



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

**MANEJO DA MANCHA PRETA DOS CITROS ATRAVÉS DA UTILIZAÇÃO  
DE AGENTES DE CONTROLE BIOLÓGICO**

**CHRISTIANO GRÊGIO GUIMARÃES**

**Araras/SP**

**2012**



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

**MANEJO DA MANCHA PRETA DOS CITROS ATRAVÉS DA UTILIZAÇÃO  
DE AGENTES DE CONTROLE BIOLÓGICO**

**CHRISTIANO GRÈGIO GUIMARÃES**

ORIENTADOR: PROFA. Dra. KÁTIA CRISTINA KUPPER

CO-ORIENTADOR: Dra. MARINÊS BASTIANEL

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

Araras/SP

2012

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

G963mm

Guimarães, Christiano Grêgio.

Manejo da mancha preta dos citros através da utilização de agentes de controle biológico / Christiano Grêgio Guimarães. -- São Carlos : UFSCar, 2012.  
42 f.

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

1. Agroecologia. 2. Fitopatologia. 3. Controle biológico. 4. Mancha preta dos citros. 5. *Citrus sinensis*. I. Título.

CDD: 630 (20<sup>a</sup>)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE  
**CHRISTIANO GRÉGIO GUIMARÃES**  
APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROECOLOGIA E  
DESENVOLVIMENTO RURAL, DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS,  
**EM 16 DE FEVEREIRO DE 2012.**

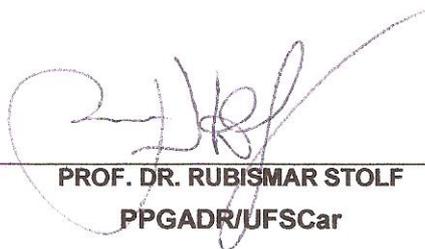
BANCA EXAMINADORA:



---

**PROFA. DRA. KÁTIA CRISTINA KÜPPER**

**ORIENTADORA  
PPGADR/UFSCar**



---

**PROF. DR. RUBISMAR STOLF**

**PPGADR/UFSCar**



---

**PROFA. DRA. ÉLIDA BARBOSA CORREA**

**UFRB/BA**

*Dedico a...*

*...um Deus (YHWH) no qual eu creio e que crê em mim.*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Centro APTA Citros Sylvio Moreira – IAC – Cordeirópolis/SP e a Universidade Federal de São Carlos – UFSCar.

A orientação e paciência da Dra. Kátia Cristina Kupper e co-orientação da Dra. Marinês Bastianel, uma pessoa que tenho profunda admiração por seu coração que custa a caber no peito.

Aos meus pais:

Minha mãe Fátima, por sempre me lembrar da aliança que possuímos com Deus...

Meu pai Mauro, por me dar o tempo que preciso para me encontrar e me ensinar na prática que todo trabalho é digno; que posso receber todos os títulos, honras e honorários, mas sempre com o grande coração de guerreiro e humildade de um frentista noturno que fui...

Ao meu amor, Thaís Jolli por ter compreendido minhas oscilações e ausências.

À Marli, por ceder sua casa, que por meses foi meu lar, laboratório e escritório.

Ao meu irmão Gabriel por ser parceiro, um bom irmão e um bom filho.

E aos meus amigos-irmãos: César, Ivens e Kleber pelas cervejas bem geladas quando precisei.

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

Francisco Eduardo Corrêa

## SUMÁRIO

	Página
ÍNDICE DE TABELAS .....	i
ÍNDICE DE FIGURAS .....	ii
RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	iv
1. INTRODUÇÃO .....	05
2. REVISÃO DA LITERATURA .....	08
2.1 Importância da cultura .....	08
2.2 Ocorrência e importância da doença .....	10
2.3 Sintomas .....	11
2.4 Agente causal .....	13
2.5 Epidemiologia .....	14
2.6 Controle convencional .....	16
2.7 Controle biológico dentro do conceito agroecológico .....	17
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	22
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	27
5 CONCLUSÃO .....	35
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	36

**ÍNDICE DE TABELAS**

	Pag.
<b>Tabela 1.</b> Índice de doença da mancha preta dos frutos cítricos, em plantas de laranjeira 'Valência', após os tratamentos para aceleração da decomposição. Município de Botucatu/ SP, 2008/2009.....	27
<b>Tabela 2.</b> Redução do peso da matéria seca de folhas de laranjeira Hamlin, após as aplicações dos tratamentos para aceleração da decomposição. Município de Araras/ SP, 2009/2010.....	29
<b>Tabela 3.</b> Índice de doença da mancha preta dos frutos cítricos, em plantas de laranjeira 'Hamlin', após os tratamentos para aceleração da decomposição. Município de Araras/ SP, 2009/2010.....	30

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pag.
<p><b>Figura 1.</b> Sintomas da mancha preta dos citros em frutos. (1) falsa melanose, (2) mancha trincada, (3) mancha sardenta, (4) mancha rendilhada, (5) mancha dura e (6) mancha virulenta.....</p>	12
<p><b>Figura 2.</b> Sintomas da mancha preta dos citros em folhas. Fonte: Fundecitros, 2003.....</p>	13
<p><b>Figura 3.</b> Efeito de agentes de biocontrole na decomposição das folhas de citros, como medida auxiliar no controle da mancha preta dos frutos cítricos, causada por <i>Guignardia citricarpa</i>, expresso pela avaliação da severidade da doença em plantas de laranjeira 'Hamlin'. Município de Araras/ SP, 2009/2010. Nota 0 = ausência de sintomas; 1 = 0,5%; 2 = 1,1%; 3 = 1,7%; 4 = 4,5%; 5 = 5,0%; 6 = 11,5%; 7 = 15,0%; 8 = 22,5%; 9 = 31,0%; 10 = 49,0%; 11 = 53,0% e 12 = 68,0% da área coberta com os sintomas (Spósito, 2003). <sup>(1)</sup> Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si (Duncan, <math>P \geq 0,05</math>). <sup>(2)</sup> ACB-AP3 (<i>Bacillus subtilis</i>); ACB-83 (<i>B. subtilis</i>); ACB-40 (<i>Trichoderma</i> sp.) e ACB-37 (<i>T.pseudokoninguii</i>).....</p>	33

## **MANEJO DA MANCHA PRETA DOS CITROS ATRAVÉS DA UTILIZAÇÃO DE AGENTES DE CONTROLE BIOLÓGICO**

**Autor: CHRISTIANO GRÈGIO GUIMARÃES**

**Orientador: Profa. Dra. KÁTIA CRISTINA KUPPER**

**Co-orientador: Profa. Dra. MARINÊS BASTIANEL**

### **RESUMO**

O setor citrícola enfrenta sérios problemas representados por doenças que, além de diminuir a produtividade, depreciam os frutos pelo aspecto que conferem aos mesmos. Dentre tais doenças encontra-se a mancha preta dos citros, causada por *Guignardia citricarpa*. A medida predominante de controle desta doença corresponde às aplicações com produtos químicos. Considerando-se os custos financeiros, ambientais e de saúde pública destas aplicações, as crescentes restrições à presença de resíduos em frutas frescas e, a possibilidade de seleção de linhagens resistentes dos patógenos aos fungicidas, faz-se necessário o estudo de novas alternativas de controle. Portanto, este trabalho teve por objetivo estudar a utilização de diferentes agentes de biocontrole, sob condições de campo, através de aplicações de *Bacillus subtilis*, *Trichoderma* spp., uréia e combinação dos produtos comerciais Soil-Set<sup>®</sup> + Compostaid<sup>®</sup> sobre as folhas de citros caídas ao solo, visando reduzir a produção de ascósporos direta e, indiretamente, pela aceleração da decomposição das mesmas. Os resultados encontrados neste trabalho mostraram a viabilidade de tais aplicações, como medida auxiliar no manejo de controle da mancha preta dos citros.

## MANAGEMENT OF CITRUS BLACK SPOT THROUGH THE USE OF BIOLOGICAL CONTROL AGENTS

**Author: CHRISTIANO GRÈGIO GUIMARÃES**

**Adviser: Profa. Dra. KÁTIA CRISTINA KUPPER**

**Co-adviser: Profa. Dra. MARINÊS BASTIANEL**

### ABSTRACT

The citrus industry faces serious problems represented by diseases that reduce the productivity and depreciate the fruits that give the appearance thereof. Among these diseases the citrus black spot caused by *Guignardia citricarpa* is one of the most important. As the predominant control of this disease is related to the chemical application, the financial costs, environmental and public health of these applications, as well as the increasing restrictions on the presence of residues in fresh fruits, and the possibility of emergence of resistant strains of pathogens to fungicides, it is necessary to study new control alternatives. Therefore, this work aimed to investigate the use of biocontrol agents, under field conditions, by applications of *Bacillus subtilis*, *Trichoderma* spp., uréia e combinação dos produtos comerciais Soil-Set<sup>®</sup> + Compostaid<sup>®</sup> on the citrus leaves that fallen to the ground, in order to reduce the production of ascospores directly and, indirectly, by acceleration of the decomposition of citrus leaves. The results of this work showed the viability of such applications as a help during the disease management to control of citrus black spot.

## 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 et al., 2010). A cultura está assentada em uma área aproximada de 839 mil hectares, dos quais 77% encontram-se localizados na região sudeste do país. Em torno de 80% da produção de laranja no estado de São Paulo 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). As exportações totais no setor citrícola no triênio 2007 a 2009 ultrapassaram 2,0 bilhões de dólares anuais (NEVES et al., 2010).

Não obstante a importância dessa cultura, o setor citrícola enfrenta sérios problemas representados por doenças fúngicas que, além de diminuírem a produtividade, depreciam os frutos pelo aspecto que conferem aos mesmos. Dentre tais doenças encontra-se a mancha preta dos frutos cítricos (MPC).

