

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA
SAÚDE
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE CONTROLE BIOLÓGICO DA
MANCHA MARROM DE ALTERNARIA COM *Trichoderma spp.*,
***Bacillus subtilis* E FERTILIZANTE ORGANOMINERAL**

BIANCA LUZARDO PORTO

CAXIAS DO SUL

2016

BIANCA LUZARDO PORTO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE CONTROLE BIOLÓGICO DA MANCHA
MARROM DE ALTERNARIA COM *Trichoderma spp.*, *Bacillus subtilis* E
FERTILIZANTE ORGANOMINERAL**

“Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando à obtenção de grau de Mestre em Biotecnologia.”

Orientadora: Prof. Dra. Joséli Schwambach.

Co-orientadora: Dra. Rute Teresinha da Silva Ribeiro.

CAXIAS DO SUL

2016

P853a Porto, Bianca Luzardo

Avaliação do potencial de controle biológico da mancha marrom de alternaria com *Trichoderma* spp., *Bacillus subtilis* e fertilizante organomineral / Bianca Luzardo Porto. – 2016.

62 f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2016.

Orientação: Joséli Schwambach.

Coorientação: Rute Teresinha da Silva Ribeiro.

1. controle biológico. 2. tangerina Ponkan. 3. fertilizante organomineral. 4. ácidos húmicos e fúlvicos. I. Schwambach, Joséli, orient. II. Ribeiro, Rute Teresinha da Silva, coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UCS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

BIANCA LUZARDO PORTO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE CONTROLE BIOLÓGICO DA
MANCHA MARROM DE ALTERNARIA COM *Trichoderma* spp., *Bacillus
subtilis* E FERTILIZANTE ORGANOMINERAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando à obtenção do título de Mestra em Biotecnologia.

Orientador: Profa. Dra. Joséli Schwambach

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 28 DE OUTUBRO DE 2016.

Orientador: Profa. Dra. Joséli Schwambach

Prof. Dr. Marcus André Kurtz Almança

Profa. Dra. Roberta Marins Nogueira Peil

Profa. Dra. Carine Cocco

AGRADECIMENTO

Agradeço primeiramente a Deus, por todas as minhas conquistas.

À Prof. Dra. Rute Teresinha da Silva Ribeiro, pela orientação, oportunidade, paciência, amizade, incentivo e conhecimentos compartilhados que foram fundamentais no cumprimento dessa jornada e principalmente por ter ficado ao meu lado até o final.

Ao meu noivo Samoel Benelli, por estar ao meu lado todos os dias, me ajudando, apoiando, compreendendo e sacrificando momentos em nome desta minha conquista e da minha felicidade.

À minha mãe Eliane Luzardo Porto e meus irmãos André Luzardo Porto e Camila Luzardo Porto pelo apoio e ensinamentos em agir com dignidade, honestidade e respeito e pela paciência e confiança.

Aos meus padrinhos Gilberto Seus e Maribel Luzardo pela confiança, ensinamentos, incentivos e apoio em todos os momentos.

À Universidade de Caxias do Sul que oportunizou meu crescimento profissional.

À Lucimara Serafini Rech pela ajuda, paciência, responsabilidade e amizade.

À todos os professores do Programa de Pós Graduação em Biotecnologia por me proporcionar o conhecimento não apenas racional, mas a manifestação do caráter e afetividade da educação no processo de formação profissional, principalmente aos professores Aldo José Pinheiro Dillon e Joséli Schwambach que me acompanharam desde o início desta jornada, sempre me apoiando e proporcionando meu crescimento profissional.

À empresa Beifiur Ltda., principalmente à Valdecir Ferrari pelo suporte para desenvolvimento do meu projeto.

À empresa ECCB Ltda. pelo suporte para desenvolvimento do meu projeto.

Aos demais familiares, pelo apoio e paciência nesta fase da minha vida.

À todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a conclusão deste trabalho.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tratamentos utilizados nos ensaios *in vivo* em plantas de tangerineiras 25

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Produção de Tangerinas no Brasil.	7
Figura 2. Área plantada em hectares de tangerineiras no Brasil.	7
Figura 3. Ciclo de vida do patógeno <i>Alternaria alternata</i>	9
Figura 4. Avaliação da patogenicidade do isolado de <i>Alternaria alternata</i> , <i>in vitro</i> , utilizando folhas de tangerineiras.	21
Figura 5. Esquema representativo do teste de viabilidade dos conídios de <i>Trichoderma</i> spp.	21
Figura 6. Avaliação do potencial antagonístico de <i>Trichoderma</i> spp. contra <i>Alternaria alternata</i> em cultura dupla.	22
Figura 7. Antagonismo de <i>Bacillus subtilis</i> em <i>Alternaria alternata</i>	24
Figura 8. Plantas de tangerineiras utilizadas para o tratamento <i>in vivo</i>	27
Figura 9. Representação de escala diagramática de dez níveis de Martelli (2011) para determinar a porcentagem de área foliar com sintoma da mancha causada por <i>Alternaria alternata</i>	28
Figura 10. Sintomas de mancha marrom de alternaria em folhas jovens de tangerineiras.	29
Figura 11. Germinação dos conídios de <i>Trichoderma</i> spp.	30
Figura 12. Antagonismo de <i>Trichoderma</i> spp. em <i>Alternaria alternata</i> após período de incubação de 7 dias.	30
Figura 13. Antagonismo de <i>Bacillus subtilis</i> em <i>Alternaria alternata</i>	32
Figura 14. Crescimento do <i>Trichoderma</i> spp. em meio BDA + fertilizante e somente BDA.	33
Figura 15. Demonstração da população de <i>Bacillus subtilis</i> nas soluções de fertilizante organomineral, fertilizante mineral e água autoclavada.	34
Figura 16. Sintomas de mancha marrom de alternaria nas plantas testemunhas.	35
Figura 17. Média das notas na escala diagramática do nível de lesões nas folhas jovens de tangerineiras Ponkan nas avaliações de 7 e 15 dias após o primeiro tratamento.	36

LISTA DE ABREVIACOES

BDA – batata , dextrose e ágar

CV – Cultivar

MMA – Mancha Marrom de Alternaria

SH – Substância Húmica

AH – Ácido Húmico

AF – Ácido Fúlvico

AN – Ágar nutritivo

SUMÁRIO

RESUMO.....	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUÇÃO	3
2. OBJETIVOS	5
2.1. Objetivo geral	5
2.2. Objetivos específicos	5
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
3.1. Importância econômica dos citros	6
3.2. Os citros e a suas principais doenças	8
3.2.1. Mancha Marrom	8
3.3. Métodos alternativos de controle da mancha marrom de alternaria	11
3.3.1. Controle Biológico.....	11
3.3.1.1. <i>Bacillus</i> spp.....	12
3.3.1.2. <i>Trichoderma</i> spp.	14
3.3.2. Ácidos Húmicos e Fúlvicos	16
4. MATERIAL E MÉTODOS	19
4.1. Local	19
4.2. Material vegetal	19
4.3. Obtenção dos micro-organismos	19
4.3.1 Produção de inóculo de <i>Alternaria alternata</i>	20
4.3.2 Avaliação da patogenicidade do isolado de <i>Alternaria alternata</i>	20
4.3.3. Teste de viabilidade dos conídios de <i>Trichoderma</i> spp.	21
4.3.4. Avaliação do potencial antagônico de suspensão de conídios de <i>Trichoderma</i> spp.	22
4.3.5. Teste de viabilidade do formulado de <i>Bacillus subtilis</i>	23
4.3.6. Teste de antagonismo com a formulação de <i>Bacillus subtilis</i>	23
4.4. Efeito do fertilizante sobre os agentes de biocontrole	24
4.5. Avaliação <i>in vivo</i>	25
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
5.1. Teste da patogenicidade	29
5.2. Viabilidade e antagonismo <i>in vitro</i> de <i>Trichoderma</i> spp. em <i>Alternaria Alternata</i> ..	29
5.3. Viabilidade e antagonismo <i>in vitro</i> de <i>Bacillus subtilis</i> . em <i>Alternaria alternata</i> ..	31

