



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

**DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES DE *Bacillus subtilis* PARA
CONTROLE DA PODRIDÃO FLORAL EM CITROS**

MARIANA NADJARA KLEIN

**Araras
2012**



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

**DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES DE *Bacillus subtilis* PARA
CONTROLE DA PODRIDÃO FLORAL EM CITROS**

MARIANA NADJARA KLEIN

ORIENTADORA: PROF^o. Dra. KATIA CRISTINA KUPPER

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

Araras

2012

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

K64df

Klein, Mariana Nadjara.

Desenvolvimento de formulações de *Bacillus subtilis* para controle da podridão floral em citros / Mariana Nadjara Klein. -- São Carlos : UFSCar, 2012.
64 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2012.

1. Controle biológico. 2. Veículos de transporte. 3. Aditivos. 4. *Colletotrichum acutatum*. I. Título.

CDD: 632.96 (20ª)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
DE

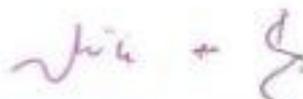
MARIANA NADJARA KLEIN

APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
AGROECOLOGIA E DESENVOLVIMENTO RURAL, DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DE SÃO CARLOS, EM 31 DE JULHO DE 2012.

BANCA EXAMINADORA:



KATIA CRISTINA KUPPER
PPGADR/UFSCAR



ANTONIO DE GOES
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"



ANTONIO CARLOS MONTEIRO
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"

Dedico

À minha linda família,
principalmente para minha mãe maravilhosa, Eliana
e meu pai, Paulo.

Às minhas queridas irmãs Paula e Ana Clara que amo tanto.

Ao meu amor e amigo, Rodrigo Masetto.

Obrigada por vocês existirem. Amo vocês do fundo do meu coração!

HOMENAGEM

À Profa. Dra. Katia Cristina Kupper, orientadora desta dissertação, por todo empenho, sabedoria, compreensão e, acima de tudo, exigência. Gostaria de ratificar a sua competência, participação com discussões, correções e sugestões, que fizeram com que concluíssemos este trabalho da melhor maneira possível. Sua conduta sempre foi digna da minha admiração durante esses anos de convívio.

Obrigada!

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer a todas as pessoas que se fizeram presentes, que torceram por mim e que me ajudaram intelectual e/ou emocionalmente. Agradecer é sempre difícil, pois posso cometer injustiças esquecendo pessoas que me ajudaram, do que fazer jus a todas que merecem;

- À Deus por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar os caminhos nas horas incertas;

- Meus familiares merecem poucas palavras de gratidão, porém, as que me são mais caras. Obrigada por depositarem em mim a confiança para todas as horas. Sei que vocês se orgulham, mas este orgulho que sentem por mim converto numa obrigação de a cada dia ser mais digna de representá-los;

- À Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (Processo n. 2009/12854-9) pela bolsa de mestrado concedida, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq - (Edital Universal – Proc. n. 471065/2011-0) pelo apoio financeiro, que foi fundamental para o desenvolvimento do trabalho;

- Ao Centro de Citricultura Sylvio Moreira pela oportunidade de estágio e desenvolvimento do projeto;

- A equipe do Laboratório de Fitopatologia e Controle Biológico (Marcos, Tati, Gilmar, Eleonore, Maria, Jessica, Pitt) pela colaboração no desenvolvimento do projeto e pelo convívio diário, principalmente a minha super amiga para todas as horas, Aline. Aos amigos do Centro de Citricultura Lilian, Camilla, Evandro, Dani e a todos os funcionários;

- A todos os meus amigos e amigas que eu (re)encontrei na Pós-graduação e aos dedicados professores. À secretária Claudia pelo seu entusiasmo e otimismo contagiante, sendo uma profissional extremamente competente e dedicada, e que se transformou numa amiga que quero ter pra sempre;

- Aos professores Antonio de Goes e Antonio Carlos Monteiro, da Universidade Estadual “Julio de Mesquita Filho”, campus de Jaboticabal, pelas sugestões feitas na banca de defesa.

A todos o meu “Muito Obrigada!”

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades

Lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas

de que parecia impossível”

Charles Chaplin

SUMÁRIO

	Pág.
ÍNDICE DE TABELAS.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ii
RESUMO.....	lv
ABSTRACT.....	Vi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	4
2.1. Ocorrência e importância da doença.....	4
2.2. Sintomas.....	4
2.3. Agente causal.....	6
2.4. Epidemiologia.....	9
2.5. Controle convencional.....	12
2.6. Controle Biológico utilizando <i>Bacillus subtilis</i>	14
2.7. Formulações de produtos biológicos.....	16
2.8. Controle Biológico na Agroecologia.....	18
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1. Micro-organismos.....	22
3.2. Efeito da adição de compostos nitrogenados e elementos traços sobre a atividade antagônica de metabólitos produzidos por <i>Bacillus subtilis</i> a <i>Colletotrichum acutatum</i>	22
3.3. Efeito da combinação de uma fonte de nitrogênio e de um elemento traço, em diferentes concentrações, sobre a atividade antagônica de metabólitos produzidos por <i>Bacillus subtilis</i> a	

<i>Colletotrichum acutatum</i>	24
3.4. Preparo do caldo bacteriano.....	25
3.5. Formulações à base de <i>Bacillus subtilis</i>	25
3.6. Eficiência <i>in vitro</i> das formulações, com ou sem aditivos, no controle de <i>Colletotrichum acutatum</i>	26
3.6.1. Eficiência de formulações à base de <i>Bacillus subtilis</i> , na inibição do crescimento micelial de <i>Colletotrichum acutatum</i>	26
3.6.2. Eficiência de formulações a base de <i>Bacillus subtilis</i> , na inibição da germinação de conídios de <i>Colletotrichum acutatum</i>	27
3.7. Eficiência <i>in vivo</i> das formulações, com ou sem aditivos, no controle de <i>Colletotrichum acutatum</i>	29
3.7.1. Controle da podridão floral dos citros, por meio de produto formulado a base de <i>Bacillus subtilis</i> , em flores destacadas.....	29
3.7.2. Controle da podridão floral dos citros, por meio de produto formulado a base de <i>Bacillus subtilis</i> , sob condições de campo.....	29
4. RESULTADOS	32
4.1. Efeito da adição de compostos nitrogenados e elementos traços sobre a atividade antagônica de metabólitos produzidos por <i>Bacillus subtilis</i> a <i>Colletotrichum acutatum</i>	32
4.2. Efeito da combinação de uma fonte de nitrogênio e de um elemento traço, em diferentes concentrações, sobre a atividade antagônica de metabólitos produzidos por <i>Bacillus subtilis</i> a <i>Colletotrichum acutatum</i>	35
4.3. Eficiência <i>in vitro</i> das formulações, com ou sem aditivos, no controle de <i>Colletotrichum acutatum</i>	38

4.3.1. Eficiência de formulações à base de <i>Bacillus subtilis</i> , no crescimento micelial de <i>Colletotrichum acutatum</i>	38
4.3.2. Efeito do produto formulado à base de <i>Bacillus subtilis</i> , na germinação de conídios de <i>C. acutatum</i>	40
4.4. Eficiência <i>in vivo</i> das formulações, com ou sem aditivos, no controle de <i>Colletotrichum acutatum</i>	42
4.4.1 Controle da podridão floral dos citros por meio de produto formulado a base de <i>Bacillus subtilis</i> , em flores destacadas de citros.....	42
4.4.2. Controle da podridão floral dos citros por meio de produto formulado a base de <i>Bacillus subtilis</i> , sob condições de campo.....	43
5. DISCUSSÃO	48
6. CONCLUSÕES	53
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

ÍNDICE DE TABELAS

Pág.

Tabela 1: Efeito de uma fonte de nitrogênio (uréia) e um elemento traço (molibdato de amônio), em diferentes concentrações, sozinhos ou em combinação, na inibição do crescimento micelial de <i>Colletotrichum acutatum</i>	37
Tabela 2: Efeito de uma fonte de nitrogênio (uréia) e um elemento traço (molibdato de amônio), em diferentes concentrações, sozinhos ou em combinação, na inibição do crescimento micelial de <i>Colletotrichum acutatum</i>	39
Tabela 3: Efeito dos produtos formulados, com ou sem aditivo, na porcentagem de flores sem infecção por <i>Colletotrichum acutatum</i> e no número médio de frutos efetivos, em plantas de lima ácida 'Tahiti', no município de Estiva Gerbi, SP. (Safrá 2011/2012).....	46

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pag.
<p>Figura 1: Sintomas da podridão floral dos citros. A) Flores sintomáticas, com lesões necróticas de cor alaranjada B) Queda precoce dos frutos, deixando o cálice retido.....</p>	6
<p>Figura 2: Estágios de florescimento de flores cítricas, nas aplicações dos produtos formulados a base de <i>B. subtilis</i>. A) cabeça de fósforo B) cotonete e C) flor aberta.....</p>	31
<p>Figura 3: Efeito de diferentes concentrações de elementos nitrogenados na atividade antagônica de <i>Bacillus subtilis</i>, sobre o crescimento micelial de <i>Colletotrichum acutatum</i>. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0.05$).....</p>	33
<p>Figura 4: Efeito de diferentes concentrações de elementos traços na atividade antagônica de <i>Bacillus subtilis</i>, sobre o crescimento micelial de <i>Colletotrichum acutatum</i>. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0.05$).....</p>	34
<p>Figura 5: Efeito de diferentes concentrações de elementos traços e de fontes de nitrogênio, sobre o crescimento do peso seco micelial (g) de <i>Colletotrichum acutatum</i>. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0.05$).....</p>	35
<p>Figura 6: A) Efeito do produto formulado a base de <i>Bacillus subtilis</i>, com talco como veículo de transporte, acrescido de uréia (0,02%) sobre a inibição do crescimento micelial de <i>Colletotrichum acutatum</i> em teste de cultivo pareado, B) Testemunha (fitopatógeno sem pareamento com</p>	

o produto formulado.....	40
Figura 7. Efeito do produto formulado à base de <i>Bacillus subtilis</i> , tendo como veículo de transporte o talco, com ou sem aditivos (uréia a 0,02% e molibdato de amônio a 1 mM) em diferentes concentrações, na germinação de conídios de <i>Colletotrichum acutatum</i> , após 16 horas de incubação. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0.05$).....	41
Figura 8: Porcentagem de flores destacadas de laranja ‘Valência’, sem sintomas de podridão floral, tratadas com produtos formulados à base de <i>Bacillus subtilis</i> , com ou sem aditivos, 24 horas antes (preventivo) e 24 horas após (curativo) a inoculação com <i>Colletotrichum acutatum</i> . Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0.05$).....	43
Figura 9: Plantas de lima ácida ‘Tahiti’. A) Tratamento com produto formulado a base de <i>Bacillus subtilis</i> , tendo talco como veículo de transporte e uréia (0,02%) como aditivo. B) Testemunha sem nenhum tratamento.....	47

DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES DE *Bacillus subtilis* PARA O CONTROLE DA PODRIDÃO FLORAL DOS CITROS

Autor: MARIANA NADJARA KLEIN

Orientadora: Profa. Dra. KATIA CRISTINA KUPPER

RESUMO

O Brasil é o maior produtor mundial de laranja, assentado em uma área de 839 mil hectares, dos quais 77% encontram-se localizados na região sudeste do país. Não obstante a importância dessa cultura, o setor citrícola enfrenta sérios problemas representados por doenças fúngicas que diminuem a produtividade, como a podridão floral dos citros (PFC), causada pelo fungo *Colletotrichum acutatum*. A medida predominante de controle é a pulverização com defensivos químicos. Considerando os custos financeiros, prejuízos ambientais e de saúde pública envolvidos nestas aplicações, faz-se necessário o estudo de novas alternativas de controle e, dentre estas, o controle biológico. Portanto este trabalho teve por objetivo desenvolver uma formulação de *Bacillus subtilis*, usando diferentes veículos de transportes, com ou sem aditivos, visando o controle da PFC. Os resultados dos testes *in vitro* mostraram que o talco + uréia (0,02%) inibiram, tanto o crescimento micelial, quanto a germinação de *C. acutatum*. Os aditivos uréia (0,02%) e molibdato de amônio (1mM) otimizaram a formulação, quando a mesma foi testada em flores destacadas. Resultados de controle, sob condições de campo, revelaram que *B. subtilis* formulado em talco + uréia (0,02%) proporcionou 72,7% de flores sem infecção pelo fitopatógeno e 56,4% de número médio de frutos efetivos (NMFE); por outro lado, no tratamento testemunha obteve 8,8% de flores sadias e 0,83% de

NMFE, o tratamento químico (tiofanato metílico) apresentou 69,6% de flores sadias e 46,7% de NMFE. Conclui-se que, a formulação à base de *B. subtilis*, tendo o talco como veículo de transporte, acrescido do aditivo uréia (0,02%) é eficiente na manutenção da viabilidade das células bacterianas para o controle da doença.

Palavras-chaves: aditivos, veículos de transporte, controle biológico, *Colletotrichum acutatum*.