A MPC foi descrita pela primeira vez em 1895, na Austrália, afetando frutos de laranja 'Valência', tanto em pomares, como em fase de pós-colheita (KIELY, 1948b). A doença encontra-se assinalada em vários países da África (Moçambique, Zimbábue, África do Sul), Ásia (China, Coreia, Hong Kong, Filipinas, Indonésia, Taiwan e Japão), Oceania (Austrália) e América do Sul (Argentina, Brasil, Uruguai e Peru) (KIELY, 1948b; KOTZÉ, 1963; KOTZÉ, 1988).

A mancha preta ou pinta preta, como também é designada, é causada pela forma perfeita (teleomorfa) do fungo – *Guignardia citricarpa* Kiely, cuja forma imperfeita (anamorfa) corresponde a *Phyllosticta citricarpa*. Segundo Azevedo (1998), são muitos os microrganismos endofíticos em plantas, habitando de modo geral suas partes aéreas como folhas e caules. Evidentemente há sobreposições entre esses grupos de microrganismos. Assim, um endófito, de acordo com as condições do ambiente e das próprias

condições fisiológicas da planta, pode ser considerado um patógeno latente. Nessa linha, o fungo *G. citricarpa* sobrevive na forma de infecções latentes nas folhas de laranjeiras (KOTZÉ, 1988) e, a partir dessas, quando caídas ao solo, são formados os ascósporos, constituindo a fonte primária do inóculo do fungo (McONIE, 1965). A maturação dos ascósporos leva de 40 a 180 dias, a contar da queda das folhas, sendo fortemente influenciada por características do manejo e por fatores do ambiente (KOTZÉ, 1963).

Considerando que a queda natural das folhas das plantas cítricas pode ocorrer em maior ou menor extensão durante todo o ano, alguns fatores como estresse hídrico, desbalanço nutricional, pragas e doenças podem agravar ou não essa abscisão. Como os ascósporos são formados nessas folhas, teoricamente existe o potencial de que essas estruturas sejam formadas durante todo o ano. Contudo, as condições climáticas prevaletentes têm maiores ou menores impactos na sua viabilidade e, rapidez na sua produção (BETTIOL et al., 2009).

A MPC não afeta a qualidade dos frutos (FAGAN & GOES, 2000), porém, provoca a depreciação do fruto para o mercado interno de fruta fresca e para exportação à União Européia, o maior importador dos frutos cítricos brasileiros (NEVES et al., 2001).

Atualmente, o uso de produtos químicos é a principal medida de controle da MPC. O controle baseia-se principalmente, na utilização de fungicidas protetores ou sistêmicos, isoladamente ou combinados, associados ou não a óleo mineral (GOES et al., 1990; GOES, 1998; KOTZÉ, 1988). Na África do Sul, dada à eficiência dos grupos químicos sistêmicos benzimidazóis, houve a utilização em grande escala e freqüência, provocando a seleção de linhagens resistentes de *G. citricarpa*, com relatos, inclusive desde 1985 (HEBERT & GRENCH, 1985). Por outro lado, os compostos à base de cobre, como também, aqueles à base de enxofre elementar e ditiocarbamatos, considerados fungicidas não-específicos com mais de um modo de ação, podem causar efeito fitotóxico quando penetram na cutícula do fruto (KÖLLER, 1998).

Considerando-se (a) as características biológicas do fungo *G. citricarpa* e a dinâmica da doença; (b) os custos financeiros, ambientais e de saúde

pública das aplicações dos produtos químicos para o controle da doença; (c) as crescentes restrições à presença de resíduos em frutas frescas, e (d) a possibilidade de seleção de linhagens resistentes dos patógenos aos fungicidas, faz-se necessário o estudo de novas alternativas para o controle da MPC. Entre elas, a utilização de agentes de biocontrole para o manejo da doença sob condições de campo, visando reduzir a produção e a viabilidade dos ascósporos pela decomposição das folhas cítricas caídas ao solo, poderá ser uma medida auxiliar, de maneira a diminuir a utilização de produtos químicos na citricultura.

Dentre os antagonistas mais estudados, encontra-se a bactéria *Bacillus subtilis*, a qual vem se destacando no controle de doenças do filoplano (KUPPER & GIMENES-FERNANDES, 2002; KUPPER et al., 2003) e, espécies de fungos do gênero *Trichoderma*, com eficiência de controle até mesmo no que se refere aos fitopatógenos de parte aérea, quando aplicadas em pulverizações (MORETTO et al., 2001).

Portanto, o presente trabalho teve por objetivo estudar a potencialidade antagonística de diferentes tratamentos (*Bacillus subtilis*, *Trichoderma* spp., uréia e combinação dos produtos comerciais Soil-Set<sup>®</sup> + Compostaid<sup>®</sup>) em relação a *G. citricarpa*, aplicados através de pulverizador equipado com barra aplicadora de herbicida, calibrados para volume de 600L/ha (Bico leque - primeira reduzida/1.300 rpm), sobre folhas caídas ao solo e em particular um único tratamento do segundo ensaio, que combinou aplicações no solo com aplicações no filoplano, este último com atomizador calibrado para volume de 6.250/ha (Bico leque - segunda reduzida/2.000 rpm). Em ambos os ensaios foram realizadas cinco aplicações, com intervalo de 30 dias entre as mesmas sob condições de campo no intuito de gerar informações e tecnologias que permitam o manejo de uma das principais doenças fúngicas de citros, de forma econômica e racional, com vistas à otimização do controle da doença.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Importância da cultura**

Registros apontam que a laranja é originária do sul asiático, provavelmente da China, por volta de 4.000 anos atrás. O comércio entre as nações e as guerras ajudaram a expandir o cultivo dos citros, de modo que, na idade média, a laranja foi levada pelos árabes para a Europa. Nos anos de 1500, na expedição de Cristóvão Colombo, mudas de frutas cítricas foram trazidas para o continente americano. No Brasil, a cultura foi introduzida no início da colonização, onde encontrou melhores condições para vegetar e produzir do que nas próprias regiões de origem, expandindo-se por todo o território nacional (NEVES et al., 2010).

A citricultura destacou-se em vários Estados, porém, foi a partir da década de 1920 que se criou o primeiro núcleo citrícola nacional nos arredores de Nova Iguaçu no Estado do Rio de Janeiro. Esse núcleo abastecia as cidades do Rio de Janeiro e de São Paulo, além de iniciar as exportações de laranjas para a Argentina, Inglaterra e alguns outros países europeus. Após essa fase, a cultura seguiu os caminhos da cafeicultura, que sofria uma significativa extração da área plantada em função da geada em 1918, da crise financeira mundial, da seca na década de 1920. Diante desses problemas, a laranja foi caminhando para a região do Vale do Paraíba no interior paulista na década de 1940, tornando-se uma opção para substituir o café na região de Limeira – SP, chegando posteriormente a Araraquara em 1950 e em Bebedouro ao final da década, ganhando cada vez mais espaço nas novas fronteiras ao norte e noroeste do Estado de São Paulo (NEVES et al., 2010).

Atualmente, o Brasil e os Estados Unidos da América detêm mais da metade da produção, ficando o restante dividido entre mais de 100 países, cuja produção, até o momento chega a 47 milhões de toneladas. Neste cenário o Brasil é o maior produtor mundial de laranja, estando a cultura presente por mais de 3.000 municípios, respondendo por cerca de 30% da produção da fruta, 50% da produção de suco, com 98% de exportação e participação de

85% do suco comercializado internacionalmente (NEVES et al., 2010). A cultura está assentada em uma área aproximada de 839 mil hectares, com quase 165 milhões de árvores produzindo, dos quais 77% encontram-se localizados na região sudeste do país, cerca de 565 mil hectares distribuídos em 330 municípios e em 29.000 propriedades movimentando cerca de R\$ 9 bilhões/ano e gerando mais de 400 mil empregos diretos e indiretos. Somente na safra 2009/2010, a produção brasileira foi de 397 milhões de caixas de laranja de 40,8 Kg gerando em torno de R\$ 340 milhões em impostos (AGRIANUAL, 2011).

As exportações totais no setor citrícola no triênio 2007 a 2009 ultrapassaram 2,0 bilhões de dólares anuais (NEVES et al., 2010). Assim, a citricultura moderna é uma grande vitrine para evidenciar o modelo “indústria + agricultura”, proveniente da entrada do capitalismo no campo, em conjunção com o modelo industrial, e suas mudanças estruturais; reflexo este da revolução verde (COSTA, 2001).

As concepções de citricultura agroecológica, ao se prenderem à necessidade de substituição de defensivos por outros menos impactantes (biológicos), não consideram a lógica capitalista de exploração dos recursos naturais e dos homens como principal responsável pela crise social e ecológica que vivemos. O que ocorre, em muitos casos, são substituições de insumos ou de algumas técnicas e a reprodução da mesma lógica industrial, sem ao menos a promoção da reestruturação ecológica do agroecossistema (ALTIERE, 2002; GUZMÁN CASADO et al., 2000).

O que se propõe é uma forma de entender a crise ecológica e social da modernidade e formular estratégias de transformação e de embate como modelo industrial de produção, através da busca de outras formas de conhecimento que considerem o conjunto das relações sociais em suas dimensões tanto econômicas quanto políticas e culturais e, por tanto, para além de uma perspectiva subparadigmática norteadoras de uma ação técnica e social efetiva. Para o enfoque de uma citricultura agroecológica é necessário considerar que, se a crise ecológica no campo é um reflexo da própria racionalidade científica moderna, a superação desta crise passa necessariamente pelo

entendimento de que racionalidade é essa e quais são os pressupostos epistemológicos que guiaram a prática científica dos profissionais e cientistas que tem, mesmo inconscientemente, como premissas filosóficas. Desta forma, mesmo em via de mão dupla, os dados citados evidenciam além da importância econômica, uma importância social no qual milhares de famílias estão ligadas direta ou indiretamente à citricultura, dependendo da mesma para sobrevivência (NORGAARD & SIKOR, 2002).

