2000. p.145-145.

GOES, A.; GARRIDO, R.B.O.; REIS, R.F.; BALDASSARI, R.B.; SOARES, M.A. Evaluation of fungicide applications to sweet orange at different flowering stages for control of postbloom fruit drop caused by *Colletotrichum acutatum*. **Crop Protection**, Oxford, v. 27, n. 1, p. 71–76, 2008.

GUARDIOLA, J.L. Fruit set and growth. **Proceedings of the Second International Seminar on Citrus Physiology**, Bebedouro, São Paulo, 1, p. 1-30, 1992.

GUZMÁN CASADO, G.; GONZÁLES DE MOLINA, M.; SEVILLA GUZMÁN, E. **Introducción a la Agroecología como desarrollo rural sostenible**. Madrid: Mundi-Prensa, 2000. 535p.

HUANG, T., CHANG, M. Studies on xanthobacillin, a new antibiotic from *Bacillus subtilis* active against *Xanthomonas*. Botanical Bulletin Academia Sinica, Nankang, v.16, p.137-148, 1975.

KALITA, P.; BORA, L.C.; BHAGABATI, K.N. Phylloplane microflora of citrus and their role in management of citrus canker. **Indian Phytopathology**, New Delhi, v.49, n.3, p.234-237, 1996.

KLOEPPER, J. W.; LIFSHITZ, R.; ZABLOTOWICZ, R. M. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. **Trends in Biotechnology**, v.7, p.39-44, 1989.

KILIAN, M.; STEINER, V.; JUNGE, H.; SCHMIEDEKNECHT, G.; HAIN, R. FZB21. *Bacillus subtilis* – mode of action of a microbial agent enhancing plant vitality. **Pflanzenschutz – Nachrichten Bayer**, 1, 172-93, 2000.

KONDOH, M.; HIRAL, M.; SHODA, M. Integrated biological and chemical control of Damping-off using *Bacillus subtilis* 1XB14-c

and Flutolamil. **Journal of Biosciencia and Bioengineering**, 91(2), 173-177, 2001.

KUPPER, K.C., BETTIOL, W., CORRÊA, E.B., MORETTO, C., 2004. Potencialidade de *Bacillus subtilis* e *Trichoderma* spp. como agentes de biocontrole de *Guignardia citricarpa*. **Fitopatologia Brasileira** 29, S129. (Abstract).

KUPPER, K.C., BETTIOL, W., CORRÊA, E.B., MORETTO, C., GOES, A. de, 2005. Controle de *Guignardia citricarpa*, agente causal da mancha preta dos frutos cítricos, através de *Bacillus subtilis* e *Trichoderma* spp. Libro de Resúmenes: XII Congreso Latinoamericano de Fitopatologia – III Taller de la Asociación Argentina de Fitopatólogos. (Abstract).

KUPPER, K.C., GIMENES-FERNANDES, N., 2002. Isolamento e seleção de *Bacillus* spp. para o controle de *Colletotrichum acutatum* em flores destacadas de lima ácida 'Tahiti'. **Summa Phytopathologica** 28, p. 292-295.

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

McKEEN, C.D., REILLY, C.C., PUSEY, P.I. Production and partial characterization of antifungal substances antagonistic to *Monilinia fructicola* from *Bacillus subtilis*. **Phytopathology**, St. Paul, v.76, p.136-139, 1986.

MELO, M.B. de; MORAIS, C.F.M. de. Controle químico da queda de frutos jovens de citros. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 11, 1991, Petrolina. **Programas e resumos...**

Petrolina: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1991. n.p.

MORETTO, K.C.K. Controle Biológico da Queda Prematura dos Frutos Cítricos. 200. p. 127. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal, 2000.

McMILLAN, Jr., R.T. Evaluation of fungicides for control of postbloom fruit drop of “Tahiti” limes caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, Winter Haven, v. 104, p. 160-161, 1991.

NORGAARD, R. B.; SIKOR, T. O. A base epistemológica da Agroecologia. In: ALTIERI, M. A. (Ed.). **Agroecologia: bases científicas para uma agricultura sustentável**. Guaíba: AS-PTA/Agropecuária, 2002. p. 53-83.