DEVELOPMENT OF FORMULATIONS OF *Bacillus subtilis* FOR THE CONTROL OF CITRUS POST-BLOOM FRUIT DROP

Author: MARIANA NADJARA KLEIN

Adviser: Prof. Dra. KATIA CRISTINA KUPPER

ABSTRACT

Brazil is the world's largest producer of orange, seated in an area of 839.000 hectares, of which 77% are located in the southeast. Despite the importance of this crop, the citrus industry faces serious problems represented by fungal diseases that reduce productivity such as citrus post-bloom fruit drop (PDF), caused by *Colletotrichum acutatum*. As control is predominant spraying chemicals. Considering the financial costs, environmental damage and public health of these applications, it is necessary to study new control alternatives, and among these, the biological control. Therefore this study aimed to develop a formulation of *Bacillus subtilis*, based different transport vehicles, with or without additives, aiming to control the PDF. The results showed that the powder as a vehicle for transport, provided a greater viability of bacterial cells stored in the two temperatures tested (1 and 22 ° C) for a period of 12 months. In vitro tests showed that the powder plus urea (0.02%) inhibited both the mycelial growth, as the germination of *C. acutatum*. The additives urea (0.02%) and ammonium molybdate (1mM) optimized the formulation, when tested in the same flower deployed. Control data under field conditions, showed that *B. subtilis* in powder plus urea (0.02%) yielded 72.7% of flowers without infection by the pathogen and 56.4% of the average number of effective fruits (ANEF)

and on the other hand, the control treatment was obtained 8.8% flowers and 0.83% of healthy ANEF, chemical treatment (thiophanate-methyl) showed 69.6% of healthy flowers and 46.7% ANEF. It is concluded that, based formulation *B. subtilis*, with talc as a transport vehicle, plus an additive (urea 0.02%) kept the viability of bacteria cells and was effective in the controlling of disease.

Keywords: additives, transport vehicles, biological control, *Colletotrichum acutatum*.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de laranja, respondendo por cerca de 30% da produção da fruta, 50% da produção de suco, com participação de 85% do suco comercializado internacionalmente (NEVES, 2010). A cultura está assentada em uma área aproximada de 839 mil hectares, dos quais 77% encontram-se localizados na região sudeste do país, especialmente no Estado de São Paulo. Em torno de 80% da produção de laranja desse estado é destinada à industrialização, cujo suco produzido é exportado para países como Rússia, Bélgica, Países Baixos, Estados Unidos e Japão, sendo os 20% restantes destinados ao consumo *in natura*, tanto para mercado interno como para exportação (AGRIANUAL, 2011).

Não obstante a importância que a atividade citrícola tem para a economia nacional, os pomares são acometidos por uma série de pragas e doenças que são responsáveis por reduções consideráveis na produtividade e na qualidade das frutas, tornando-se, em muitos casos, fatores limitantes ao processo de produção. Dentre as doenças, pode-se destacar a Podridão Floral dos Citros (PFC) causada pelo fungo *Colletotrichum acutatum* Simmonds.

A medida predominante de controle da PFC é a pulverização com produtos químicos na época de florada. Atualmente, os fungicidas registrados para controle de *C. acutatum* são os pertencentes aos grupos químicos dos fungicidas benzimidazóis (carbendazim e tiofanato metílico), triazóis (difenoconazole e tebuconazole), dicarboximida (folpet) e misturas formuladas (estrobilurinas + triazol; oxazolidinadiona + ditiocarbamato) (BRASIL, 2009).

A preocupação da sociedade em relação ao uso excessivo de produtos químicos na agricultura, os quais têm provocado contaminações na cadeia alimentar e em lençóis freáticos, aliado às crescentes restrições quanto à presença de resíduos de agrotóxicos em frutas cítricas, tem levado os pesquisadores em busca de alternativas de controle e, dentre essas, o controle biológico.

Dentre os antagonistas mais estudados, a bactéria *Bacillus subtilis* vem se destacando no controle de doenças do filoplano (BETTIOL et al, 1994; SONODA & GUO, 1996; KALITA et al., 1996; KUPPER et al., 2003, 2009, 2012).

Kupper e Gimenes-Fernandes (2002) estudaram a potencialidade antagonística de 64 isolados de *B. subtilis* a *C. acutatum*, agente causal da podridão floral dos citros (PFC), *in vitro* e em flores destacadas de lima ácida 'Tahiti'. Segundo os autores, todos os isolados produziram metabólitos capazes de inibir o crescimento micelial do fitopatógeno e muitos deles deram 100% de controle da doença. Dentre sete isolados de *B. subtilis* testados para o controle da doença, em condições de campo, um deles, o ACB-69, diferiu da testemunha (sem controle) e equivaleu-se, estatisticamente, ao fungicida benomil, proporcionando menor porcentagem de flores com sintomas e maior número médio de frutos efetivos (KUPPER et al., 2003).

No entanto, o uso de *B. subtilis* para o controle de doenças de plantas em condições de campo depende de alguns fatores, como por exemplo, do desenvolvimento de formulações comerciais, nas quais a bactéria possa

sobreviver por longos períodos, que sejam eficientes e mantenham a atividade antagônica, quando da interação patógeno-antagonista.

O sucesso das formulações depende da adequação dos materiais a serem utilizados no processo. Há muitos estudos descritos na literatura visando otimizar a formulação de um agente de biocontrole, como a utilização do melhor veículo de transporte do micro-organismo, o qual poderá proporcionar condições favoráveis para a bactéria, sustentando sua sobrevivência e melhorando a atividade antagônica durante o controle biológico (SCHMIDT et al., 2001; WIYONO et al., 2008). Outros estudos dizem respeito à incorporação de aditivos na formulação, o qual poderá contribuir para a eficácia do antagonista. No entanto, cuidados devem ser tomados de forma que os mesmos não favoreçam o patógeno ou causem qualquer dano à planta hospedeira (VIDHYASEKARAN et al., 1997; AMER & UTKHEDE, 2000; ALÍ et al., 2001).

Diante do exposto, este trabalho teve por objetivo desenvolver uma formulação à base de um isolado de *B. subtilis*, previamente reconhecido como eficiente no controle biológico da podridão floral dos citros, usando diferentes veículos de transporte, com ou sem aditivos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Ocorrência e importância da doença

A podridão floral dos citros (PFC), também conhecida como queda prematura dos frutos cítricos (QPFC), causada pelo fungo *Colletotrichum acutatum* Simmonds, ocorre nos trópicos e subtropicais úmidos das Américas. 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 (GOES & KUPPER, 2002). Condições que propiciam mais de uma florada, ou variedades que floresçam mais de uma vez por ano, favorecem a ocorrência da doença. Assim, no Brasil, a doença é mais severa nos limões verdadeiros, em lima ácida 'Tahiti', no limão 'Galego' e na laranja 'Pêra' (FEICHTENBERGER, 1991).

2.2. Sintomas

A doença aparece primeiro como lesões necróticas de coloração marrom, pêssego ou alaranjada sobre as pétalas de flores abertas. Embora as pétalas de flores abertas sejam mais suscetíveis à infecção, em ataques severos as lesões podem ocorrer em botões florais fechados ou do tamanho da cabeça de um alfinete (TIMMER et al., 1994). Sobre as lesões das pétalas formam-se frutificações do fungo (acérvulos), de coloração salmão rosa. Quando as condições ambientais são favoráveis, as lesões se desenvolvem rapidamente, comprometendo todos os tecidos das pétalas. As pétalas

afetadas permanecem firmemente aderidas ao disco basal, adquirem consistência rígida e seca e coloração rosa pardo. 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. Os cálices retidos continuam a crescer, tomando o aspecto final de estruturas dilatadas, que comumente recebem o nome de “estrelas” ou “estrelinhas” (FAGAN, 1984; FEICHTENBERGER, 1991; AGOSTINI & TIMMER, 1992).

Essas estruturas podem permanecer na planta por vários anos. Geralmente, os ramos que apresentam muitas dessas estruturas não florescem naquela estação, ou suas floradas seguintes são muito prejudicadas. Muitas vezes, os frutos jovens originados de flores infectadas não caem logo após o florescimento. Isto é mais frequente quando as infecções ocorrem durante ou logo após a abertura das flores. Os frutos, nesse caso, têm seu crescimento paralisado, permanecendo pequenos, menores que 1 cm de diâmetro, e geralmente se apresentam deformados (FEICHTENBERGER, 1991).



Figura 1: Sintomas da podridão floral dos citros. A) Flores sintomáticas, com lesões necróticas de cor alaranjada B) Queda precoce dos frutos, deixando o cálice retido.

2.3. Agente causal

Fagan (1979) foi o primeiro pesquisador a demonstrar que o agente causal da doença era o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. Demonstrou, ainda, que somente os isolados obtidos das pétalas provocavam a doença.

Agostini e Timmer (1992) descreveram três linhagens de *C. gloeosporioides* presentes em pomares cítricos da Flórida (USA). 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, produziam abundantes setas e formavam apressórios lobulados. A linhagem associada à podridão floral dos citros 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 do limão ‘Galego’, semelhante à SGO quanto ao tipo e crescimento da colônia e dos conídios, porém com apressórios menores e arredondados.

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

Posteriormente, Goes e Kimati (1997 a/b), ao trabalharem com isolados de várias regiões do Brasil, constataram a existência das mesmas três linhagens constatadas por Agostini e Timmer (1992) na Flórida, verificando inclusive diferenças morfológicas. Quanto às características patogênicas, os autores verificaram sintomas típicos da PFC apenas em plantas onde foram inoculados isolados dos grupos SGO e KLA, excluindo, portanto, a participação

de isolados do grupo FGG. Goes e Kimati (1998) verificaram, ainda, que a linhagem FGG é totalmente inibida por benomil na concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$ em meio de cultura, enquanto que as linhagens SGO e KLA se comportaram como insensíveis, havendo crescimento micelial a 2500 $\mu\text{g/mL}$. Observaram, ainda, que as linhagens SGO e KLA têm, inclusive, sua esporulação aumentada quando cultivadas em BDA acrescido de benomil a 10 $\mu\text{g/mL}$. 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 $\mu\text{g/mL}$ de benomil 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 podridão floral dos citros das estirpes saprófitas que se reproduzem sobre tecidos mortos ou senescentes. Agostini e 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 (Batata-Dextrose-Ágar), 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.

Lima et al. (2011) ao estudarem isolados de *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*, descobriram, ao testarem e compararem quanto a

patogenicidade entre eles através de técnicas moleculares, assim como o desenvolvimento da doença a partir de flores sintomáticas de podridão floral obtidas em diferentes regiões do estado de São Paulo, que ambas as espécies causaram sintomas típicos de podridão floral, ou seja, queda precoce dos frutos e cálices retidos. *C. gloesporioides*, que até então era conhecido como agente causal da doença de pós-colheita em citros, antracnose, agora foi descoberto também como agente causal da podridão floral dos citros.

2.4. Epidemiologia

O fungo *C. acutatum* apresenta formas diversificadas quanto à sua sobrevivência. Denham e Waller (1981) sugeriram que o fungo persistia na forma de conídios sobre a superfície das folhas ou em infecções latentes. No entanto, segundo Agostini e Timmer (1994), a sobrevivência seria na forma de apressórios nas folhas das plantas ou em cálices remanescentes do ano anterior. Exsudatos das primeiras flores ou de floradas extemporâneas, trazidos pelo escoamento 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 o estágio de botão floral (6 - 8 mm de diâmetro) até a queda de pétalas (FAGAN, 1979).

Quando na ausência de flores, o ciclo reinicia na sobrevivência em flores, cálices retidos e ramos (TIMMER et al., 1994; ZULFIQAR et al., 1996). Aparentemente, apressórios da forma SGO perdem a viabilidade com o tempo, ocorre um declínio gradual de algumas populações desta forma com a ausência de flores (AGOSTINI & TIMMER, 1992). Então, *C. acutatum* comporta-se em citros como necrotrófico durante o curto período de florescimento, no entanto, por muitos anos, o fungo pode viver biotroficamente na forma de apressórios, como infecções quiescentes em tecidos vegetais (AGOSTINI & TIMMER, 1994; ZULFIQAR et al., 1996; PERES et al., 2005).

Condições que propiciam mais de uma florada, ou variedades que florescem 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', no limão 'Galego' e na laranja 'Pêra', pois estas espécies 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 cultivar 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 inóculo para flores sadias, pelo impacto das gotas de chuva, é que irá determinar a incidência da doença (TIMMER et al., 1994).

Timmer e 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. Os autores verificaram alta correlação entre a porcentagem de flores doentes observadas e as previstas pelo modelo matemático, justificando, portanto, a aplicação de produtos. Para o desenvolvimento do modelo, verificaram maior importância da presença e dispersão do inóculo pela chuva, do que, propriamente, as condições para a infecção, como temperatura e umidade foliar, considerados fatores importantes em outros sistemas de previsão.

Peres et al. (2005) ao estudarem o estilo de vida de *C. acutatum* afirmaram que a podridão floral é a única doença causada pelo fitopatógeno, onde os sintomas são induzidos por hormônios vegetais. Seu inóculo pode se espalhar numa grande área em uma única florada. Em citros, a quantidade de inóculo e fatores ambientais servem como modelo para prever a doença e aplicar os defensivos químicos, podendo assim, reduzir a incidência da doença, aumentar a produção de frutos e eliminar aplicações desnecessárias de fungicidas.