## **2.2. Ocorrência e importância da doença**

A MPC foi descrita pela primeira vez em 1895, na Austrália, afetando frutos de laranja 'Valência', tanto em pomares, como em fase de pós-colheita (KIELY, 1948b). A doença ocorre na Austrália; em países da África, como Moçambique, Swazilândia e Zimbábue; da Ásia, como China, Indonésia, Taiwan e Japão, e América do Sul, como Argentina, Brasil e Peru (KIELY, 1948ab; KOTZÉ, 1963; KOTZÉ 1988).

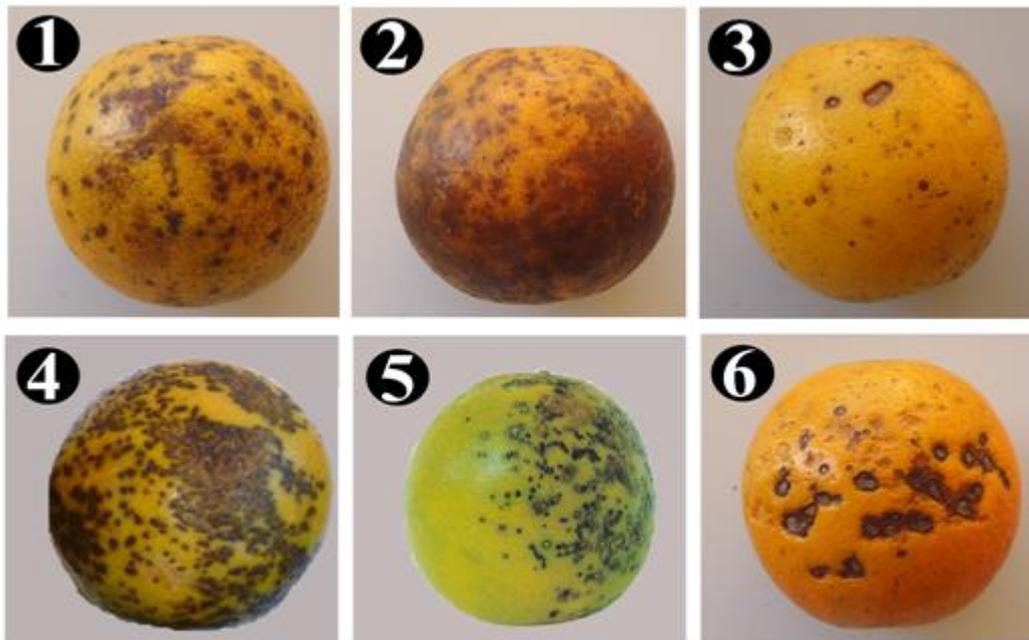
No Brasil, a doença foi inicialmente observada em frutos das variedades 'Pêra' e 'Seleta', em feira livre de Piracicaba, São Paulo, entre 1938 e 1940 (AVERNA-SACCÁ, 1940). Nos anos seguintes não foram observados sintomas e, somente na década de 80 foi registrado o seu restabelecimento junto a citricultura do Estado do Rio de Janeiro (ROBBS et al., 1980). No Estado de São Paulo, em 1992, foi novamente verificada, porém causando elevados prejuízos em limão 'Siciliano', na região de Mogi-Guaçu (GOES & FEICHTENBERGER, 1993). Atualmente, acredita-se em números relativamente maiores, no entanto em 1999 a doença encontrava-se assinalada em 44 municípios do Estado de São Paulo, em áreas altamente representativas da citricultura paulista (PINTA PRETA, 1999).

A MPC não afeta a qualidade dos frutos, porém, provoca a depreciação do fruto para o mercado interno de fruta fresca e para exportação à União Européia, o maior importador dos frutos cítricos brasileiros, além da forte pressão dos importadores, no que diz respeito à segurança fitossanitária –

entendida como uma necessidade essencial o fato da fruta apresentar a menor quantidade possível de resíduos agroquímicos, infestação por pragas e contaminação microbiológica (FAGAN & GOES, 2000).

### **2.3. Sintomas**

De modo geral, os sintomas característicos da doença são verificados nos frutos, especialmente a partir da fase de transição verde/maduro, e se caracterizam pela presença de lesões inicialmente pardo-avermelhadas e, posteriormente escuras, deprimidas e com centro acinzentado, contendo pontuações negras. Os pontos escuros indicam a presença de picnídios. O número de lesões por fruto pode variar de uma a centenas, havendo às vezes coalescência entre elas. Essas lesões restringem-se apenas à casca, não atingindo o albedo, prejudicando a comercialização dos frutos para o mercado de frutas frescas, além disso, os frutos afetados podem cair prematuramente. Segundo dados da Fundecitrus (2003), nos frutos podem ser observados seis diferentes tipos de sintomas (Figura 1).



**Figura 1.** Sintomas da mancha preta dos citros em frutos. (1) falsa melanose, (2) mancha trincada, (3) mancha sardenta, (4) mancha rendilhada, (5) mancha dura e (6) mancha virulenta.

Os sintomas em folhas (Figura 2) e ramos, de um modo geral, são menos freqüentes, porém quando observados em folhas, as lesões têm um centro acinzentado, bordos salientes marrom-escuros, com um halo amarelado ao redor, iguais aos sintomas da mancha preta em frutos (FEITCHTENBERGER et al., 1997). As lesões em folhas são encontradas com mais freqüência em tangerinas e limões verdadeiros.



**Figura 2.** Sintomas da mancha preta dos citros em folhas. Fonte: Fundecitrus, 2003.

#### **2.4. Agente causal**

A mancha preta ou pinta preta, como também é designada, é causada por *Guignardia citricarpa* Kiely, cuja forma imperfeita corresponde a *Phyllosticta citricarpa*.

*Guignardia citricarpa* produz pseudotécios e ascósporos somente em folhas em decomposição no solo. Os pseudotécios são isolados ou agregados, globosos, e apresentam um ostíolo circular, não papilado. Os ascos são cilíndrico-clavados, bitunicados, tendo no seu interior, oito ascósporos, unicelulares, hialinos, multigutulados, cilíndricos com centro dilatado e apêndices hialinos nas duas extremidades obtusas (SUTTON & WATERSON, 1985).

*Phyllosticta citricarpa* produz picnídios em lesões de frutos e folhas e, ocasionalmente, no pedúnculo de frutos (FEICHTENBERGER et al., 1997).

## 2.5. Epidemiologia

O fungo *G. citricarpa* sobrevive na forma de infecções latentes nas folhas de laranjeiras (KOTZÉ, 1981) e, que a partir dessas, quando caídas ao solo, são formados os ascósporos, constituindo a fonte primária do inóculo do fungo (McONIE, 1965). O início da produção dos ascósporos dá-se cerca de 50 a 180 dias após a queda das folhas (KOTZÉ, 1981). Normalmente a descarga dos ascósporos acompanha as chuvas, de tal forma que três meses podem ser suficientes para sua liberação, desde que haja umidade prévia sobre as folhas. O molhamento e a secagem das folhas, de forma alternada, são vitais para o desenvolvimento dos peritécios (KIELY, 1948a). Dependendo da intensidade de precipitação, através de armadilhas do tipo caça-esporos é possível detectar os ascósporos cerca de 30 a 90 minutos após o início das chuvas. Na superfície dos órgãos suscetíveis, os ascósporos germinam e produzem estruturas de fixação denominadas apressórios. Uma delgada hifa de infecção é formada a partir do apressório, penetrando através da cutícula, formando uma pequena massa de micélio subcuticular quiescente. O fungo pode permanecer dormente até por doze meses. Esse período de dormência pode ser interrompido quando o fruto atinge o seu tamanho final e inicia a maturação, ou quando as condições ambientes tornam-se favoráveis. O fungo cresce então, a partir do micélio subcuticular e, colonizando tecidos mais internos, o que resulta no aparecimento dos sintomas típicos da doença (McONIE, 1967).

A queda natural das folhas das plantas cítricas pode ocorrer, em maior ou menor extensão, durante todo o ano. Entretanto, alguns fatores como estresse hídrico, desbalanço nutricional, pragas e doenças podem agravar essa abscisão. Como os peritécios e os ascósporos são formados nessas folhas, teoricamente existe o potencial de que essas estruturas sejam formadas durante todo o ano. Contudo, as condições climáticas prevaletentes têm maiores ou menor impacto na sua viabilidade e rapidez na sua produção.

*Phyllosticta citricarpa* produz os conídios que somente são dispersos a curtas distâncias (KOTZÉ, 1963). Essas estruturas reprodutivas são produzidas

em picnídios que se formam em lesões de frutos e em folhas, os quais emergindo através do ostíolo são carregados pela água até a superfície dos órgãos suscetíveis, localizados abaixo, onde novas infecções podem ser iniciadas (KIELY, 1948a). Os conídios são importantes na epidemia da doença, quando coexistem na mesma planta, frutos infectados contendo esses esporos, e frutos jovens suscetíveis, ou seja, frutos de até 4-5 meses de idade, a contar da queda das pétalas (KOTZÉ, 1963).

Aparentemente, para as condições do Brasil, é possível que, devido aos padrões de florescimento e frutificação freqüentemente observados, os conídios constituam-se em importante fonte adicional de inóculo (FEICHTENBERGER, 1996). A superposição de floradas e ocorrência simultânea de frutos maduros com sintomas, além da presença de frutos em estádios de suscetibilidade possibilita esta condição.