OROZCO SANTOS, M.; GONZÁLEZ GARZA, R. Caída de fruto pequeño y su control en naranja ‘Valencia’ en Veracruz. *Agricultura Técnica en México*, v. 12, n. 2, p. 259-269, 1986.

PASCHOAL, A. D. O ônus do modelo da agricultura industrial. **Revista Brasileira de tecnologia**, Brasília, v. 14, n. 1, p. 28-40, jan./fev. 1983.

PERES, N.A.R.; SOUZA, N.L.; ZITKO, S.E.; TIMMER, L.W. Activity of benomyl for control of postbloom fruit drop of citrus caused by *Colletotrichum acutatum*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 86, n. 6, p. 620-624, 2002.

PORTO, O. de M; ROSSETTI, V.; DORNELLES, C.M.M. Queda de frutos jovens de citrus, causada por *Colletotrichum* sp. no Rio Grande do Sul. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 5, 1979, Pelotas. **Anais...** Pelotas: Sociedade

Brasileira de Fruticultura, 1979. p.681-692.

PORTO, O. de M. Comparação de programas para controle químico da queda anormal de frutos jovens de citros. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 6, 1981, Recife. **Anais...** Recife: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1981. p.481-487.

PUSEY, P.L.; WILSON, C.L.; HOTCHKISS, M.W.; FRANKLIN, J.D. Compatibility of *Bacillus subtilis* for postharvest control of peach brown rot with commercial fruit waxes, dicloran, and cold-storage conditions. **Plant Disease**, St. Paul, v.70, n.6, p.587-590, 1986.

PRATES, H.S., SOUZA PINTO, W.B., MATOS, M.A.N. Ocorrência da doença queda prematura de frutos (*Colletotrichum gloeosporioides*, Penz.) em citros, no Estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v.19, n.1, p.46, 1993.

ROBERTO, S.R.; BORGES, A.V. Efeito do estágio de desenvolvimento das flores e da aplicação de fungicidas no controle da podridão floral dos citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 2, p. 306-309, 2001.

ROSSETTI, V.; CARVALHO, M.L.V.; VECHIATO, M.H.; BATISTA, F.A.S. Estudos sobre a queda prematura de frutos cítricos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 6, 1981, Recife. **Anais...** Recife: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1981. p. 641-654.

SONODA, R.M., GUO, Z. Effect os spray applications of *Bacillus subtilis* on postbloom drop of citrus. **Phytopathology**, St. Paul, v.86, p.S52, 1996. Supplement.

SOUZA FILHO, B.F. de; BATISTA, F.A.S.; EMIDIO FILHO, J.; TRINDADE, J. Controle químico da mancha aureolada e da queda

dos frutos jovens em citros. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 5, 1979, Pelotas. Anais... Pelotas: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1979. p. 216-220.

TIMMER, L.W. Postbloom fruit drop of citrus – symptoms, disease cycle and control. Proceedings of the Florida State Horticulture Society, Winter Haven, v. 106, p. 102-105, 1993.

TIMMER, L.W.; ZITKO, S.E. Aerial applications of fungicide for control of postbloom fruit drop. **Citrus Industry**, Bartow, v. 73, p. 26-27, 1991.

TIMMER, L.W.; ZITKO, S.E. Timing of fungicide applications for control of postbloom fruit drop citrus in Florida. **Plant Disease**, St. Paul, v. 76, n. 8, p.820-823, 1992.

TIMMER, L.W., AGOSTINI, J.P., ZITKO, S.E., S.E., ZULFIQAR, M. Postbloom fruit drop, and increasingly prevalent disease of citrus in the Americas. **Plant Disease**, St. Paul, v.78, n.4, p.329-334, 1994.

TIMMER, L.W., ZITKO, S.E. Timing of Fungicides Applications for Control of Postbloom Fruit Drop of Citrus in Florida. **Plant Disease**, St. Paul, v.80, p.380-383, 1996.

ZULFIQAR, M.; BRLANSKY, R.H.; TIMMER, L.W. Infection of flower and vegetative tissues of citrus by *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides*. **Mycologia**, Lawrence, v. 88, n. 1, p. 121-128, 1996.