2.5. Controle convencional

A medida predominante de controle é a pulverização com produtos químicos na época da florada. Atualmente, os fungicidas registrados para controle de *C. acutatum* são os pertencentes aos grupos químicos dos fungicidas benzimidazóis (carbendazim e tiofanato metílico), triazóis (difenoconazole e tebuconazole), dicarboximida (folpet) e misturas formuladas (estrobilurinas + triazol; oxazolidinadiona + ditiocarbamato) (BRASIL, 2009).

Uma das dificuldades de se controlar eficientemente esse patógeno por pulverizações com produtos químicos é devido aos longos períodos de chuva ou umidade elevada, que por ocasião do pico de florescimento demonstram maior severidade da doença (DENHAM & WALLER, 1981). Isso faz com que seja mais difícil efetuar as aplicações, além do que, os produtos são mais facilmente lavados. Outra dificuldade é a ocorrência de várias floradas o que exige maior número de pulverizações, onerando sobremaneira o custo de produção, podendo trazer consequências ambientais indesejáveis, além de aumentar o desequilíbrio biológico do pomar. Talvez o fator mais crítico no controle da podridão floral dos citros, a baixo custo, seja decidir quando aplicar o produto, uma vez que, pulverizações preventivas, embora possam ser efetivas, são onerosas, podendo inclusive não aumentar a produção, caso a ocorrência da doença seja baixa (TIMMER et al., 1994).

Os fungicidas de ação sistêmica apresentam maior especificidade. Os benzimidazóis, por exemplo, afetam especificamente a divisão celular, pois

apresentam atividade seletiva para a tubulina de fungos, e ligam-se a essa proteína, impedindo que ocorra a polimerização dos microtúbulos formadores do fuso mitótico (WHEELER et al., 1995). Tal especificidade dos benzimidazóis faz com que esse fungicida apresente alto risco de resistência adquirida pelo patógeno. A alta pressão de seleção causada pelo uso intensivo dos benzimidazóis pode resultar na seleção de isolados resistentes em um curto prazo. Além disso, no caso específico do carbendazin, substância permitida na União Européia e no Brasil para controle de doenças há mais de 20 anos, tem ocasionado problemas devido aos resíduos do produto encontrados no suco brasileiro é exportado para os Estados Unidos, onde tal substância é proibida. Considerando que o suco brasileiro corresponde a quase metade do total de suco consumido neste país, tal proibição representa forte impacto negativo para a economia nacional (AGRIANUAL, 2011).

Adicionalmente, o uso indiscriminado de produtos químicos na lavoura tem levado à contaminação do meio ambiente e maior exposição humana aos diferentes agrotóxicos, ocasionando um grave problema de saúde pública em todo o mundo, principalmente nos países em desenvolvimento (KONRADSEN et al., 2003; OLIVEIRA & FERREIRA, 2012).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que, anualmente, em torno de três milhões de pessoas sofrem intoxicações agudas decorrentes da exposição aos agrotóxicos, gerando cerca de 220 mil mortes ao ano (PIRES et al., 2005). Por outro lado, em termos econômicos, o setor agropecuário é responsável por uma fatia expressiva do Produto Interno

Bruto (PIB) brasileiro (IBGE, 2010). Em 2008, a atividade agropecuária foi a principal causa do aumento do PIB em relação a anos anteriores. Como consequência, o Brasil conquistou o posto de maior consumidor mundial de agrotóxicos (ANVISA, 2009; MELO et al., 2012). Porém, esse indicador econômico não acompanha os indicadores sociais, de saúde pública, de vida dos trabalhadores rurais e no de degradações ambientais.

2.6. Controle Biológico utilizando *Bacillus subtilis*

Muitos estudos têm sido feitos com a utilização de bactérias antagonicas a determinados fitopatógenos para o controle de muitas doenças foliares. A habilidade de bactérias formadoras de esporos (*Bacillus* spp.) permanecerem metabolicamente dormentes por longos períodos, resulta na sua persistência sobre a superfície foliar, possibilitando a sua sobrevivência em períodos secos, em temperaturas extremas e nas deficiências temporárias de nutrientes. Dessa maneira, várias linhagens bacterianas têm sido promissoras como agentes de controle biológico de doenças de plantas (KNUDSEN & SPURR, 1986).

B. subtilis, uma bactéria encontrada no filoplano, vem merecendo estudos para controle de patógenos desse ambiente. Estudos foram conduzidos em condições de campo, em três pomares de laranja 'Natal', na Flórida, para determinar a eficiência de *B. subtilis* Kodiak[®] na redução da PFC. Poucas flores foram infectadas e poucos cálices ficaram retidos em árvores protegidas com a bactéria, quando comparado ao controle, além do que o

“pegamento” das flores foi maior em plantas inoculadas com *B. subtilis* (SONODA & GUO, 1996).

No Brasil, Kupper e 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, todos os isolados produziram metabólitos capazes de inibir o crescimento micelial do fitopatógeno e muitos deles deram 100% de controle da doença em flores destacadas de lima ácida ‘Tahiti’. Dentre sete isolados de *B. subtilis* testados para o controle da podridão floral dos citros, em condições naturais de ocorrência da doença, um deles, o ACB-69, diferiu da testemunha (sem controle) e equiparou-se, estatisticamente, ao fungicida benomil, proporcionando menor porcentagem de flores com sintomas e maior número médio de frutos efetivos (KUPPER et al., 2003).

Kupper et al. (2004) ao estudarem quatro isolados de *B. subtilis* (ACB-69, ACB-AP3, ACB-72 e ACB-77) para controle de *Guignardia citricarpa*, verificaram que os mesmos foram capazes de inibir o crescimento micelial do fungo, quando em cultura pareada em placa de Petri, contendo batata-dextrose-ágar (BDA). Dentre tais isolados, ACB-69 apresentou potencialidade para controle da mancha preta dos frutos cítricos, sob condições de campo (KUPPER et al., 2011)

Kupper et al. (2009) em estudos visando avaliar a eficiência de diferentes isolados de *B. subtilis* para o controle da podridão floral, descobriram que o isolado ACB-69 não foi tão eficiente na inibição da germinação conidial de *C. acutatum* quando utilizaram células bacterianas, porém, quando

utilizaram metabólitos termoestáveis produzidos pelo isolado, obtiveram aproximadamente 75% de inibição na germinação do patógeno. No mesmo estudo, os autores descobriram que o ACB-69 conseguiu suprimir a produção de sintomas em flores de lima-ácida 'Tahiti' destacadas e propiciou maior produtividade de frutos cítricos.

2.7 Formulações de produtos biológicos

A evolução do controle biológico tem esbarrado em problemas com a fabricação de produtos formulados a base de um micro-organismo, como sua produção em larga escala e a viabilidade do seu uso sob condições práticas. (MORETINI, 2005, LOPES, 2009).

De acordo com a descrição feita por Medugno (1995), uma formulação é definida como a mistura física de um ou mais princípios ativos com ingredientes inertes que, no presente contexto, promovem o controle de pragas e doenças de forma econômica. Dentre as várias substâncias que têm sido utilizadas em formulações experimentais incluem-se a lactose, peptona, goma arábica, xantana, celulose, alginato de potássio, alginato de sódio, talco, caulim, vermiculita, terra de diatomácea, entre outras (SCHISLER et al., 2004; MORETINI & MELO, 2007; ÖZAKTAN & BORA, 2004; ARAÚJO, 2008).

A formulação a partir de compostos biológicos pode ser definida como um processo de transformação de um agente de controle biológico em um produto que possa ser aplicado em termos práticos e de forma efetiva, seguindo características semelhantes as dos produtos químicos, como boa estabilidade no armazenamento, ação rápida e de forma econômica sobre o

alvo, com o diferencial de ser um produto seguro, não prejudicando o aplicador, o consumidor e o meio ambiente (MEDUGNO, 1995).

Bashan (1998) considera alguns fatores de extrema importância para evidenciar a qualidade de uma formulação: (i) as características químicas e físicas dos veículos de transporte a serem utilizados, de forma que o material deverá ser estéril; (ii) liberação, sob condições de campo, de uma quantidade homogênea de células viáveis; (iii) possuir qualidades industriais a fim de ser manufaturado; (iv) permitir adição de nutrientes de acordo com as exigências do micro-organismo; (v) ser economicamente viável; (vi) ser de fácil aplicação e manuseio pelo produtor rural, onde o mesmo deverá ter condições de aplicar o bioproduto utilizando equipamento já existente na propriedade; (vii) ser ecologicamente correto, ou seja, não ser tóxico, (viii) ser biodegradável e não poluente, (ix) possuir período de armazenamento elevado, entre outras.

Para o sucesso no controle, deve-se considerar o tipo de formulação a aplicar, os adjuvantes ou veículos de transporte a serem empregados, levando-se em consideração as necessidades biológicas do antagonista a ser utilizado na formulação, a compatibilidade dos produtos, quando aplicados em mistura, e, o número sucessivo de aplicações necessárias durante o ciclo vegetativo da cultura. Diversos estudos têm comprovado que excelentes agentes de controle podem se tornar ineficazes se a estratégia de controle não considerar suas necessidades como aspectos importantes, danificando seu desempenho sob condições naturais de campo (MELO-SANTOS, 2001).

Contudo, o desenvolvimento de formulações a base de micro-organismos é ainda uma área pouco explorada no Brasil, principalmente no que se diz respeito ao controle de doenças fúngicas de citros.

2.8. Controle Biológico na Agroecologia

Para que a agricultura possa ser considerada sustentável, o sistema deve visar um modelo equilibrado, o qual necessita de várias técnicas inovadoras que, para serem aplicadas, precisam de investimento e desenvolvimento, buscando auxiliar o produtor rural a alcançar a segurança alimentar, a gerar renda a partir de sua produção e a promover a conservação e proteção ambiental (ALTIERI, 2004).

Para Ghini e Bettiol (2000), numa compreensão dos recursos naturais, é preciso fazer um enfoque holístico, respeitando os ciclos, trabalhando com sistemas e considerando que há conectividade entre todos os fatores do processo de produção agrícola. No enfoque temático-analítico, que vem predominando na agricultura tradicional, extraviou-se a visão geral do sistema, resultando num aumento gradativo de problemas relacionados com a proteção de plantas, devido a um manejo inadequado dos elementos naturais.

A proteção de plantas nos métodos convencionais, por meio do uso de defensivos agrícolas, apresenta características extremamente atraentes, como a simplicidade, a previsibilidade e a necessidade de pouco entendimento dos processos básicos do agroecossistema para a sua aplicação (GHINI & BETTIOL, 2000). No entanto, quando se pensa em controle biológico com a utilização de agentes de biocontrole, há a necessidade de um amplo

conhecimento da ecologia do antagonico assim como do patossistema patógeno-planta de modo que a transição do modelo convencional para a adoção de sistemas alternativos, possa ser viável e eficiente, otimizando o entendimento da saúde das plantas (ATHINSON & MCKINLAY, 1995).

Seguindo os princípios da Agroecologia, a superação do problema do ataque de pragas e doenças nas culturas só será alcançada por meio de uma abordagem mais integrada dos sistemas de produção (RICARDO & CAMPANILI, 2005). Por exemplo, conhecer as causas do aparecimento da doença, como problemas estruturais e fertilidade do solo, tentando preveni-la ao invés de erradicá-la.

No sistema de produção agroecológica, o biocontrole introduz um fator decisivo de mortalidade, capaz de fazer com que a população do agente causal da doença não seja prejudicial para a produtividade, ou seja, esse tipo de controle não objetiva reintroduzir toda a complexidade e a diversidade do *habitat* natural, mas sim, introduzir um ou alguns agentes fundamentais que proporcionem mortalidade aos patógenos ou pragas específicas, de forma a encontrar um equilíbrio ecológico natural.

A partir das necessidades da agricultura sustentável, alternativas de controle surgem como modelos avessos ao modelo de produção convencional, buscando não somente corrigir os erros em relação às técnicas utilizadas pela agricultura moderna e o uso demasiado de produtos químicos, mas também, contribuir para os aspectos sociais procurando o equilíbrio da sociedade (PINHEIRO, 2012).

A erradicação absoluta de um patógeno é praticamente impossível. Por isso, reduzir a população do mesmo a uma quantidade não preocupante, permitindo que alguns indivíduos persistam para garantir a sobrevivência dos organismos controladores, seria a medida mais eficaz para o biocontrole. Quando o agroecossistema está em equilíbrio, este tipo de condição acontece porque todas as populações de organismos, na natureza, sofrem restrições que impedem seu crescimento ilimitado. Essas restrições podem acontecer por efeitos independentes do tamanho das populações sobre as quais eles agem, ou seja, fatores independentes da densidade ou, por fatores dependentes da densidade (ALTIERI, 1989).

Sendo assim, é de grande importância adotar métodos agrícolas alternativos para diminuir o uso indiscriminado de defensivos agrícolas. O mais interessante é que haja, no agroecossistema, um equilíbrio entre o agente causal e o antagonista, para que o controle, futuramente, seja natural.