De um modo geral, a manifestação de sintomas da mancha preta é favorecida por vários fatores, dos quais o mais importante é a maior exposição dos frutos à radiação solar intensa e às temperaturas elevadas (FEICHTENBERGER, 1996). Plantas velhas e estressadas por várias causas são mais sujeitas à doença do que as sadias e vigorosas (KOTZÉ, 1963). Todos os fatores que culminam com a queda das folhas contribuem indiretamente para o incremento da mancha preta e, dentre estes, incluem-se doenças como leprose, melanose, gomose, declínio, etc; pragas como ácaros, coleópteros, larva minadora, etc; estiagem prolongada, geada, desequilíbrio nutricional e, ataques de nematoides (GOES, 1998).

## 2.6. Controle convencional

O uso de produtos químicos é a principal medida de controle da mancha preta dos citros. Segundo Calavan (1960), os primeiros grupos químicos foram adotados pela Austrália e África do Sul em meados da década de 50. O controle baseia-se, principalmente, na utilização de fungicidas protetores ou sistêmicos, isoladamente ou combinados, associados ou não a óleo mineral (GOES et al., 1990; GOES, 1998; KOTZÉ, 1988). Bons resultados de controle têm sido obtidos com intervalos de pulverizações de 50 a 55 dias, no caso de fungicida sistêmico + protetores (GOES, 1998), e de 28 dias para os fungicidas protetores (SCHUTTE et al., 1997).

Na África do Sul, dada à eficiência dos grupos químicos sistêmicos benzimidazóis, houve a utilização em grande escala e freqüência, provocando a seleção de linhagens resistentes de *G. citricarpa*, com relatos, inclusive desde 1985 (HEBERT & GRECH, 1985). Por outro lado, os compostos à base de cobre, como também, aqueles à base de enxofre elementar e ditiocarbamatos, considerados fungicidas não-específicos com mais de um modo de ação, podem causar efeito fitotóxico quando penetram na cutícula do fruto (KÖLLER, 1998).

## **2.7. Controle biológico dentro do conceito agroecológico**

Segundo Gliessman (2001) a desconsideração dos processos ecológicos na agricultura pode promover perdas de matéria orgânica, lixiviação de nutrientes, contaminação de fontes de água, degradação e aumento da erosão do solo. O autor afirma ainda que, não bastando as contaminações, os efeitos físico-químicos e a seleção de linhagens resistentes de patógenos aos produtos químicos mais utilizados, a destruição em massa dos antagonistas naturais e problemas relacionados à saúde pública poderão ocorrer.

Ricardo & Campanili (2005) mencionaram que nas décadas de 1920 e 1930, começaram a surgir opositores ao padrão mecanizado, genético da agricultura e químico de produção, o que impulsionou o surgimento de algumas vertentes alternativas que valorizavam o potencial biológico dos processos produtivos. A produção agroecológica e suas diversas modalidades (orgânica, natural, biológica, biodinâmica, permacultura, ecológica) tiveram início na Europa, na década de 1920, com a experiência de pequenos grupos de agricultores e o acompanhamento de especialistas, pesquisadores e filósofos, que na época não encontraram recepção fácil às suas idéias. Também no Japão (década de 1930) e nos Estados Unidos (1940), a agricultura orgânica começou a chamar a atenção de grupos de produtores, professores e especialistas, ficando restrita à poucos interessados. Foi somente nas décadas de 1960 e 1970, fruto da crescente consciência ambiental mundial, que a Agroecologia se firmou como opção concreta de atividade econômica, ciência e modo de vida na agricultura. Em novembro de 1972, na França, cria-se a IFOAM - Federação Internacional dos Movimentos de Agricultura Orgânica - hoje com sede na Alemanha. A IFOAM passou a reunir centenas de entidades e pessoas físicas ligadas à agricultura ecológica no mundo todo e a Agroecologia começou a se fortalecer. Não obstante, no final da década de 1960, tornaram-se mais evidentes os danos ambientais provocados pela agricultura convencional, especialmente porque este período coincide com a chamada revolução verde, que entre outros padrões tecnológicos, enfatizava o

uso de agrotóxicos com maior poder biocida e a produção de monoculturas em larga escala (ALMEIDA, 2001).

Segundo Burg & Mayer (1999), as etapas para que se tenha um manejo agroecológico adequado são: (a) reconhecimento das pragas-chave da cultura: identificar qual o organismo que causa maior dano à cultura é fundamental para a adoção de práticas que incentivem a reprodução de seus principais inimigos naturais ou que criem condições ambientais desfavoráveis à multiplicação do organismo indesejável; (b) reconhecimento dos inimigos naturais dos fitopatógenos presentes na cultura: conhecer as principais espécies de inimigos naturais e favorecê-las através de diversas práticas, como manejo do mato nativo, adubação orgânica, preservação de fragmentos florestais e consórcios, entre outras; (c) amostragem da população dos organismos prejudiciais: monitorar a presença do fitopatógeno através de vistoria das plantas (% de dano em caso de doenças fúngicas ou bacterianas) e (d) escolher e utilizar as táticas de controle: determinadas doenças persistem no ambiente e podem ultrapassar os limites do equilíbrio. Nestes casos, a adoção apenas de medidas preventivas não é suficiente. Assim, quando existem ameaças destes organismos promoverem um dano econômico às culturas, se faz necessário a adoção de práticas como controle biológico.

São três os tipos de controle biológico encontrados na literatura: (a) clássico (introdução de organismos para controle de uma praga numa dada região), (b) natural (favorecer as populações de inimigos naturais, por exemplo, não usando produtos químicos que os afetem) e (c) aplicado (multiplicação em laboratório dos inimigos naturais e aplicação em campo) (MARACAJÁ, 2005).

Considerando-se as características biológicas do fungo *G. citricarpa* e a dinâmica da doença; os custos financeiros, ambientais e de saúde pública das aplicações dos produtos químicos para o controle da doença; as crescentes restrições à presença de resíduos em frutas frescas, a carência de controle, principalmente por parte da produção de caráter orgânico e a possibilidade da seleção de linhagens resistentes dos patógenos aos fungicidas, faz-se necessário o estudo de novas alternativas de controle. Entre elas, a utilização de agentes de biocontrole durante o manejo da doença sob condições de

campo, visando reduzir a produção e a viabilidade dos ascósporos pela decomposição das folhas cítricas caídas ao solo, poderá ser uma medida auxiliar, de maneira a diminuir a utilização de produtos químicos na citricultura.

Dentre os antagonistas mais estudados, encontra-se a bactéria *Bacillus subtilis*, a qual vem se destacando no controle de doenças do filoplano (KUPPER, & GIMENES-FERNANDES, 2002; KUPPER et al., 2003) e, espécies de fungos do gênero *Trichoderma*, com eficiência de controle até mesmo no que se refere aos fitopatógenos de parte aérea, quando aplicadas em pulverizações (MORETTO et al., 2001).

De acordo com Melo (1998), o gênero *Trichoderma*, pertencente à Ordem Hypocreales, é representado por fungos não patogênicos, que são habitantes do solo. Suas espécies representam os fungos mais estudados e utilizados que possuem atividades antagonistas a fitopatógenos presentes no solo, especialmente em orgânicos, que pode viver saprofiticamente ou parasitando outros fungos.

As principais características para que agentes de controle biológico sejam eficientes, dizem respeito à capacidade de competirem por nutrientes, de produzirem antibióticos ou de atuarem por parasitismo direto e lise. Estas características estão de acordo com Elad et al., (1980) que afirmaram ainda, que as espécies de *Trichoderma*, que possuem capacidade para hiperparasitarem fungos patogênicos, podem ser classificadas como antagonistas altamente eficientes.

De acordo com Moretto et al., (2001), isolados de *Trichoderma* spp. testados produziram metabólitos, *in vitro*, capazes de inibirem o crescimento micelial de *Colletotrichum acutatum*. Isolados de *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viride*, *Trichoderma aureoviride*, *Trichoderma virens*, *Trichoderma pseudokoningii* e *Trichoderma* sp. foram capazes de prevenir a infecção em flores de lima ácida 'Tahiti', quando aplicados 24 horas antes da inoculação com *C. acutatum*.

Muitos estudos têm sido feitos com a utilização de bactérias antagonistas 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, aumenta sua capacidade de sobrevivência 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).

Grande parte dos trabalhos enfocando controle biológico pelo gênero *Bacillus* enfatiza a espécie *Bacillus subtilis*, que é tipicamente uma rizobactéria, que se associa às folhas formando biofilme com características ecológicas de simbiose (ASAKA & SHODA, 1996; DAVEY & O'TOOLE, 2000; KILIAN et al., 2000; GARDENER, 2004). É tida como uma das espécies biocontroladoras mais eficazes por apresentar atividade biológica contra uma série de microrganismos causadores de doenças de plantas.

Kalita et al., (1996) isolaram espécies de bactérias (*Bacillus subtilis*, *Bacillus polymyxa* e *Pseudomonas fluorescens*) e espécies de fungos (*Aspergillus terreus*, *T. viride* e *T. harzianum*) a partir da parte aérea de plantas cítricas, os quais mostraram antagonismo *in vitro* a *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. Dentre os antagonistas testados, *B. subtilis* foi o que produziu maior zona de inibição ao patógeno (14,7 mm). Sob condições de casa de vegetação, *B. subtilis* causou redução na incidência da doença em torno de 61,9%, quando aplicado simultaneamente à inoculação com células de *X. axonopodis*. Estudos foram conduzidos em condições de campo, em três pomares de laranja 'Natal', na Flórida, para determinar a eficiência de *B. subtilis* Kodiak<sup>®</sup> na redução da podridão floral dos citros. Poucas flores foram infectadas e poucos cálices ficaram retidos, em árvores protegidas com a bactéria, quando comparado ao controle, além de que o "pegamento" das flores foi maior em plantas inoculadas com *B. subtilis* (SONODA & GUO, 1996).