A tecnologia utilizada nos sistemas agroecológicos é multifuncional na medida em que promove efeitos ecológicos positivos, tanto no que se refere à manutenção de bons níveis de produtividade quanto à conservação dos recursos naturais, de forma a garantir a sua sustentabilidade ecológica (PETERSEN, 1999; REIJNTES, 1994).

Portanto, a tecnologia agroecológica nos traz a expectativa de um novo tipo de produção agrícola, que tem a médio e em longo prazo, a capacidade de baixar custos financeiros, diminuir a degradação ambiental e preservar os recursos naturais. No intuito de oferecer alternativas energéticas que não poluam, a Agroecologia é capaz de trazer benefícios aos homens e à natureza,

afastando-nos da orientação dominante de uma agricultura extremamente agressiva ao meio ambiente (CAPORAL & COSTABEBER, 2000; DAROLT, 2002).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Micro-organismos

O isolado ACB-69 de *B. subtilis* foi obtido de folhas de laranja Valência, colhidas do município de Itápolis-SP (KUPPER & GIMENES-FERNANDES, 2002), e o isolado de *C. acutatum* foi obtido a partir de flores exibindo sintomas da podridão floral, coletadas no município de Engenheiro Coelho/SP. Ambos os isolados pertencem à coleção de micro-organismos do laboratório de Fitopatologia e Controle Biológico do Centro de Citricultura “Sylvio Moreira”/IAC, Cordeirópolis/SP.

3.2 Efeito da adição de compostos nitrogenados e elementos traços, sobre a atividade antagônica de metabólitos produzidos por *Bacillus subtilis* a *Colletotrichum acutatum*

Este ensaio teve por objetivo verificar o efeito da adição de compostos nitrogenados e elementos traços em meio de cultura BD (batata-dextrose) inoculado com *B. subtilis*, quanto à inibição do crescimento micelial de *C. acutatum*. Foram utilizados, como fonte de nitrogênio, uréia, sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄) e nitrato de amônio (NH₄NO₃), nas concentrações de 0,02%, 0,1% e 0,5%.

Os elementos traços testados foram ácido bórico (H₃BO₄), sulfato de cobre (CuSO₄.5H₂O), sulfato de manganês (MnSO₄.H₂O), cloreto de cobalto (CoCl₂.12H₂O) e molibdato de amônio (H₂₄Mo₇N₆O₂₄). As concentrações finais dos elementos traços testadas foram: 0,05mM, 0,2 mM e 1 mM, respectivamente.

Seguindo a metodologia descrita por Wiyono et al. (2008), colônias de *B. subtilis* foram cultivadas em 100 mL de batata-dextrose (BD) contidas em frascos de 250 mL de capacidade, juntamente com os respectivos compostos nitrogenados ou elementos traços, e a incubação das culturas se deu a 25°C, sob agitação, por 72 horas. O material foi centrifugado a 4.000 rpm por 20 min. O pH dos sobrenadantes foi ajustado a 6,5 e, em seguida, o filtrado foi esterilizado por meio de um filtro de membrana de celulose (poro com tamanho de 0,22 µm). Os filtrados da cultura (2 mL) foram adicionados a frascos Erlenmeyer com capacidade para 100 mL contendo 18 mL de caldo de batata dextrose (pH 5,5). Em cada frasco foi adicionado um disco da colônia do patógeno + BDA (0,7 cm) de *C. acutatum* (7 dias de idade). As testemunhas foram compostas por um tratamento com BD + antagonista + patógeno (sem aditivo), e outro apenas com BD + patógeno (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), sendo essa pesada após secagem em estufa a 120°C por 1 dia. O experimento foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado com 4 repetições.

Outro experimento foi realizado a fim de estudar o efeito direto dos melhores aditivos (uma fonte de nitrogênio ou um elemento traço) sobre o crescimento de *C. acutatum*, separadamente. Para tal, seguiu-se a mesma metodologia descrita anteriormente, utilizando meio de cultura (BD) + aditivo + disco do fitopatógeno, com o objetivo de verificar a influência dos aditivos no desenvolvimento do fungo.

Os dados foram analisados por análise de variância (ANOVA) usando o software de estatística ASSISTAT 7.6 e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3.3 Efeito da combinação de uma fonte de nitrogênio e de um elemento traço, em diferentes concentrações, sobre a atividade antagônica de metabólitos produzidos por *Bacillus subtilis* a *Colletotrichum acutatum*

Com base nos resultados obtidos em ensaios anteriores (Item 3.2), o efeito da combinação de aditivos (uréia como fonte de nitrogênio e molibdato de amônio como elemento traço) na produção de metabólitos por *B. subtilis* foi testado quanto à sua ação antagônica no crescimento micelial de *C. acutatum*. Para o ensaio foi utilizado a uréia (0,02; 0,1 e 0,5%) e molibdato de amônio (0,05; 0,2 e 1 mM).

Frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio líquido à base de batata-dextrose estéril + aditivo, uréia ou molibdato de amônio, isolados ou em mistura acrescido de um disco de meio com crescimento de *B. subtilis*, foram submetidos à agitação constante, em temperatura ambiente, em incubadora tipo shaker, por 48 horas. Em seguida, os caldos fermentados foram filtrados em papel de filtro estéril e submetidos à filtração em membrana de celulose (poro de 0,22 μm). Posteriormente, amostras de 10 mL de cada filtrado foram transferidas para Erlenmeyers com capacidade para 250 mL, contendo 90 mL de BDA fundente (adaptação da técnica de FRIGHETTO & MELO, 1995).

Obtidos os meios correspondentes a cada tratamento, os mesmos foram vertidos em placas de Petri. Após a solidificação, um disco de meio de cultura (0,7 cm de diâmetro), contendo o fitopatógeno com 8 dias de idade, foi transferido para o centro das placas. As testemunhas foram constituídas de placas de Petri contendo o patógeno nos meios de cultura sem a presença dos metabólitos. As culturas foram incubadas em estufa para BOD a 27°C durante 9 dias e, a avaliação foi efetuada por meio da medição da colônia de *C. acutaum*, em dois sentidos perpendiculares. Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições. Os dados foram analisados por análise de variância (ANOVA) usando o software de estatística ASSISTAT 7.6 e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

3.4 Preparo do caldo bacteriano

O isolado ACB-69 de *B. subtilis*, foi cultivado em meio batata-dextrose (BD) por 48 h, sob agitação constante à temperatura ambiente (22°C). Posteriormente, a suspensão do caldo bacteriano, contendo $1,6 \times 10^8$ células/mL, foi adicionada às formulações para a avaliação da eficiência antagonística, quando da interação patógeno-antagonista.

3.5 Formulação à base de *Bacillus subtilis*

A formulação de *B. subtilis* (ACB-69) foi realizada utilizando-se três veículos de transporte: 1) talco (0,5 g de carboximetilcelulose (CMC) + 50 g de talco (autoclavado a 120°C/30 min) + 50 mL do caldo bacteriano; 2) caulim (0,5 g de CMC + 50 g de pó-de-caulim autoclavado + 50 mL do caldo bacteriano); e;

3) alginato de potássio (0,5 g de CMC + 50 g de alginato de potássio autoclavado + 50 mL do caldo bacteriano).

Com base nos resultados anteriores, os melhores aditivos (uréia como fonte de nitrogênio e molibdato de amônio como elemento traço) foram inseridos nos veículos de formulações, a fim de testá-los com ou sem aditivos.

Portanto, os produtos formulados referem-se ao: 1) talco, 2) talco + uréia 0,02%, 3) talco + molibdato de amônio 1mM, 4) alginato de potássio, 5) alginato de potássio + uréia 0,02%, 6) alginato de potássio + molibdato de amônio 1mM, 7) caulim, 8) caulim + uréia 0,02%, 9) caulim + molibdato de amônio 1mM.

As formulações foram contidas em sacos de polietileno selados, sendo essas armazenadas a 22 °C (Amer e Utkhede, 2000).

3.6 Eficiência *in vitro* das formulações, com ou sem aditivos, no controle de *Colletotrichum acutatum*

3.6.1 Eficiência de formulações à base de *Bacillus subtilis*, na inibição do crescimento micelial de *Colletotrichum acutatum*

Para estudar o efeito antagônico das formulações de *B. subtilis*, com ou sem aditivos, no crescimento micelial de *C. acutatum*, foi utilizada a técnica de cultivo pareado em placa de Petri contendo BDA (DENNIS & WEBSTER, 1971).

Discos da colônia com 0,7 cm de diâmetro retirados de culturas ativas do fitopatógeno foram colocados em placas de Petri contendo BDA a uma distância de 3 cm de uma alçada do produto formulado com a bactéria. As testemunhas foram representadas pelo fitopatógeno, sem a presença do produto. A incubação das culturas deu-se em estufa para BOD, a 27°C e fotoperíodo de 12h. Seguiu-se o delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições.

A avaliação foi realizada por meio de medições do crescimento micelial das colônias de *C. acutatum* aos oito dias após o pareamento. Os dados foram analisados por análise de variância (ANOVA) usando o software de estatística ASSISTAT 7.6 e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3.6.2 Eficiência de formulações à base de *Bacillus subtilis*, na inibição da germinação de conídios de *Colletotrichum acutatum*

Esse ensaio teve por objetivo avaliar o efeito das formulações a base de *B. subtilis*, tendo como veículo de transporte o talco, com ou sem aditivos, na inibição da germinação de conídios de *C. acutatum*.

As concentrações dos produtos formulados utilizados foram de 0; 0,1; 0,5; 1; 2,5; 5 e 10%, onde 1 g do material + 9mL de água destilada e esterilizada foi considerada como 100%, e a partir daí foram realizados os cálculos das demais concentrações.

Frações de 10 µL do produto formulado juntamente com 10 µL de suspensão de esporos do patógeno, contendo 1×10^5 conídios/mL, foram

depositadas em áreas demarcadas de lâminas, previamente preparadas, com meio ágar-água. Para o tratamento testemunha foram colocadas gotas de água destilada e esterilizada no lugar dos produtos formulados. Depois de montadas as lâminas, as culturas foram incubadas em estufa para BOD, em fotoperíodo de 12h, a 22°C, por 16 horas. Ao término desse período foi realizada a avaliação, através da contagem de esporos germinados e não germinados, em um total de 100 conídios, efetuando-se o cálculo da porcentagem de germinação. Foi considerado germinado o conídio cujo tamanho do tubo germinativo era maior ou igual à largura do conídio. Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado, sendo cada tratamento composto por 8 repetições. Os dados foram analisados por análise de variância (ANOVA) usando o software de estatística ASSISTAT 7.6 e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3.7 Eficiência *in vivo* das formulações, com ou sem aditivos, no controle de *Colletotrichum acutatum*

3.7.1 Controle da podridão floral dos citros por meio de produto formulado a base de *Bacillus subtilis* em flores destacadas.

Flores destacadas de laranja Valência (*Citrus sinensis* (L) Osbeck) foram colocadas em caixas Gerbox[®], com os pedúnculos inseridos em orifícios efetuados em espuma sintética de 5 cm de espessura, a qual foi colocada sobre papel de filtro umedecido com água destilada e esterilizada. Em seguida, as flores foram colocadas sob lâmpadas germicidas “Sankyo Denki G30T8” de

30 watts, por 20 minutos, antes da aplicação dos produtos formulados e inoculação do patógeno.

Para o tratamento, foram utilizados os produtos formulados, como descritos no item 3.5, com 2 meses de armazenamento, contendo 1×10^{12} células g^{-1} de produto. Foram obtidas suspensões do patógeno contendo 1×10^5 conídios/mL e as flores foram tratadas 24 h antes e 24 h depois da inoculação com *C. acutatum*.

Frações contendo 10 μl de suspensão do patógeno e do produto formulado dissolvidas em água estéril (1 g do produto + 9 mL de água) foram colocadas sobre cada pétala de flor de citros, no mesmo local, sendo as testemunhas constituídas de flores em que foi depositado apenas o fitopatógeno e ou água.

As caixas Gerbox[®] contendo as flores referentes a cada tratamento foram mantidas em estufa para BOD (fotoperíodo 12 h) a temperatura de 22°C. A avaliação foi realizada 48 horas após a inoculação, determinando-se a porcentagem de pétalas sem sintomas da doença. Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, sendo cada tratamento repetido três vezes, de modo que, cada repetição foi representada por uma caixa Gerbox[®] contendo 10 flores. Os dados foram analisados por análise de variância (ANOVA) usando o software de estatística ASSISTAT 7.6 e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3.7.2 Controle da podridão floral dos citros por meio de produto formulado a base de *Bacillus subtilis* sob condições de campo

Este ensaio teve por objetivo testar as diferentes formulações, acrescidas ou não de aditivos, como descritos no item 3.5, após quatro meses de armazenagem, contendo 1×10^{12} células g^{-1} de produto, quanto ao controle da podridão floral dos citros em plantas cítricas, sob condições naturais.

O ensaio foi realizado em plantas de lima ácida 'Tahiti' (*Citrus latifolia*), enxertadas sobre Limoeiro Cravo (*Citrus limonia* (L.) Osbeck), com 21 anos de idade, com infestação natural de *C. acutatum*, localizado no município de Estiva Gerbi, São Paulo, Brasil, na safra de 2011/2012.

Os produtos foram aplicados semanalmente, durante os três estádios de florescimento: cabeça de fósforo, cotonete e flor aberta (Figura 2), segundo descrição de Agustí et al. (2002). Como referência de controle foi utilizado o tratamento químico padrão empregado na fazenda (tiofanato metílico, utilizando 1L do produto/hectare), assim como plantas não tratadas.

As formulações foram aplicadas por meio de turboatomizador, calibrado para volume de aplicação de 4700L/ha, resultando numa deposição aproximada de 10 L/planta. A pressão de trabalho utilizada foi de 100 lb/pol, com rotação do motor suficiente para proporcionar 540 rpm na tomada de potência do trator. Foi utilizado um delineamento experimental de blocos ao acaso, com quatro repetições, sendo cada parcela experimental constituída por cinco plantas.

A primeira avaliação foi realizada uma semana após a última pulverização, por meio da contagem do número de flores com sintomas de infecção por *C. acutatum* e de flores sadias, em uma amostra de quatro ramos marcados por planta, totalizando 100 flores por planta, nas três plantas centrais

da parcela. De posse dos dados, foi calculada a porcentagem de flores com sintomas, segundo a metodologia de Timmer e Zitko et al. (1996). A segunda avaliação foi realizada 90 dias após a primeira, efetuando-se a contagem do número de frutos vingados e do número de cálices retidos e/ou amarelecidos devido à doença, a fim de se obter o número médio de frutos efetivos (NMFE), de acordo com Goes (1995). Os dados foram analisados por análise de variância (ANOVA) usando o software ASSISTAT 7.6 e as médias foram comparadas pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.



Figura 2: Estádios de florescimento de citros, nas aplicações dos produtos formulados a base de *Bacillus subtilis*. A) cabeça de fósforo B) cotonete e C) flor aberta.

4 RESULTADOS

4.1 Efeito da adição de compostos nitrogenados e elementos traços sobre a atividade antagônica de metabólitos produzidos por *Bacillus subtilis* a *Colletotrichum acutatum*

Quando se analisam os dados referentes à adição de fontes de nitrogênio e elementos traços em meio de cultura para aumentar a atividade antagônica de *B. subtilis* sobre o crescimento micelial de *C. acutatum*, encontrados nas Figuras 3 e 4, nota-se que a uréia a 0,02%, como fonte de nitrogênio e o molibdato de amônio a 1mM, como elemento traço, foram os aditivos que apresentaram os melhores resultados, com redução do peso seco micelial de *C. acutatum* de 5,53 e 0,55 mg, respectivamente, quando comparados com as testemunhas constituídas pelos tratamentos com e sem o antagonista, e com valores de massa seca do micélio de *C. acutatum* de 45,5 e 98,6 mg, respectivamente.

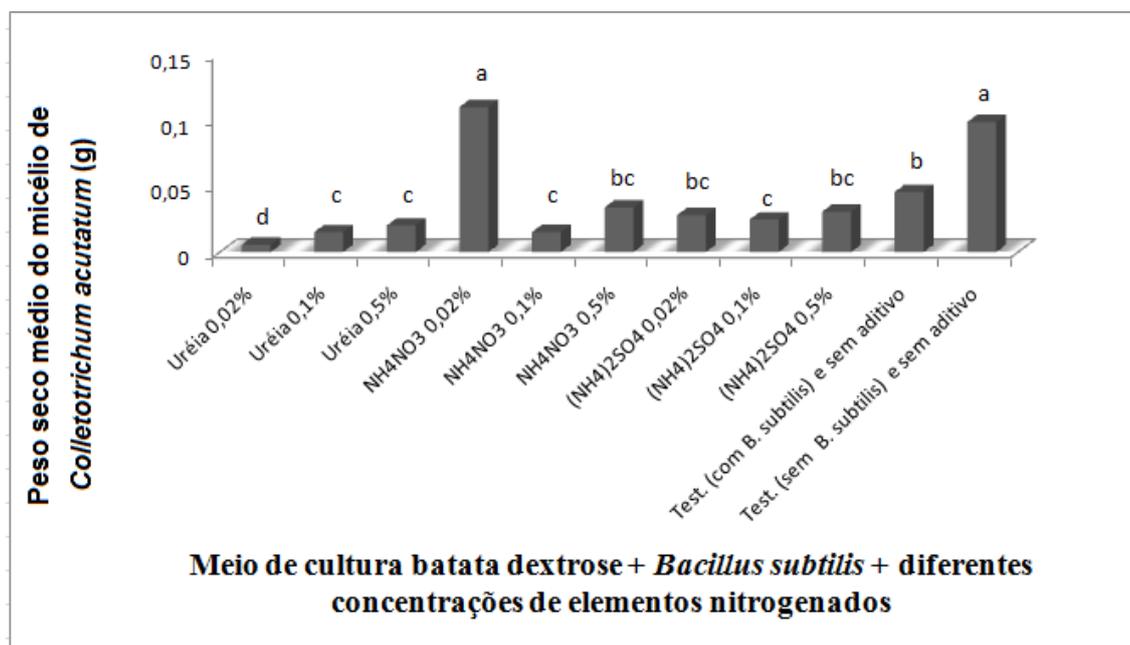


Figura 3: Efeito de concentrações de fontes de nitrogênio na atividade antagônica de *Bacillus subtilis*, sobre o crescimento micelial de *Colletotrichum acutatum*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$).

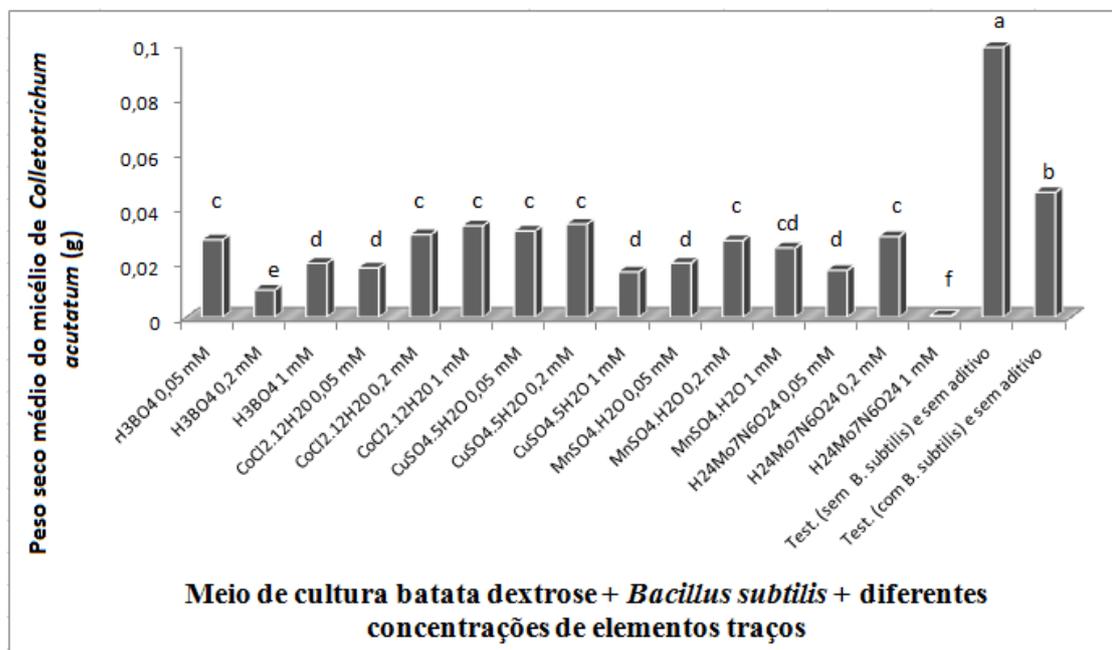


Figura 4: Efeito de concentrações de elementos traços na atividade antagônica de *Bacillus subtilis*, sobre o crescimento micelial de *Colletotrichum acutatum*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$).

Os resultados referentes ao estudo do efeito direto dos aditivos uréia e molibdato de amônio sobre o crescimento de *C. acutatum*, encontram-se na Figuras 5. Nota-se que, mesmo aplicados sem os metabólitos da bactéria, os aditivos diminuíram o crescimento do fitopatógeno.

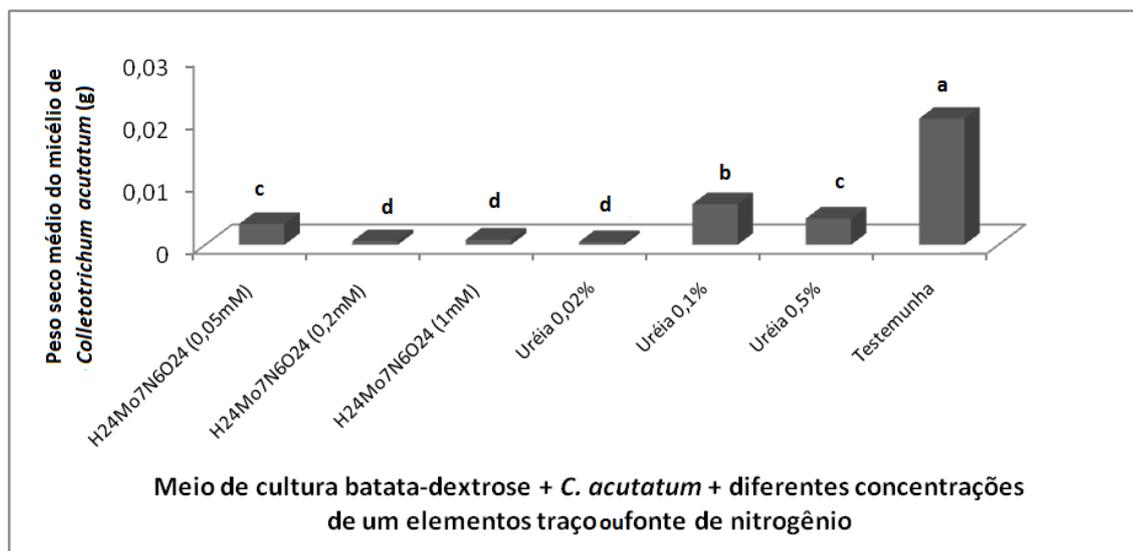


Figura 5: Efeito de concentrações de elementos traços e de fontes de nitrogênio, sobre o crescimento micelial de *Colletotrichum acutatum*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$).

4.2 Efeito da combinação de uma fonte de nitrogênio e de um elemento traço, em diferentes concentrações, sobre a atividade antagônica de metabólitos produzidos por *Bacillus subtilis* a *Colletotrichum acutatum*

Os resultados obtidos quanto ao efeito do uso da combinação de uma fonte de nitrogênio, uréia, e um elemento traço, molibdato de amônio, ambos em diferentes concentrações, sobre a atividade antagônica de metabólitos produzidos por *B. subtilis*, encontram-se na Tabela 1.

Pode-se notar que, tanto a uréia como o molibdato de amônio, foram melhores quando aplicados sozinhos, principalmente com concentração de 0,02% de uréia, e 1mM de molibdato de amônio, com valores de 60,27 e

57,26% de inibição do fitopatógeno, respectivamente. Tais resultados podem ser reforçados quando analisamos as Figuras 3 e 4, onde os mesmos aditivos, nessas mesmas concentrações, favoreceram o antagonismo da bactéria em relação ao crescimento do patógeno.

Quando os aditivos foram combinados, o crescimento micelial de *C. acutatum* foi favorecido, sendo que na maioria das misturas, o resultado não diferiu estatisticamente da testemunha (crescimento do fitopatógeno sem aditivos).

Assim, pode-se observar que os aditivos utilizados separadamente favorecem a atividade antagônica da bactéria, já quando combinados, podem ser tóxicos a mesma, anulando seu poder de controle.

Tabela 1: Inibição do crescimento micelial de *Colletotrichum acutatum* por uma fonte de nitrogênio (uréia) e um elemento traço (molibdato de amônio), usados sozinhos ou em combinados, em diferentes concentrações.

Aditivos	<i>Colletotrichum acutatum</i>	
	Diâmetro da colônia (cm)	Inibição (%) em relação à testemunha
Uréia 0,02%	3,31 a ¹	60,27
Mol. de amônio 1mM	3,56 ab	57,26
Uréia 0,1%	4,02 abc	51,74
Mol. de amônio 0,2mM	4,82 bcd	42,13
Mol. de amônio 0,05mM	5,14 cde	38,29
Uréia 0,5%	5,32 cde	36,13
Uréia 0,02% + mol. de amônio 0,05mM	5,66 def	32,05
Uréia 0,02% + mol. de amônio 0,2mM	5,90 def	29,17
Uréia 0,5% + mol. de amônio 0,05mM	6,22 defg	25,33
Uréia 0,02% + mol. de amônio 1mM	6,48 efg	22,20
Uréia 0,1% + mol. de amônio 0,05mM	6,94 fgh	16,68
Uréia 0,5% + mol. de amônio 0,2mM	7,34 gh	11,88
Uréia 0,1% + mol. de amônio 1mM	7,42 gh	10,92
Uréia 0,1% + mol. de amônio 0,2mM	7,46 gh	10,44
Uréia 0,5% + mol. de amônio 1mM	7,64 gh	8,29
Testemunha	8,33 h	-

(1) Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$).