No Brasil, Kupper & Gimenes-Fernandes (2002) estudaram a potencialidade antagonística de 64 isolados de *B. subtilis* a *Colletotricum 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 controlaram em 100% da

doença em flores destacadas de lima ácida 'Tahiti'. Dentre sete isolados de *B. subtilis* testados para o controle da queda prematura dos frutos cítricos, em condições naturais de ocorrência da doença, um deles, o ACB-69, diferiu da testemunha (sem controle) e equiparou-se, estatisticamente, ao fungicida benomyl, proporcionando menor porcentagem de flores com sintomas e maior número médio de frutos efetivos (KUPPER et al., 2003).

De acordo com Kupper et al. (2011), os bons resultados da ação antagonística de quinze isolados de *Trichoderma* spp. testados para o controle de *P. citricarpa*, *in vitro*, não refletiu no controle da doença sob condições de campo. Por outro lado, os quatro isolados de *B. subtilis* testados foram capazes de inibir o crescimento micelial do fungo, quando em cultura pareada em placa de Petri, contendo batata-dextrose-ágar e, dentre esses, o ACB-69 apresentou potencialidade para controle da mancha preta dos frutos cítricos, sob condições de campo.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

Os antagonistas utilizados no presente estudo foram obtidos de amostras de solo (*Trichoderma* spp.) e de folhas e flores de citros (*Bacillus subtilis*) coletados em diferentes pomares de citros do estado de São Paulo (McONIE, 1965; KUPPER, 2002), encontrando-se preservados no Laboratório de Fitopatologia e Controle Biológico do Centro de Citricultura Sylvio Moreira/IAC, Cordeirópolis/SP. Dois experimentos foram implantados em diferentes safras de diferentes propriedades comerciais com histórico de alta incidência da doença. O primeiro ensaio foi realizado durante a safra 2008/2009 no município de Botucatu/SP, utilizando a variedade 'Valência' (*Citrus sinensis* Osbeck), enxertada sobre limoeiro 'Cravo' (*Citrus limonia* Osbeck.), espaçamento 7,0 x 3,5m, com 12 anos de idade e, os tratamentos testados, bem como as doses utilizadas foram:

- 1) Testemunha;
- 2) Uréia (12,5 g/litro);
- 3) Combinação dos produtos comerciais Soil-Set<sup>®</sup> + Compostaid<sup>®</sup> (0,75 mL/L + 0,75 g/L);
- 4) ACB-40 (*Trichoderma* sp.) (30 Kg/ha) e 5) ACB-AP3 (*B. subtilis*) a 10%.

O segundo ensaio foi instalado durante a safra de 2009/2010 no município de Araras/SP, utilizando a variedade 'Hamlin' (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) enxertada sobre limoeiro 'Cravo', em um espaçamento de 8,0 x 4,0 m, com 17 anos de idade e, os tratamentos testados foram:

- 1) Testemunha;
- 2) uréia (12,5 g/litro);
- 3) Combinação dos produtos comerciais Soil-Set<sup>®</sup> + Compostaid<sup>®</sup> (0,75 mL/L + 0,75 g/L);
- 4) ACB-40 (*Trichoderma* sp.) (30 Kg/ha);
- 5) ACB-37 (*T. pseudokoningii*) (30 Kg/ha);

- 6) isolado ACB-83 (*B. subtilis*) a 10%;
- 7) isolado ACB-AP3 (*B. subtilis*) a 10%;
- 8) isolado ACB- 83 (*B. subtilis*) a 10% - com aplicações combinadas no solo e na parte aérea da planta.

Em ambos os ensaios os tratamentos foram aplicados com  $\frac{3}{4}$  de pétalas caídas, sob (e sobre – em específico o tratamento da segunda safra ACB- 83 - *B. subtilis*) a copa das plantas, com pulverizador equipado com barra aplicadora de herbicida, calibrados para volume de 600L/ha (Bico leque - primeira reduzida/1.300 rpm), com exceção do oitavo tratamento do segundo ensaio que, além de aplicações sob a copa das plantas, combinou-se aplicações no filoplano com atomizador calibrado para volume de 6.250/ha (Bico leque - segunda reduzida/2.000 rpm). Foram realizadas cinco aplicações, com intervalo de 30 dias entre as mesmas, baseando-se nos intervalos já determinados pólo controle químico levando em consideração o pioneirismo do trabalho desenvolvivo. As aplicações seguiram as seguintes datas:

- 1) 03/12/2009,
- 2) 04/01/2010,
- 3) 03/02/2010,
- 4) 05/03/2010 e
- 5) 05/04/2010.

A multiplicação de *B. subtilis* foi realizada em meio composto de adubo foliar, originário da fermentação glutâmica do melaço a 5%, em condições controladas de incubação, durante 72 horas. O resíduo, denominado de Ajifol<sup>®</sup>, foi utilizado para multiplicação dos antagonistas por conter fontes de carbono, nitrogênio e sais, além de ser de baixo custo e ser utilizado em pomares de citros como adubo foliar. A concentração final de células bacterianas obtida foi de  $1 \times 10^8$  UFC/mL.

A multiplicação de *Trichoderma* spp. foi realizada em arroz parborizado (tipo 1), de maneira que em sacos de polipropileno autoclaváveis (25 x 35 cm)

foram colocados 500g de arroz, acrescido de 100 mL de água destilada e, duas horas após, foi submetido à esterilização em autoclave a 120°C e 1,5 atm de pressão por 30 minutos.

Para a obtenção da suspensão de inóculo de cada um dos isolados de *Trichoderma* spp., o fungo foi cultivado em placas de Petri, contendo batata-dextrose-ágar (BDA). Ao atingir sete dias de idade e apresentando intensa esporulação, a colônia do antagonista sofreu raspagem superficial, com o auxílio de lâmina de microscopia esterilizada. Posteriormente, o inóculo foi transferido para um recipiente contendo água destilada e esterilizada. O volume final obtido foi de 500 mL de suspensão, contendo uma concentração de  $10^8$  esporos/mL de *Trichoderma* spp. Em seguida, alíquotas de 10 mL foram retiradas e transferidas para o substrato de arroz. A incubação das culturas se deu por 15 dias em ambiente de laboratório.

Para facilitar as avaliações de peso seco das folhas em relação ao experimento da safra 2009/2010, as folhas de citros sob a copa das plantas foram coletadas e armazenadas em saquinhos denominados "litter bags" (150g de folhas/saquinho). Para cada tratamento, oito saquinhos (presos no solo por um grampo de ferro), foram colocados sob a copa das plantas centrais de cada parcela experimental. Cada saquinho correspondeu a uma época de amostragem. Assim, em oito datas diferentes os saquinhos foram recolhidos e levados ao laboratório para secagem do material em estufa a 70 °C, de modo que o peso seco fosse determinado. As datas das coletas foram:

- 1) 21/12/2009,
- 2) 05/01/2010,
- 3) 20/01/2010,
- 4) 04/02/2010,
- 5) 19/02/2010,
- 6) 06/03/2010,
- 7) 21/03/2010 e
- 8) 05/04/2010).

O controle de insetos e ácaros, bem como a adubação e os demais tratamentos culturais foram realizados de acordo com os padrões comerciais determinados pela propriedade. Uma vez que o ensaio teve o objetivo de determinar o efeito auxiliar da decomposição de folhas no controle da mancha preta dos frutos cítricos, a aplicação de fungicidas também seguiu o padrão recomendado, com exceção do tratamento que correspondeu à aplicação do ACB-83 no solo e na parte aérea, na safra 2009/2010.

O delineamento estatístico utilizado foi o de blocos ao acaso, constituído por cinco e oito tratamentos para as safras de 2008/2009 e 2009/2010, respectivamente, e quatro repetições, com 20 plantas por parcela.

As avaliações finais, envolvendo a quantificação da severidade da doença na área experimental, foram realizadas por ocasião da colheita dos frutos cítricos, por meio da atribuição de notas que representem a % da área coberta com os sintomas, de acordo com escala diagramática descrita por Spósito (2003), no qual:

0 = ausência de sintomas,

1 = 0,5%,

2 = 1,1%,

3 = 1,7%,

4 = 4,5%,

5 = 5,0%,

6 = 11,5%,

7 = 15,0%,

8 = 22,5%,

9 = 31,0%,

10 = 49,0%,

11 = 53,0% e

12 = 68,0%.

Foram avaliadas três plantas (safra 2008/2009) e quatro plantas (safra 2009/2010) centrais de cada parcela experimental, na rua central de cada bloco, num total de 100 frutos/planta (50 de cada lado da planta).

Posteriormente, os dados referentes aos níveis de severidade de sintomas foram transformados em índice de doença, segundo a fórmula adaptada de McKinney (1923):

$$ID = \frac{\sum_{k=1}^K F_k x_k}{n}$$

Onde,  $F_k$  = número de frutos com níveis variados de infecção;  $x_k$ ,  $k=0, 1, \dots, k$ , nas amostras;  $n$  = significa o número de frutos avaliados. A análise estatística utilizada foi a de variância (ANOVA) através do software ASSISTAT 7.6, e a comparação das médias pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos na primeira safra quanto à incidência da doença nos frutos, encontram-se na Tabela 1. A análise dos dados mostrou que, com exceção do ACB-40 (*Trichoderma* sp.), os demais tratamentos testados não diferiram estatisticamente da testemunha (sem tratamento) e, conseqüentemente, não contribuíram como medida auxiliar no controle da mancha preta dos frutos cítricos na região de Botucatu. Na comparação das médias, o tratamento ACB-AP3 (10%) (isolado de *B. subtilis*) não obteve bons resultados para tal finalidade, no entanto, manteve igual desempenho em comparação com produtos comercialmente reconhecidos como Soil-Set<sup>®</sup>+ Compostaid<sup>®</sup> e a uréia.