4.3 Eficiência *in vitro* das formulações, com ou sem aditivos, no controle de *Colletotrichum acutatum*.

4.3.1 Eficiência de formulações a base de *Bacillus subtilis*, na inibição do crescimento micelial de *Colletotrichum acutatum*

Pode-se observar que todas as formulações a base de *B. subtilis* (com exceção do alginato de potássio+uréia a 0,02%) inibiram significativamente o tamanho da colônia de *C. acutatum* em relação ao tratamento testemunha, com valores de inibições que variaram de 33,5 a 59,3%, sendo esse último valor referente ao tratamento talco+uréia (0,02%) (Tabela 2 e Figura 6).

Tabela 2. Inibição do crescimento micelial de *Colletotrichum acutatum* por produtos formulados a base de *Bacillus subtilis*, com ou sem aditivos⁽¹⁾

<i>Colletotrichum acutatum</i>		
Veículos de formulações com ou sem aditivos	Diâmetro da colônia (cm)	Inibição (%) em relação à testemunha
Testemunha	8,89 a	-
Alg. potássio + uréia 0,02%	6,26 ab	29,59
Alg. potássio+ mol. de amônio 1mM	5,91 b	33,53
Alginato de potássio	5,71 bc	35,78
Talco+ mol. de amônio 1mM	5,32 bc	40,16
Talco	5,11 bcd	45,52
Caulim + uréia 0,02%	4,75 bcd	46,57
Caulim+ mol. de amônio 1mM	4,19 cd	47,13
Caulim	4,63 bcd	47,92
Talco + uréia 0,02%	3,62 d	59,29

⁽¹⁾Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$).



Figura 6: Efeito do produto formulado a base de *Bacillus subtilis* sobre a inibição do crescimento micelial de *Colletotrichum acutatum* em teste de cultivo pareado, A) talco como veículo de transporte, acrescido de uréia (0,02%) B) Testemunha (fitopatógeno sem pareamento com o produto formulado).

4.3.2 Efeito do produto formulado à base de *Bacillus subtilis*, na inibição da germinação de conídios de *Colletotrichum acutatum*

Os resultados do efeito do produto formulado à base de *B. subtilis* em diferentes concentrações (0,1; 0,5; 1; 2,5; 5 e 10%), sobre a germinação de conídios de *C. acutatum*, encontram-se na Figura 7. Nota-se que todas as formulações testadas foram eficientes em inibir a germinação do fitopatógeno, porém os melhores resultados foram obtidos com os produtos formulados com talco + uréia (0,02%) concentrações de 0,1 e 0,5%, que inibiram em 80 e 74,8% a germinação do patógeno, respectivamente. Os tratamentos referentes aos produtos formulados a base de talco sem aditivo e talco + molibdato de

amônio (1mM) nessas mesmas concentrações, apresentaram valores de inibição que variaram de 70 a 68%.

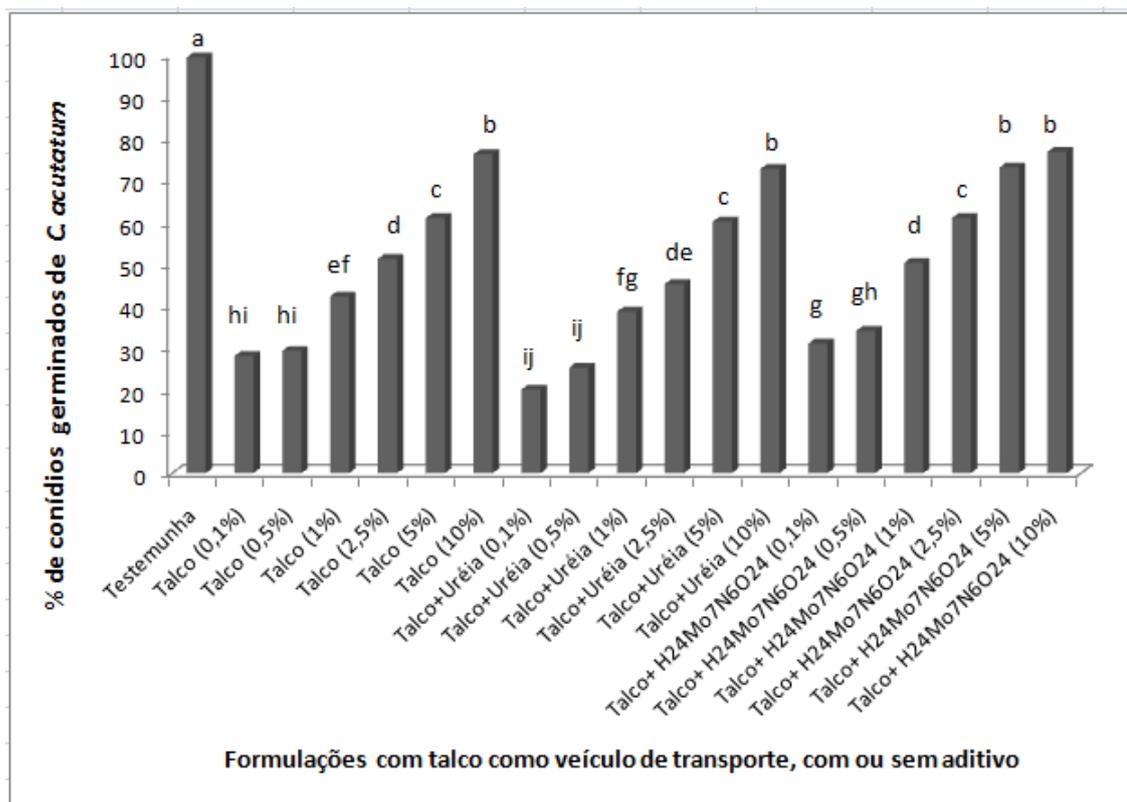


Figura 7 : Inibição da germinação de conídios de *Colletotrichum acutatum* sob efeito do produto formulado à base de *Bacillus subtilis*, tendo como veículo de transporte o talco, com ou sem aditivos (uréia a 0,02% e molibdato de amônio a 1 mM) em diferentes concentrações, após 16 horas de incubação. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$).

4.4 Eficiência *in vivo* das formulações, com ou sem aditivos, no controle de *Colletotrichum acutatum*.

4.4.1 Controle da podridão floral de citros, por meio de produto formulado à base de *Bacillus subtilis*, em flores destacadas de citros.

Formulações à base de *B. subtilis*, utilizando como veículos de transporte talco, caulim e alginato de potássio, proporcionaram porcentagens de controle da doença acima de 60% quando as formulações foram acrescidas de uréia como fonte de nitrogênio e, quando o controle foi realizado de forma curativa (flores tratadas 24 h após a inoculação com o fitopatógeno), sendo o melhor resultado obtido com a formulação da bactéria em talco + uréia (0,02%), proporcionando 90% de flores sadias. Quando se observa o controle aplicado de forma preventiva, os melhores tratamentos foram talco+ molibdato de amônio (1mM) e talco+ uréia (0,02%) com eficiências de controle de 93 e 73%, respectivamente (Figura 8).

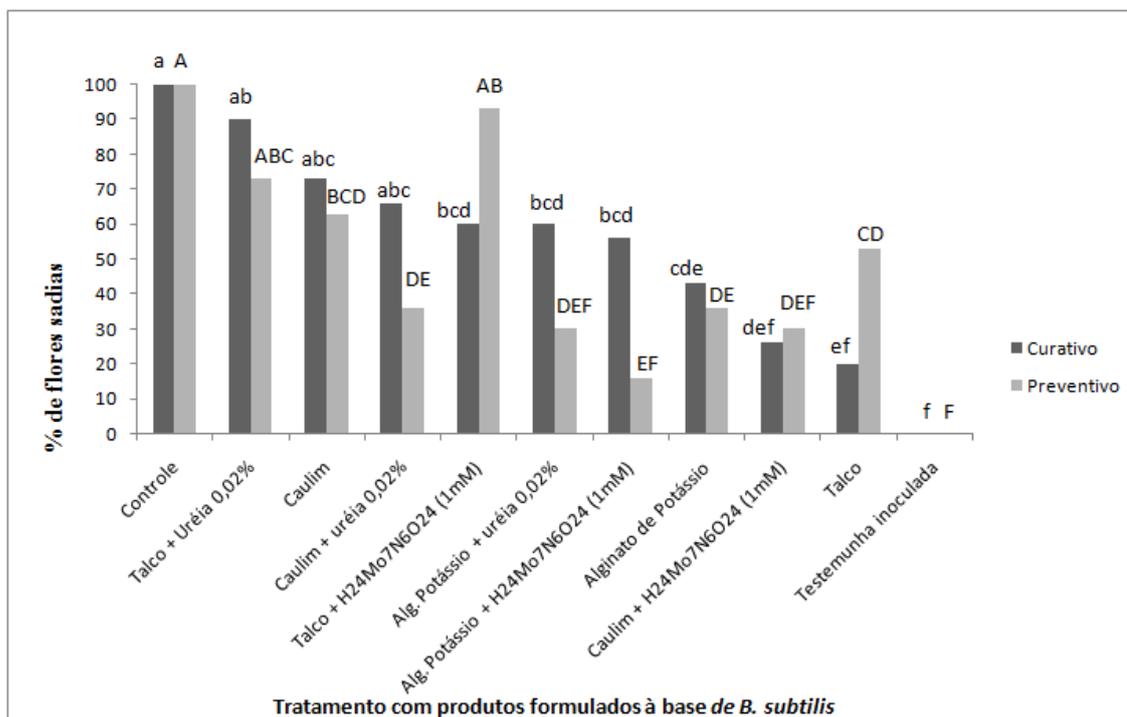


Figura 8: Porcentagem de flores destacadas de laranja 'Valência', sem sintomas de podridão floral, tratadas com produtos formulados à base de *Bacillus subtilis*, com ou sem aditivos, 24 horas antes (preventivo) e 24 horas após (curativo) a inoculação com *Colletotrichum acutatum*. Médias seguidas pela mesma letra, minúscula para tratamento curativo, e maiúscula para tratamento preventivo, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$).

4.4.2 Controle da podridão floral dos citros, por meio de produto formulado a base de *Bacillus subtilis*, sob condições de campo.

Quando se avaliou a porcentagem de flores sem infecção por *Colletotrichum acutatum*, sob condições de campo durante a safra de 2011/2012 (Tabela 3), verificou-se que nas plantas tratadas com talco+uréia (0,02%) e talco sem aditivo, foram obtidos resultados estatisticamente iguais ao

controle químico padrão utilizado pela fazenda (tiofanato metílico), com 72,7, 69,6 e 64,87% de flores sadias, respectivamente. Os tratamentos referentes ao caulim e talco+molibdato de amônio (1mM) não diferiram estatisticamente do controle químico, com valores de 55,8 e 54,2% de flores sadias, respectivamente. Os tratamentos constituídos por alginato de potássio sozinho, e alginato de potássio+molibdato de amônio (24,3 e 19,9%) não diferiram da testemunha sem controle (8,8% de flores assintomáticas).

Quando se avaliou o número médio de frutos efetivos (NMFE), verificou-se que, embora a doença tenha ocorrido com grande intensidade, afetando drasticamente a produção, foi possível observar o efeito dos tratamentos na incidência da mesma. Nas plantas tratadas com talco+uréia (0,02%) foram obtidos 56,5% de NMFE, apresentando controle superior ao controle químico (46,7% de NMFE) e 0,83% na testemunha sem nenhum tratamento (Figura 9). O tratamento referente à formulação de caulim como veículo de transporte não diferiu estatisticamente do tratamento com fungicida padrão utilizado para o controle da doença, apresentando uma quantidade média de frutos vingados de 40,4%.

O tratamento com alginato de potássio + molibdato de amônio (1mM) e alginato de potássio + uréia (0,02%) não diferiram estatisticamente do tratamento testemunha. As plantas tratadas com as demais formulações mostraram comportamento intermediário, com valores entre 35,3 a 17,5% de número médio de frutos efetivos.

Considerando a alta incidência da doença na safra em questão, os tratamentos tendo o talco como veículo de transporte, com ou sem aditivo,

mostraram ser eficientes no controle de *C. acutatum*, os quais apresentaram mais de 50% de flores sadias.

Tabela 3: Efeito dos produtos formulados, com ou sem aditivo, na porcentagem de flores sem infecção por *Colletotrichum acutatum* e no número médio de frutos efetivos (NMFE), em plantas de lima ácida 'Tahiti', no município de Estiva Gerbi, SP. (Safrá 2011/2012) ⁽¹⁾

Tratamentos	% de flores sadias	NMFE⁽²⁾
Talco+uréia 0,02%	72,73 a	56,45 a
Tiofanato metílico	69,62 ab	46,70 b
Talco	64,87 ab	35,06 c
Caulim	55,80 b	40,42 bc
Talco+ mol. de amônio 1mM	54,22 b	35,32 c
Caulim+uréia 0,02%	36,47 c	25,36 d
Caulim+ mol. de amônio 1mM	37,12 c	23,22 d
Alginato de potássio + uréia 0,02%	25,37cd	7,10 e
Alginato de potássio	24,30 cde	17, 54 d
Alginato de potássio+ mol. de amônio 1mM	19,97 de	7,94 e
Testemunha	8,80 e	0,83 e

⁽¹⁾Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p \geq 0,05$). ⁽²⁾ NMFE = $(A/(A + B)) \times 100$, onde A = n^o de frutos vingados e B = n^o de cálices retidos e/ou n^o de frutos amarelecidos devido à doença.



Figura 9: Plantas de lima ácida 'Tahiti'. A) Tratamento com produto formulado à base de *Bacillus subtilis*, tendo talco como veículo de transporte e uréia (0,02%) como aditivo. B) Testemunha sem nenhum tratamento

5 Discussão

A mudança do perfil do consumidor, aliada aos riscos de contaminação do meio ambiente, devido ao uso excessivo de produtos químicos para o controle de doenças de plantas, tem levado pesquisadores em busca de alternativas ecologicamente mais apropriadas para a produção de frutas.

O uso de agentes de biocontrole é uma opção ainda pouco explorada, devido às dificuldades e limitações quanto à viabilidade em larga escala, uma vez que produtos biológicos são muitas vezes pouco resistentes aos fatores ambientais como ação de raios ultravioletas, exposição a temperaturas extremas, como frio e calor (HABIB & ANDRADE, 1998; KOHL et al., 2011). O efeito desses agentes torna-se um método ecologicamente viável e normalmente seguro, tem efeito microbiostático, pode, muitas vezes, induzir a resistência natural das plantas e prover proteção por um longo prazo para a cultura. Dessa forma, é um recurso alternativo para o biocontrole de fungos fitopatogênicos (MAZARO et al., 2008).

A formulação de um bioproduto requer estudos quanto à época de aplicação e dosagens, pontos esses fundamentais na produção de um produto com características comerciais e de campo (HABIB & ANDRADE, 1998).

A formulação de um agente de controle biológico tem como objetivo a preservação do micro-organismo e de suas características antagonísticas, porém, os custos de um produto formulado devem ser atraentes e o produto não deve representar perigo ao aplicador, ao consumidor e ao ambiente no qual está inserido o sistema de produção (GRIGOLETTI et al., 2000; SPADARO & GULLINO, 2005).

Considerando que *B. subtilis* apresenta como principal característica a formação de endósporos termotolerantes, podendo resistir à dessecação e radiações UV quando em condições naturais, aliado ao fato de apresentar grande poder inoculante e produção de metabólitos com atividade conhecida contra inúmeros fitopatógenos (BETTIOL et al., 2000), tal agente de biocontrole é extremamente atrativo para a confecção de um bioproduto para a aplicação comercial em larga escala.

De acordo com Kupper et al. (2003), um dos mecanismos de ação de *B. subtilis*, em especial do isolado ACB-69, envolvido no antagonismo ao fungo *C. acutatum* diz respeito à antibiose. Trabalho prévio relatou que o isolado ACB-69 foi um dos mais eficientes na produção de substâncias anti-fúngicas e, em quantidades suficientes para inibir a germinação do fitopatógeno (KUPPER et al., 2009). Ainda dentro deste contexto, talvez a importância das formulações não esteja só na produção de células, como observado por Melin et al. (2007), mas principalmente, por permitir maior produção de metabólitos que afetem o desenvolvimento do fitopatógeno, fato esse observado no presente trabalho, onde os experimentos *in vitro* mostraram que as formulações afetaram o desenvolvimento do fungo quanto em cultivo pareado.

Neste trabalho, os resultados *in vitro* e *in vivo* mostraram que formulações de *B. subtilis* tendo o talco como veículo de transporte, foram otimizadas quando a uréia (0,02%), como fonte de nitrogênio, e o molibdato de amônio (1mM) como elemento traço foram adicionados em sua composição, proporcionando 72,73% de flores sadias e 56,4% de número médio de frutos efetivos (NMFE) sob condições de campo (Tabela 3). Tais resultados

concordam com os relatados por Sid-Ahmed (2003), onde a incorporação de aditivos em formulações à base de turfa tem potencializado o efeito antagonista de *B. subtilis* contra o fitopatógeno *Pythium* sp. causador da podridão radicular em pimenta.

Os resultados mostraram ainda que o controle da doença com o produto formulado à base de *B. subtilis*, foi superior ao controle químico que proporcionou 69,6% de flores sadias e 46,7% de número médio de frutos efetivos (Tabela 3). Este resultado é similar ao encontrado por Ozaktan e Bora (2004), cujo tratamento químico utilizado foi menos eficiente do que uma formulação de *Pantoea agglomerans*, tendo o talco como veículo de transporte, para o controle de *Erwinia amylovora* na cultura da pêra, reduzindo a incidência da doença.

Embora todas as fontes nitrogenadas e os elementos traços testados, nas diferentes concentrações, tenham contribuído para a atividade antagônica da bactéria contra *C. acutatum* (Figuras 3 e 4), foi observado que a uréia a 0,02% e o molibdato de amônio a 1mM foram os aditivos que promoveram redução da massa seca do fitopatógeno. Provavelmente, esses compostos estimulam a produção de metabólitos de *B. subtilis*, fazendo com que a ação antagônica da bactéria seja mais intensa sobre o fitopatógeno.

Neste contexto, Carvalho et al. (2010) estudando a fisiologia de um isolado de *B. subtilis* (R14) após a adição de uma fonte de carbono (piruvato de sódio ou glucose) e uma fonte de nitrogênio (sulfato de amônio ou nitrato de sódio) descobriram diferenças entre os aditivos testados. Os resultados mostraram que o nitrato de sódio aumentou o rendimento de biomassa em

relação à adição de sulfato de amônio e a adição de piruvato ao meio permitiu o crescimento bacteriano, tanto através de fermentação como de respiração anaeróbica. Sob limitação de oxigênio, mas em presença desses nutrientes essenciais, *B. subtilis* R14 produziu compostos bioativos capazes de serem antagônicos a várias bactérias fitopatogênicas, enfatizando a necessidade da bactéria ter um equilíbrio entre uma fonte de carbono e de nitrogênio ao meio. Fatos como esses podem explicar o desempenho de *B. subtilis* diante do acréscimo do aditivo nitrogenado na formulação, onde o antagonista formulado a base de talco+uréia (0,02%) promoveu 59% de inibição da colônia do fitopatógeno, quando comparado com a testemunha (Tabela 2).

Os experimentos com flores destacadas mostraram a importância do tipo de aditivo a ser utilizado nas formulações quando se almeja diferentes formas de controle. Quando o controle é realizado de maneira curativa, formulações a base de *B. subtilis*, tendo o talco como veículo de transporte, requerem uma fonte nitrogenada, enquanto que o controle preventivo é mais eficiente quando se utiliza o molibdato de amônio (93% de controle), no lugar da uréia (com 73% de controle) (Figura 8). Segundo Zambolin e Ventura (1996) em estudos de diversos micronutrientes em relação a requeima da batata causada por *Phytophthora infestans*, apenas o molibdênio provocou um decréscimo na sensibilidade da doença. Portanto, estudos nesse sentido devem ser realizados de modo a entender a função do micronutriente no patossistema *Colletotrichum* - citros. Estudo anterior (Kupper et al., 2012) mostrou que o isolado ACB-69 age por antibiose, onde aplicações da bactéria uma semana antes do início da floração da cultura, favoreceu o controle da PFC.

Segundo Zulfiqar et al. (1996) são necessárias cerca de 30 horas para que se completem os processos de germinação e penetração de *C. acutatum* em pétalas de flores cítricas, fases essas mais fragilizadas do ciclo de vida do patógeno. Portanto, formulações que permitam ao antagônico, a sobrevivência, manutenção e a viabilidade de suas células são extremamente interessantes, principalmente se for levado em consideração o mecanismo de ação do isolado ACB-69, o qual age por antibiose (KUPPER et al., 2003; 2012). Esse ponto pode ser enfatizado e observado nos resultados apresentados na Figura 7, onde o produto formulado com a bactéria, tendo como veículo de transporte o talco acrescido de uréia quando aplicado nas menores concentrações (0,1 a 0,5%), inibiu a germinação do fitopatógeno entre 75 a 80%, afetando dessa maneira, uma das principais fases do ciclo da doença.

6 CONCLUSÕES

Os resultados apresentados neste trabalho permitiram concluir que:

- 1) O talco apresentou-se como um excelente veículo de transporte para se formular um bioproduto à base de *Bacillus subtilis*;
- 2) Uso de aditivos melhorou a formulação, aumentando a atividade antagônica da bactéria contra *Colletotrichum acutatum*;
- 3) A formulação à base de *Bacillus subtilis*, tendo o talco como veículo de transporte, acrescida de uréia a 0,02% como fonte nitrogenada, manteve a atividade antagônica da bactéria, sendo eficiente no controle da podridão floral dos citros.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – **ANVISA** - Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos. Brasil é referência na América Latina. 2009. http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2008/091208_link.htm. Acesso em 10 de julho de 2012.
- AGOSTINI, J.P.; TIMMER, L.W. Populations dynamics and survival of strains of *Colletotrichum gloeosporioides* on citrus in Florida. **Phytopathology**, v.84, p.420-425, 1994.
- AGOSTINI, J.P.; TIMMER, L.W. Selective isolation procedures for differentiation of two strains of *Colletotrichum gloeosporioides* from citrus. **Plant Disease**, v.76, p.1176-1178, 1992.
- AGRIFORUM: **anúário da agricultura brasileira**. São Paulo: FNP Consultoria e Comércio, 2005. p.257-300, 2011.
- AGUSTÍ, M.; ZARAGOZA, S.; BLEIHOLDER, H.; BUHR, L.; HACK, H.; KLOSE, R.; STAUB, R. The BBCH scale for describing phenological stages in citrus development. **Proceedings International Society of Citriculture**, v.9, p.445–446, 2002.
- ALÍ, N.I.; SIDDIQUI, L.A.; SHAUKAT, S.S.; ZAKI, M.J. Survival of *Pseudomonas aeruginosa* in various carriers for the inhibition of root rot-root knot disease complex of mungbean. **Phytopathology Mediterranean**, v.40, p.108-112, 2001.
- ALTIERI, M. A. **Agroecologia**: as bases científicas da agricultura alternativa; 1.ed. Rio de Janeiro : AS-PTA, 1989.

- ALTIERI, M. **Agroecologia**: a dinâmica produtiva da agricultura sustentável. 4 ed. Porto Alegre: UFRGS, 2004.
- AMER, G.A.; UTKHEDE, R.S. Development of formulations of biological agents for management of root rot of lettuce and cucumber. **Canadian Journal Microbiology**, v.46, p.809-816, 2000.
- ARAUJO, F.F. Inoculação de sementes com *Bacillus subtilis*, formulado com farinha de ostras e desenvolvimento de milho, soja e algodão. **Ciência Agropecuária**, v. 32, p.456-462, 2008.
- ATKINSON, D.; MCKINLAY, R.G. Crop protection in sustainable farming systems. In: MCKINLAY, R.G.; ATKINSON, D. **Integrated Crop Protection**: towards sustainability. Farnham: British Crop Protection Council, p.483-488, 1995.
- BASHAN, Y. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. **Biotechnology Advanced**. v.16, p.729-770, 1998.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários**. AGROFIT. Disponível em: www.extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em: 10 ago. 2009.
- BETTIOL, W.; GARIBALDI, A.; MIGHELI, Q. *Bacillus subtilis* for the control of powdery mildew on cucumber and zucchini squash. **Bragantia**, v.56, p.281-287, 2000.
- BETTIOL, W.; SAITO, M.L.; BRANDÃO, M.S.B. Controle da ferrugem do cafeeiro com produtos a base de *Bacillus subtilis*. **Summa Phytopathology**, v.20, p.119-122, 1994

- BROWN, A.E.; SREENIVASAPRASAD, S.; TIMMER, L.W. Molecular characterization of slow-growing orange and Key Lime anthracnose of *Colletotrichum* from citrus as *C. acutatum*. **Phytopathology**, v.86, p.523-527, 1996.
- CAPORAL, F. R.; COSTABEBER, J. A. Agroecologia e desenvolvimento rural sustentável: perspectivas para uma nova Extensão Rural. **Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável**, v.1, p.16-37, 2000.
- CARVALHO, A.L.U.; OLIVEIRA, F.H.P.C.; MARIANO, R.L.R.M.; GOUVEIA, E.R.; SOUTO-MAIOR, A.M. Growth, sporulation and production of bioactive compounds by *Bacillus subtilis* R14. **Brazilian Archive Biology and Technology**, v.53, p.643-652, 2010.
- DAROLT, M. R. **Agricultura Orgânica: inventando o futuro**. Londrina: IAPAR, 2002.
- DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* III. Hyphal interactions. **Transactions of the British Mycological Society**. v.57, p.359-363, 1971.
- DENHAM, T.G.; WALLER, J.W. Some epidemiological aspects of post-bloom fruit drop disease (*Colletotrichum gloeosporioides*) in citrus. **Annals of Applied Biology**, v.98, 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), p.3-6, 1977.