**Tabela 1.** Índice de doença da mancha preta dos frutos cítricos, em plantas de laranjeira ‘Valência’, após os tratamentos para aceleração da decomposição. Município de Botucatu/ SP, 2008/2009.

Tratamentos <sup>(2)</sup>	Médias <sup>(1)</sup>
Testemunha	4,39 a
Uréia	4,07 ab
ACB-AP3 (1X10 <sup>7</sup> UFC/mL)	4,00 ab
Soil-Set <sup>®</sup> + Compostaid <sup>®</sup>	3,59 ab
ACB-40 (1X10 <sup>7</sup> UFC/mL)	3,17 b

<sup>(1)</sup> Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si (Duncan, P<sub>≥</sub>0,05). <sup>(2)</sup> ACB-AP3 (*Bacillus subtilis*); ACB-40 (*Trichoderma* sp.).

A comparação entre os produtos de base biológica se dá pela necessidade de haver mais produtos que possam ser utilizados em substituição aos produtos químicos empregados na citricultura. No caso particular do produto comercial Soil-Set<sup>®</sup> + Compostaid<sup>®</sup>, a literatura informa que o mesmo compreende em sua composição uma mistura de microrganismos com atividade decompositora, além de apresentar substâncias nutritivas que ativam

a ação desses microrganismos. Diante dessa informação, acredita-se que o produto apresente uma ação rápida e mais intensa sobre a decomposição do material vegetal e, talvez seja essa a justificativa para o melhor desempenho do Soil-Set<sup>®</sup> + Compostaid<sup>®</sup>, quanto à decomposição das folhas de citros e conseqüente redução na severidade da MPC, como relatado nos estudos de Bellotte et al., (2009).

Para Stroo et al., (1989), a degradação de diferentes resíduos depende das condições locais e regionais como clima, tipo de solo, vegetação, fauna e microrganismos decompositores; além das propriedades do solo, tais como, argila, pH, matéria orgânica e aeração, de modo que todos podem atuar como fatores ambientais do processo de decomposição. Tais relatos explicariam o fato do produto Soil-Set<sup>®</sup> + Compostaid<sup>®</sup> aplicado na safra de 2008/2009, na região de Botucatu, não ter apresentado o mesmo desempenho encontrado nos estudos de Bellotte et al., (2009), embora o produto comercial não tenha diferido do melhor tratamento (*Trichoderma* sp.). Em contrapartida, no experimento avaliado na safra 2009/2010 em um pomar de laranjas 'Hamlin', onde foram utilizados os cinco tratamentos supracitados e a inclusão de outros três tratamentos (ACB 83, ACB 83 – com aplicações no solo e na parte aérea) e ACB 37 (*T. pseudokoninguii*), verificou-se que apenas os tratamentos com os isolados de *Trichoderma* e com o ACB-83 (aplicado apenas nas folhas caídas ao solo) reduziram o peso seco das folhas, principalmente, quando se observa os dados da última avaliação (Tabela 2).

**Tabela 2** – Redução do peso (gramas) da matéria seca de folhas de laranjeira Hamlin, após as aplicações dos tratamentos para aceleração da decomposição. Município de Araras/ SP, 2009/2010.

Tratamentos	Avaliações <sup>(1)</sup>							
	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>	5 <sup>a</sup>	6 <sup>a</sup>	7 <sup>a</sup>	8 <sup>a</sup>
Testemunha <sup>(2)</sup>	97,5 aA	97,5 aA	95,0 aA	94,7aA	85,5 aA	84,0 aA	84,8 aA	68,8 aA
Uréia	90,8 aA	87,0 abA	86,5 aA	60,2 aA	72,8 aA	79,2 aA	68,0 abA	64,0 abA
Soil-Set <sup>®</sup> +Compostaid <sup>®</sup>	92,5 aA	91,7aA	89,0 aA	88,0 aA	88,0 aA	73,0 aA	66,2 abA	52,3 abA
ACB-40	100,2 aA	80,3 abAB	82,7aAB	82,0 aAB	71,5 aAB	63,0 aAB	57,7 abAB	46,5 bB
ACB-37	100,0 aA	93,0 aAB	87,0 aAB	88,2 aAB	80,3 aABC	67,7 aABC	57,7 abBC	45,0 bC
ACB-83	92,0 aA	94,2 aA	92,7aA	86,0 aAB	71,8 aABC	51,5 aC	61,8 abBC	46,5 bC
ACB-AP3	100,0 aA	72,5 abAB	70,5 bAB	60,2 aAB	67,5 aAB	56,7aAB	67,2 abAB	51,5 abB
ACB-83 (solo + filoplano)	82,3 aA	64,5 bA	86,5 aA	66,5 aA	59,8 aA	75,5 aA	48,5 bA	54,3 abA

<sup>(1)</sup> Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem estatisticamente entre si (Tukey,  $P \geq 0,05$ ). <sup>(2)</sup>ACB-AP3 (*Bacillus subtilis*); ACB-83 (*B. subtilis*); ACB-37 (*Trichoderma pseudokoninguii*) e ACB-40 (*Trichoderma* sp.). Intervalo das avaliações: 15 dias.

De acordo com Tauk (1988), a decomposição do material vegetal exógeno envolve pelo menos três grupos distintos de microrganismos: celulolíticos, pectinolíticos e lignolíticos. Em geral, a degradação de um substrato complexo, como a folha, processa-se rapidamente na presença de uma comunidade microbiana do que na presença de uma única população. Considerando o contexto e não desconsiderando a população microbiana existente no solo no momento da aplicação, acredita-se que, pelo fato de ter sido adicionado uma única população de microrganismos de forma massiva, a mesma possa ter afetado competitivamente a população pré-existente e, conseqüentemente, ter comprometido a rápida degradação das folhas. Por outro lado, acredita-se que o excelente desempenho obtido pelos isolados de *Trichoderma* (Tabelas 1 e 2) dá-se pelo fato do microrganismo apresentar um excelente sistema enzimático (ARRAS & ARRU, 1997).

Quando se analisam os dados de índice de doença para o mesmo experimento (Tabela 3), verifica-se que todos os tratamentos diferiram da

testemunha quanto à diminuição da severidade da doença. Além disso, foram observadas diferenças significativas entre os melhores tratamentos, sendo os menores índices de doença obtidos pelos isolados bacterianos ACB-83, ACB-AP3 e pelo produto Soil-Set® + Compostaid®, (ID= 5,13, 5,24 e 5,47, respectivamente), que não diferiram entre si e nem dos isolados de *Trichoderma* testados. É importante mencionar que os isolados de *Trichoderma* spp. (com ID de 5,63 a 6,34) embora não tenham apresentado um dos menores índices de doença, mantiveram a sua performance na redução da severidade da doença, diferindo estatisticamente do tratamento testemunha que apresentou ID = 7,66.

**Tabela 3.** Índice de doença da mancha preta dos frutos cítricos, em plantas de laranjeira 'Hamlin', após os tratamentos para aceleração da decomposição. Município de Araras/ SP, 2009/2010.

Tratamentos <sup>(2)</sup>	Médias <sup>(1)</sup>
Testemunha	7,66 a
Uréia	6,63 b
ACB-40 (1X10 <sup>7</sup> UFC/mL)	6,34 bc
ACB-83 (solo + filoplano) (1X10 <sup>7</sup> UFC/mL)	5,71 cd
ACB-37 (1X10 <sup>7</sup> UFC/mL)	5,63 cd
Soil-Set®+Compostaid®	5,47 d
ACB-AP3 (1X10 <sup>7</sup> UFC/mL)	5,24 d
ACB-83 (1X10 <sup>7</sup> UFC/mL)	5,13 d

(<sup>1</sup>) Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si (Duncan,  $\geq 0,05$ ). (<sup>2</sup>)ACB-AP3 (*Bacillus subtilis*); ACB-83 (*B. subtilis*); ACB-40 (*Trichoderma* sp.) e ACB-37 (*T.pseudokoninguii*).