- FAGAN, H.J. Postbloom fruit drop of citrus, a new disease of citrus associated with a form of *Colletotrichum gloeosporioides*. **Annual Applied Biology**, v.91, p.13-20, 1979.
- FAGAN, H.J. Postbloom fruit drop of citrus in Belize. **Disease Epidemiology**, v.34, p.173-177, 1984.
- FEICHTENBERGER, E.; BASSANEZI, R.B.; SPÓSITO, M.B.; BELASQUE JR., J. Doenças dos Citros. In: Kimati, H., Amorim, L., Rezende, J.A.M., Bergamin Filho, A., Camargo, L.E.A. (Eds.). **Manual de Fitopatologia**, v.2. São Paulo: Editora Ceres, p.239-269, 2005.
- FEICHTENBERGER, E. Queda de frutos jovens em citros. **Laranja**, v.12, p.513-521, 1991.
- FRIGHETTO, R.T.S.; MELO, I.S. de. Produção de antibióticos por micro-organismos. In: Melo, I. S. de, Sanhueza, R.M.V. (Coords.) **Métodos de seleção de micro-organismos antagônicos a fitopatógenos**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, p.40-46. (Manual Técnico), 1995.
- GHINI, R.; BETTIOL, W. Proteção de plantas na agricultura sustentável. **Caderno de Ciência & Tecnologia**, v.17, p.61-70, 2000.
- GOES, A. DE; KIMATI, H. Caracterização morfológica de isolados de *Colletotrichum acutatum* e *C. gloeosporioides* associados à Podridão Floral dos Frutos Cítricos. **Summa Phytopathologica**, v.23, p.04-09, 1997a.
- GOES, A. DE; KIMATI, H. Caracterização patogênica de isolados de *Colletotrichum acutatum* e *C. gloeosporioides*, obtidos de plantas cítricas. **Summa Phytopathologica**, v.23, p.10-14, 1997b

- GOES, A. DE; KIMATI, H. *Colletotrichum acutatum*, agente causal da podridão floral dos frutos cítricos: resistente ou insensível a benomil? **Summa Phytopatologica**, v.24, p.246-253, 1998.
- GOES, A. DE; 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. p.353-412, 2002.
- GOES, A. DE. **Podridão floral de frutos cítricos: Caracterização do agente causal, *Colletotricum gloeosporioides* Penz. (Sensu Arx, 1957), e controle da doença**. Piracicaba, 143p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Universidade de São Paulo, 1995.
- GRIGOLETTI, JR. A.; SANTOS, A.F DOS.; AUER, C.G. **Perspectivas do uso do controle biológico contra doenças florestais**. In: Floresta. v.30, p.200, 2000.
- HABIB, M.E.M.; ANDRADE, C.F.S. Bactérias entomopatogênicas. In: ALVES, S.B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: Fealq, p.383-446, 1998.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **IBGE** -. In: Indicadores IBGE. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/estProdAgr_2010>.
- KALITA, P.; BORA, L.C.; BHAGABATI, K.N. Phylloplane microflora of citrus and their role in management of citrus canker. **Indian Phytopathology**, v.49, p.234-237, 1996.

- KNUDSEN, G.R.; SPURR JR.; H.W. Management of Bacterial Populations for Foliar Disease Biocontrol. In: MUKERJL, K.G., GARG, K.L. **Biocontrol of Plant Diseases**. Boca Raton: CRC Press, p.83-92, 1986.
- KOHL, J.; BLUM, B.; NICOT, P.; RUOCCO, M. Screening of microbial antagonists for the development of commercial biocontrol products against plant pathogens. **Simpósio de Controle Biológico**, 2011.
- KONRADSEN, F.; VAN DER HOEK W., COLE D.C., HUTCHINSON, G., DAISLEY, H., SINGH, S., EDDLESTON, M. Reducing acute poisoning in developing countries – options for restricting the availability of pesticides. **Toxicology**, v.192, p. 249-261, 2003.
- KUPPER, K.C.; BELLOTTE, J.A.; DE GOES, A. Controle alternativo de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.31, p.1004–1015, 2009.
- KUPPER, K.C.; BETTIOL, W.; CORREA, E.B.; MORETTO, C. Potencialidade de *Bacillus subtilis* e *Trichoderma* spp. como agentes de biocontrole de *Guignardia citricarpa*. **Fitopatologia Brasileira**, v 29: S129. 2004 (Abstract).
- KUPPER, K.C.; CORRÊA, E.F.; AZEVEDO, F.A. DE; SILVA, A.C. DA. *Bacillus subtilis* to biological control of postbloom fruit drop caused by *Colletotrichum acutatum* under field conditions. **Science Horticulture**, v.134, p.139-143, 2012.
- KUPPER, C.K.; CORRÊA, E.B.; MORETTO, C.; BETTIOL, W.; GOES, A. Control of *Guignardia citricarpa* by *Bacillus subtilis* and *Trichoderma* spp. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.33, n.4, p.1111-1118, 2011.

- KUPPER, K.C.; GIMENES-FERNANDES, N. Isolamento e seleção de *Bacillus* spp. para o controle de *Colletotrichum acutatum* em flores destacadas de lima ácida 'Tahiti'. **Summa Phytopathologica**, v. 28, p. 292-295, 2002.
- KUPPER, K.C.; GIMENES-FERNANDES, N.; GOES, A. de. Controle biológico de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da podridão floral dos frutos cítricos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p. 251-257, 2003.
- LIMA, W. G.; SPÓSITO, M. B.; AMORIM, L.; GONÇALVES, F.P.; MELO DE FILHO, P.A. *Colletotrichum gloeosporioides*, a new causal agent of citrus post-bloom fruit drop. **European Journal Plant Pathology**, v.131, p. 131-157, 2011.
- LOPES, R.B. A indústria no Controle Biológico: Produção e Comercialização de Microrganismos no Brasil. **Biocontrole de Doenças de Plantas**, p. 15-28, 2009.
- MAZARO, S.M.; DESCHAMPS, C.; MIO, L.L.M.; BIASI, L.A.; GOUVEA, A.; SAUTTER, C.K.; Comportamento pós-colheita de frutos de morangueiro após aplicação pré-colheita de quitosana e acibenzolar-metil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.30, n.1, p. 185-190, 2008.
- MEDUGNO, C.C. Formulação de Agente Microbiano para Controle de Fitopatógenos. In: MELO, I. S.; SANHUEZA, R. M. V. (eds.) **Métodos de Seleção de Micro-organismos Antagônicos a Fitopatógenos**, v.1, p.47-59, 1995.
- MELIN, P.; HAKANSSON, S.; SCHNURER, J. Optimisation and comparison of liquid and dry formulations of the biocontrol yeast *Pichia anomala* J121. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.73, p.1008–1016, 2007.

- MELO, W. M.; BOAS J. A. V.; CORREA, R.D.; PINTO JUNIOR, D.M.
Embalagens de agrotóxicos: um estudo de caso da cidade de Patos-MG.
VIII Congresso Nacional em Excelência em Gestão, 2012.
- MELO-SANTOS, M. A. V. Evaluation of a new tablet formulation based on
Bacillus thuringiensis sorovar. *Israelensis* for larvicidal control. **Memórias do
Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 96, p. 859-860, 2001.
- MORETINI, A. **Formulação do fungo *Coniothyrium minitans* e isolamento
de microrganismos para biocontrole do mofo branco (*Sclerotinia
sclerotiorum*)**. São Paulo, 48p. Tese (Doutorado em Biotecnologia) -
Universidade de São Paulo, 2005.
- MORETINI A.; MELO, I.S. Formulação do fungo *Coniothyrium minitans* para
controle do mofo-branco causado por *Sclerotinia sclerotiorum*. **Pesquisa
Agropecuária Brasileira**. v.42, p.155-161, 2007.
- NEVES, M.F. **O retrato da citricultura brasileira**, 2010. Disponível em:
<<http://www.citrusbr.com.br/exportadores-citricos/saiba-mais/o-retrato-da-citricultura-brasileira-189513-1.asp>>. Acesso em: Abril/2012.
- OLIVEIRA, C. S.; FERREIRA, A.P. Perfil epidemiológico das ações de
vigilância em saúde das populações expostas aos agrotóxicos. **Revista de
Saúde, Meio Ambiente e Sustentabilidade**, v.7, p.19-33, 2012.
- OZAKTAN, H.; BORA, T. Biological control of fire blight in pear orchards with a
formulation of *Pantoea agglomerans* strain Eh 24. **Brazilian Journal
Microbiology**, v. 35, p. 224-229, 2004.
- PERES, N.A.; TIMMER, L.W.; ADASKAVEG, J.E.; CORRELL, J.C. Lifestyles of
Colletotrichum acutatum. **Plant Disease**, v. 89 n. 8, p. 784-796, 2005.

- PERTESEN, P. **Informativo Rede Agroecologia**. Rio de Janeiro: Rede Agroecologia, 1999.
- PINHEIRO, K. H. **Produtos orgânicos e certificação: o estudo desse processo em uma associação de produtores do município de Palmeira – PR**. Ponta Grossa, Dissertação (Mestrado em Engenharia da Produção) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. p.118, 2012.
- PIRES, D.X.; CALDAS, E.D.; RECENA, M.C. Intoxicações provocadas por agrotóxicos de uso agrícola na microrregião de Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil, no período de 1992 a 2002. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 21, p.804-814, 2005.
- REIJNTJES, C. **Agricultura para o futuro, uma introdução à agricultura sustentável e de baixo uso de insumos externos**. Rio de Janeiro : AS-PTA, p.323, 1994.
- RICARDO, B.; CAMPANILI, M. **Almanaque Brasil Socioambiental**. São Paulo: ISA - Instituto Socioambiental, 2005.
- SCHAEFFER, P. J.; MILLET, J.; Aubert, J. P. Catabolic repression of bacterial sporulation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 54, p.704-711, 1965.
- SCHMIDT, C.S.; LORENZ, D.; WOLF, G.A.; JAGER, J. Biological control of grapevine dieback fungus *Eutypa lata* II: Influence of formulation additives and transposon mutagenesis on the antagonistic activity of *Bacillus subtilis* and *Erwinia herbicola*. **Journal of Phytopathology**, v.149, p.437-445, 2001.

- SCHISLER, D. A.; SLININGER, P. J.; BEHLE, R. W.; JACKSON, M. A. Formulation of *Bacillus* spp. For biological control of plant diseases. **Phytopathology**, São Paulo, v. 94, p. 1267-1271, 2004.
- SELLA, S. R. B. R. **Desenvolvimento de bioprocesso para a produção de esporos termorresistentes de *Bacillus atrophaeus***. Curitiba, 242p. Dissertação (Mestrado em processos biotecnológicos) - Universidade Federal do Paraná, 2008.
- SID-AHMED, A. Effect of chitin on biological control activity of *Bacillus* spp. and *Trichoderma harzianum* against root rot disease in pepper (*Capsicum annuum*) plants. **European Journal Plant Pathology**, v.109, p.633-637, 2003.
- SONODA, R.M.; GUO, Z. Effect of spray applications of *Bacillus subtilis* on postbloom drop of citrus. **Phytopathology**, v.86, p.52, 1996.
- SPADARO, D.; GULLINO, M.L. Improving the efficacy of biocontrol agents against soil borne pathogens. **Crop Protection**, v.24, p.601-613, 2005.
- TIMMER, L.W.; AGOSTINI, J.P.; ZITKO, S.E.; ZULFIQAR, M. Postbloom fruit drop, and increasingly prevalent disease of citrus in the Americas. **Plant Disease**, v.78, p.329-334, 1994.
- TIMMER, L.W.; ZITKO, S. E. Evaluation of a model for prediction of postbloom fruit drop of citrus. **Plant Disease**, v.80, p.380-383, 1996.
- VIDHYASEKARAN, P.; SETHURAMAN, K.; RAJAPPAN, K., VASUMATHI, K. Powder formulations of *Pseudomonas fluorescens* to control pigeonpea wilt. **Biological Control**, v.8, p.166-171, 1997.

- WALDBURGER, C.; GONZALEZ, D.; CHAMBLISS, G.H. Characterization of New Sporulation Factor in *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**, v. 175, p. 6321-6327, 1993.
- WHEELER, I.E.; KENDALL, S.J.; BUTTERS, J.; HOLLOMON, D.W.; HALL, L. Using allele-specific oligonucleotide probes to characterize benzimidazole resistance in *Rhynchosporium secalis*. **Pesticide Science**, v.43, p.201-209, 1995.
- 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**, v.46, p.348-357, 2008.
- ZAMBOLIM, L.; VENTURA, J.A. Resistência a doenças induzidas pela nutrição das plantas. **Informações Agronômicas (POTAFOS)**, v.75, encarte técnico, 1996.
- ZULFIQAR, M.; BRLANSKY, R.H.; TIMMER, L.W. Infection of flower and vegetative tissues of citrus by *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides*. **Mycology**, v.88, p.121-128, 1996.