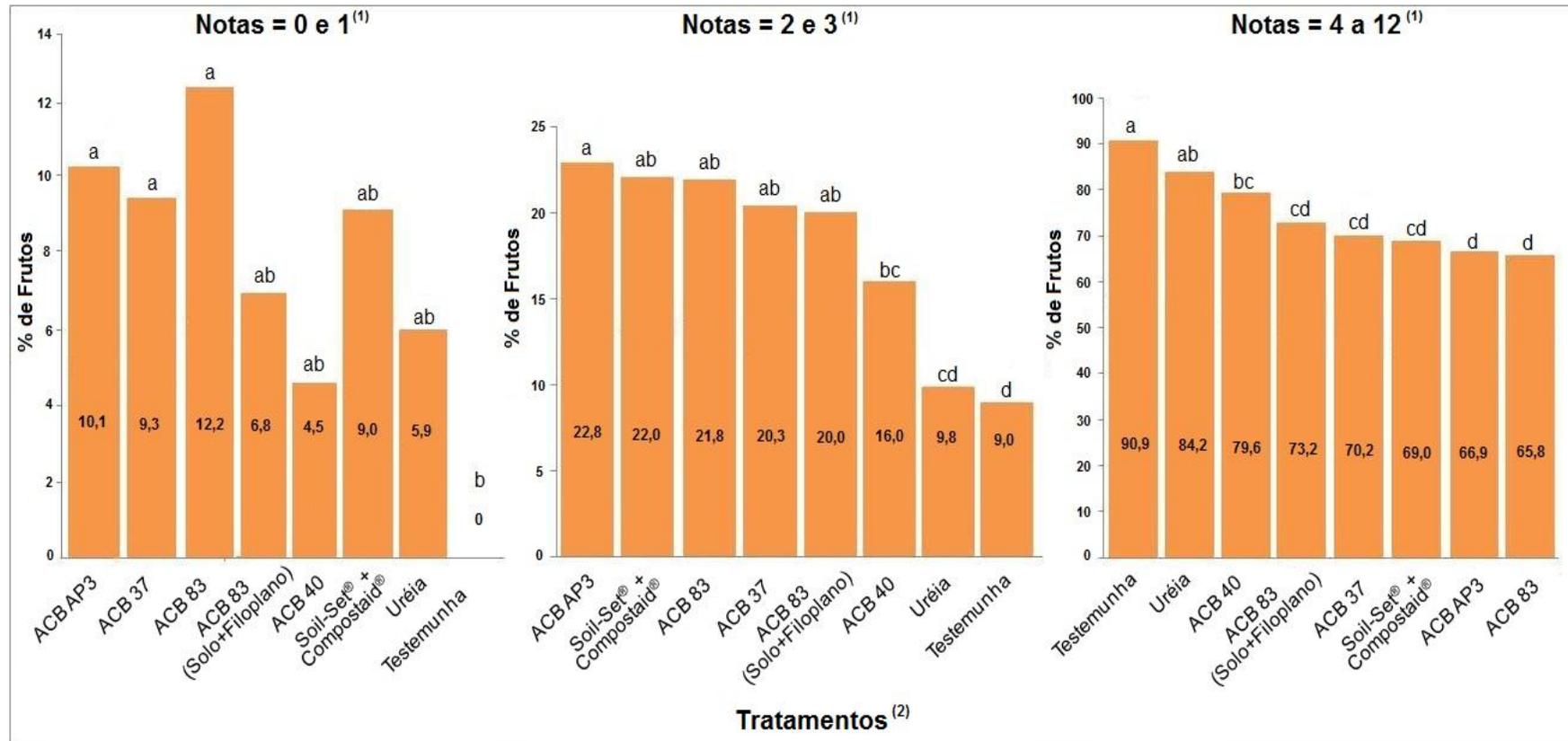
Acredita-se que as aplicações dos microrganismos ou, do produto comercial formulado a partir de microrganismos, possam ter agido não só diretamente na decomposição do material vegetal, mas também, apresentaram ação direta sobre os ascósporos presentes nas folhas cítricas que caíram ao solo, com conseqüente reflexo na redução da severidade da mancha preta dos frutos cítricos.

No caso específico dos isolados de *Trichoderma*, a literatura relata como sendo um dos antagonistas mais promissores no controle de doenças (HILGEMBERG et al., 2007), apresentando o micoparasitismo, como sendo um dos mais importantes mecanismos de ação a inúmeros fitopatógenos. A atuação de antagonistas por parasitismo, além de ter o seu estabelecimento facilitado, suprimindo o desenvolvimento de patógeno, pode apresentar propriedades físico-químicas de amplo espectro de ação, como é o caso da maioria das espécies de *Trichoderma* e embora seja dado mais ênfase aos mecanismos de ação como micoparasitismo, competição e antibiose, não se descarta outros mecanismos de ação que possivelmente poderiam estar presentes nesse cenário, como indução de resistência (REMUSKA & DALLA PRIA, 2007).

Com relação ao bom desempenho dos isolados de *B. subtilis* (ACB-83 e ACB-AP3) mostrado, especialmente, durante a segunda safra deste trabalho, pode ser devido ao conjuntos de ações, tanto na decomposição das folhas, como também quanto à atividade antagônica da bactéria sobre os ascósporos. Quanto ao mecanismo de ação desta bactéria, dados na literatura mostram ser a antibiose o principal mecanismo de ação envolvido na atividade antagônica (KUPPER & GIMENES-FERNANDES, 2002), tanto pela produção de antibióticos como na produção de enzimas aminolíticas e proteolíticas. Esses compostos podem lisar e dissolver estruturas celulares independente do contato. Além do mecanismo de ação, *B. subtilis* possui uma pronta adaptabilidade no ambiente, principalmente, por ser uma bactéria formadora de esporos, os quais oferecem tolerância a diversos tipos de *stress* como, seca, deficiências nutricionais e temperaturas extremas (KNUDSEN & SPURR, 1986). Tais características somadas ao fácil desenvolvimento e a ausência de patogenicidade de *B. subtilis* sugerem formulações de produtos mais estáveis e viáveis no controle de fitopatógenos (KLOEPER et al., 1989; BETTIOL & GHINI, 1995; KUPPER & GIMENES-FERNANDES, 2002; KUPPER et al., 2003; KUPPER et al., 2009).

Os dados apresentados na Figura 3 mostram a porcentagem de frutos que receberam as notas em relação ao efeito de agentes de biocontrole na

decomposição das folhas de citros, como medida auxiliar no controle da mancha preta dos frutos cítricos, causada por *G. citricarpa*, em plantas de laranjeira 'Hamlin'. Para as notas 0 e 1, observa-se que os tratamentos referentes às aplicações com bactérias nas folhas caídas ao solo (ACB 83 e ACB AP3) apresentaram as maiores porcentagens de frutos (12,22 a 10,18%), nessa faixa de nota, seguidos do isolado de *Trichoderma* (ACB-37) com 9,37%, sendo que o tratamento referente à testemunha não apresentou nenhum fruto dentro deste grupo de notas.



**Figura 3.** Efeito de agentes de biocontrole na decomposição das folhas de citros, como medida auxiliar no controle da mancha preta dos frutos cítricos, causada por *Guignardia citricarpa*, expresso pela avaliação da severidade da doença em plantas de laranja ‘Hamlin’. Município de Araras/ SP, 2009/2010. Nota 0 = ausência de sintomas; 1 = 0,5%; 2 = 1,1%; 3 = 1,7%; 4 = 4,5%; 5 = 5,0%; 6 = 11,5%; 7 = 15,0%; 8 = 22,5%; 9 = 31,0%; 10 = 49,0%; 11 = 53,0% e 12 = 68,0% da área coberta com os sintomas (Spósito, 2003). <sup>(1)</sup> Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si (Duncan,  $P \geq 0,05$ ). <sup>(2)</sup> ACB-AP3 (*Bacillus subtilis*); ACB-83 (*B. subtilis*); ACB-40 (*Trichoderma* sp.) e ACB-37 (*T.pseudokoninguii*).

Em relação aos frutos com notas 2 e 3 e, correspondentes aos frutos com 1,1 a 1,7% de área lesionada pela doença, verifica-se que as maiores porcentagens de frutos nessa faixa (de 20 a 23%) foram encontradas nos tratamentos à base dos produtos constituídos pelas bactérias, tanto nas aplicações sobre as folhas no solo, como na combinação solo e filoplano, enquanto que, os tratamentos à base de *Trichoderma* apresentaram porcentagens de frutos de 16 a 20% e o produto comercial Soil-Set® + Compostaid® apresentou 22% dos frutos.

Já em correspondência aos frutos com notas de 4 a 12, o tratamento testemunha foi o que apresentou maior porcentagem de frutos (90,93%), (4 = 4,5%; 5 = 5,0%; 6 = 11,5%; 7 = 15,0%; 8 = 22,5%; 9 = 31,0%; 10 = 49,0%; 11 = 53,0% e 12 = 68,0% de área lesionada pela doença), seguido do tratamento com uréia (84,25%). Os tratamentos à base de microrganismos apresentaram porcentagens de frutos nesta faixa de notas que variaram de 79 a 66%.

O ambiente e o microclima podem interferir diretamente no modo de atuação dos microrganismos. Embora, tanto Botucatu como Araras, de acordo com a classificação climática de Köppen-Geiger, possuam clima tropical de altitude (PEEL et al., 2011), as diferenças nos resultados das duas safras ocorreram, sendo o melhor desempenho do isolado de *Trichoderma* observado na região de Botucatu/SP (safra 2008/2009) em contrapartida, na região de Araras/SP os melhores resultados foram obtidos com os isolados de *B. subtilis* (ACB-83 e ACB-AP3), que mantiveram igual desempenho aos produtos comerciais Soil-Set® + Compostaid®.

Uma vez aplicados, agentes microbiológicos de biocontrole podem se deparar com um ambiente hostil, dificultando sua maneira de ação, tendo em vista, a complexidade evidenciada dentro do tetraedro do processo doença, onde são destacadas as interações entre o ambiente, o patógeno e não patógenos presentes no sítio de infecção do hospedeiro (BETTIOL & MORANDI, 2009). Dessa maneira, estudos mais detalhados devem ser realizados, para melhor compreensão das interações desses microrganismos, principalmente, no que diz respeito às formulações mais adequadas, dose, frequência e números de aplicações dos antagonistas.

## 5. CONCLUSÃO

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

- é viável aplicações de *Bacillus subtilis* e/ou de *Trichoderma* spp. sobre as folhas de citros caídas ao solo, como medida auxiliar no manejo de controle da mancha preta dos citros.

## 6. REFERÊNCIAS

- AGRIANUAL: anuário da agricultura brasileira. São Paulo, p. 245-306, 2011.
- ALMEIDA, S. G. Crise Socioambiental e Conversão Ecológica da Agricultura Brasileira. Rio de Janeiro: AS-PTA, 180p, 2001.
- ALTIERI, M. A. **Agroecologia**: bases científicas para uma agricultura sustentável. Guaíba: AS-PTA/Agropecuária, 592p, 2002.
- ARRAS, G.; ARRU, S. Mechanism of action of some microbial antagonists against fungal pathogens. *Annali di Microbiologia ed Enzimologia* 47:97-120. 1997.
- ASAKA, O.; SHODA, M. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping off of tomato with *Bacillus subtilis* RB14. **Applied and Environmental Microbiology**, 62, 4081-4085, 1996.
- AVERNA-SACCÁ, R. Pústulas pretas sobre laranjas doces produzidas pelo *Phoma citricarpa*. **Revista de Agricultura**, v.15, p.668-674, 1940.
- AZEVEDO, J. L. Microrganismos endofíticos. **Ecologia Microbiana**. p. 117-137, 1998.
- BELLOTTE, J. A. M.; et al. Acceleration of the decomposition of Sicilian lemon leaves as an auxiliary measure in the control of citrus black spot. *Tropical Plant Pathology (Impresso)*, v. 34, p. 071-076, 2009.
- BETTIOL, W.; GHINI, R. Controle biológico. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (ED.). **Manual de fitopatologia**: Princípios e conceitos. 3ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v.1.

BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. Biocontrole de doenças de plantas no Brasil: uso e perspectivas. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009.

BURG, I. C.; MAYER, P. H. (orgs). Manual de Alternativas Ecológicas para Prevenção e Controle de Pragas e Doenças. Paraná: Assessora, 7ª Ed., 1999.

CALAVAN, E. C. Black spot of citrus. **The California Citrographic**, v.46, p.4, 18, 22-4, 1960.

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

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

ELAD, Y.; CHET, I.; KATAN, J. *Trichoderma harzianum*: A biocontrol agent effective against *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani*. **Phytopathology**, v.70, p.119-121, 1980.

FAGAN, C.; GOES, A. Efeito da mancha preta dos frutos cítricos causada por *Guignardia citricarpa* nas características tecnológicas do suco de frutos de laranjeira "Natal" e "Valência". **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 26, n.1, p.122, 2000.

FEICHTENBERGER, E. "Mancha preta dos frutos cítricos". **Laranja**, v.17, p.79-92, 1996.

FEICHTENBERGER, E.; MULLER, G. W.; GUIRADO, N. Doenças dos citros. In: KIMATI, H., AMORIM, L., BERGAMIN FILHO, A., CAMARGO, L. E. A., REZENDE, J. A. M. **Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**. São Paulo, 1997. Cap. 25, p.261-296.

FUNDECITRUS. Manual de pinta preta, Araraquara: Fundo Paulista de Defesa da Citricultura, 7p., 2003.

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

GLIESSMAN, S. R. Agroecologia: processos ecológicos em agricultura sustentável. 2. ed. Porto Alegre: Editora da Universidade Federal do Rio Grande de Sul, 2001. 653p.

GOES, A.; BARROS, J. C. S. M.; PINHEIRO, J. E. Controle da pinta preta em frutos de tangerina Rio (Citrus deliciosa), ocasionada por *Phyllosticta citricarpa* (*Guignardia citricarpa*). **Fitopatologia Brasileira**, Botucatu, v. 15, p.73-75, 1990.

GOES, A.; FEICHTENBERGER, E. Ocorrência da mancha preta causada por *Phyllosticta citricarpa* (McAlp) Van der Aa (*Guignardia citricarpa* Kiely) em pomares cítricos do Estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, v.18, p.138 (abs.), 1993.

GOES, A. Controle da mancha preta dos frutos cítricos. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 19, 305-320, 1998.

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

HEBERT, J. A.; GRECH, N. M. A strain of *Guignardia citricarpa*, the black spot pathogen, resistant to benomyl in South Africa. **Plant Disease**, v.69, p.1007, 1985.

HILGEMBERG, P.; et al. Antagonismo de *Trichoderma* spp. e *Trichotecium roseum* a fungos de solo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.32, p.121, 2007.

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.

KIELY, T. B. Control and epiphytology of black spot of citrus on the central coast of New South Wales. New South Wales: Department of Agriculture Science Bulletin, p.88, 1948a.

KIELY, T. B. Preliminary studies on *Guignardia citricarpa* n. sp.: the ascigenous stage of *Phoma citricarpa* McAlp. and its relation to black spot of citrus. **Proceedings of the Linnean Society of New South Wales**, v.73, p.249-92, 1948b.

KILIAN, M.; et al. *Bacillus subtilis* – mode of action of a microbial agent enhancing plant vitalit. **Pf lanzenschut z – Nachrichten Bayer** , 1, 172-93, 2000.

KLOEPPER, J. M.; LIFSHITZ, R.; ZABLOTOWICZ, R. M. Freelifving bacterial inocula for enhancing crop productivity. **Trends in Biotechnology**, v.7, p39-44, 1989.

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, 1986. p.83-92.

KÖLLER, W. Chemical approaches to managing plant pathogens. In: Ruberson, J. R. **Handbook of integrated pest management**. (Ed.). Dekker, New York. 1998. p. 1-38.

KOTZÉ, J. M., Studies on the black spot diseases of citrus caused by *Guignardia citricarpa* Kiely, with particular reference to its epiphytology and control at Labata. 1963. p.143. Tese – Science of Agriculture University of Pretoria.

KOTZÉ, J. M. Epidemiology and control of citrus black spot in South Africa. **Plant Disease**, v. 65, p.945-50, 1981.

KOTZÉ, J. M. Black spot. In: WHITESIDE, J.O., GARNSEY, S.M., TIMMER, L.W. (Eds.). **Compendium of citrus diseases**. 2Ed., p.10-12. APS Press, St. Paul, 1988.

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**, Botucatu, v.28, p. 292-295, 2002.

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

KUPPER, K. C., BELLOTTE, J. A., GOES, A. Controle alternativo de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.31, p.1004-1015, 2009.

KUPPER, K. C., et al. Control of *Guignardia citricarpa* by *Bacillus subtilis* and *Trichoderma* spp. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 33, n. 4, p. 1111-1118, 2011.

MARACAJÁ, P. B. **Controle biológico de pragas**. Nota de aula ministrada na UFERSA, Mossoró, maio de 2005. 3p.

MCKINNEY, H. H. Influence of soil, temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. **Journal of Agricultural Research**, v.26, p.195-217, 1923.

MCONIE, K. C. Source of infection for black spot of citrus. **The South African Citrus Journal**, p.5-9, 1965.

MCONIE, K. C. Germination e infection of citrus and other host of citrus *Guignardia citricarpa* in relathion to control of black spot. **Phytopatology**, v.57, p.743-746, 1967.

MORETTO, K. C. K., GIMENES-FERNANDES, N., SANTOS, J. M. Influence of *Trichoderma* spp. on *Colletotrichum acutatum* mycelial growth and morphology and on infection of 'Tahiti' lime detached flowers. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.27, p.357-364, 2001.

NEVES, E. M.; et al. **Conhecendo a citricultura**: impactos alocativos, mercado, preços. Piracicaba, SP: ESALQ – Departamento de Economia Administração e Sociologia, 2001.

NEVES, M. F.; et al. O retrato da citricultura brasileira. Elaboração: Markestrat, Centro de Pesquisa e Projetos em Marketing e Estartégia. FEA/USP Ribeirão Preto, p.137, 2010.

NORGAARD, R. B.; SIKOR, T. O. A base epi stemológica da Agroecologia. In: ALTIERI , M. A. (Ed. ) . **Agroecologia**: bases c ient í f i cas para uma agr icul tura sustentável . Guaíba: ASPTA/ Agropecuár ia, 2002. p. 53-83.

PEEL, M. C.; FINLAYSON, B. L.; MCMAHON, T. A. **Updated world map of the Köppen-Geiger climate classification**. Hydrology and Earth System Sciences, Victoria, n. 11, p. 1633-1644. 2007. Disponível em: <[www.hydrol-earth-syst-sci.net/11/1633/2007/](http://www.hydrol-earth-syst-sci.net/11/1633/2007/)> Acesso em: 17 jul. 2011.

PINTA PRETA: **Revista do Fundecitrus** 95, p.14, 1999.

REMUSKA, A. C.; DALLA PRIA, M. Efeito de *Bacillus thuringiensis* e *Trichoderma* sp. no crescimento de fungos fitopatogênicos. *Publicatio UEPG*. v. 13, p. 31-36, 2007.

RICARDO, B.; CAMPANILI, M. (Orgs.). **Almanaque Brasil Socioambiental**. São Paulo: ISA - Instituto Socioambiental, 2005.

ROBBS, C. F.; PIMENTEL, J. P.; RIBEIRO, R. L. A mancha preta dos citros causada por *Phoma citricarpa*. **Fitopatologia Brasileira**, v.5, p.455, 1980.

SCHUTTE, G. C.; BEETON, K. V.; KOTZÉ, J. M. Rind stippling on Valencia oranges by copper fungicides used for control of citrus black spot in South Africa. **Plant Disease**, v.81, p.851-854, 1997.

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

SPÓSITO, M. B. Dinâmica temporal e espacial da mancha preta (*Guignardia citricarpa*) e quantificação dos danos causados à cultura dos citros. Tese de Doutorado em Fitopatologia), Escola Superior de Agricultura 'Luis de Queiróz', Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo. 112p, 2003.

STROO, H. F.; et al. Predicting rates of wheat residue decomposition. **Soil Sci. Soc. Am. Proc.**, v.53, p. 91-99, 1989.

SUTTON, B. C.; WATERSON, J. M. **Guignardia citricarpa. Descriptions of pathogenic fungi and bacteria. Guignardia citricarpa**. Surrey, England, Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1985.

TAUK, S. M. Aspectos da microbiota fúngica no solo de cultura de milho (*Zea mays*), tratado com vinhaça no município de Rio Claro – SP. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.19, n.3, p. 282-289, 1988.