5.4. Efeito do fertilizante sobre os agentes de biocontrole	32
5.5. Avaliação <i>in vivo</i>	34
6. CONCLUSÕES.....	40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

RESUMO

O Brasil é o maior produtor de citros, sendo um dos seus principais produtos de exportação da cadeia agroindustrial. Um dos fatores que afetam a qualidade e a produção do produto final obtido é a Mancha Marrom de *Alternaria*, causado pelo fungo *Alternaria alternata*. A doença provoca desfolha, seca de ramos e queda de frutos em tangerinas e seus híbridos. Para controle dessa doença são utilizados fungicidas, porém, a mancha marrom é uma doença de difícil controle podendo ser necessárias de 7 a 10 aplicações do fungicida, aparecimento de resistência dos fungos, intoxicação nas pessoas e contaminação do meio ambiente devido ao emprego de fungicidas. Métodos alternativos como o controle biológico com aplicações de micro-organismos antagonistas e a nutrição das plantas são opções de menor impacto ao meio ambiente. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de *Trichoderma* spp., *Bacillus subtilis* e fertilizante organomineral, no controle da Mancha Marrom de *Alternaria* em plantas cítricas de tangerina Ponkan. O experimento foi realizado com delineamento casualizado, constituído de oito tratamentos com quatro repetições. Os experimentos foram avaliados quanto a incidência da doença. Os dados mostraram que o melhor controle foi o tratamento químico, porém os tratamentos com *Trichoderma* spp., *Trichoderma* spp. + fertilizante e *Trichoderma* spp. + *Bacillus subtilis* apresentaram ótimas taxas de controle, podendo inclusive substituir o tratamento químico no controle desta doença.

Palavras chaves: Citros; Tangerina “Ponkan”; *Alternaria alternata*; Ácidos húmicos e fúlvicos.

ABSTRACT

Brazil is the largest citrus producer, being one of its main exports of agro-industrial chain. One of the factors that affect the quality and production of the final product is the Brown Spot Alternaria, caused by the fungus *Alternaria alternata*. The disease causes leaf drop, dry branches and fruit drop in tangerines and their hybrids. To control this disease fungicides are used, however, the brown spot is a difficult to control disease, may be required from 7 to 10 applications of fungicide, appearance of resistance of fungi, intoxication in people and environment contamination owing the application of fungicides. Alternative methods such as biological control with applications antagonistic microorganisms and plant nutrition are options of smaller impact to the environment. Therefore, the objective of this work was to evaluate the potential of *Trichoderma* spp., *Bacillus subtilis* and fertilizer, in control of Alternaria Brown Spot in citrus plants Ponkan tangerine. The experiment was carried out in a randomized design, consisting of eight treatments with four replicates. The experiments were evaluated for the incidence of the disease. The data showed that the best control was the chemical treatment, but the treatments with *Trichoderma* spp., *Trichoderma* spp. + Fertilizer and *Trichoderma* spp. + *Bacillus subtilis* presented excellent control rates, and may even replace chemical treatment in the control of this disease.

key words: Citrus; Tangerine "Ponkan"; *Alternaria alternata*; humic and fulvic acids.

1. INTRODUÇÃO

A maior produção mundial de citros é a brasileira, tanto na forma industrializada em sucos concentrados como para o consumo “in natura”. A qualidade e a produção dos frutos poderia ser maior, porém, inúmeras doenças e pragas comprometem esta cultura. A mancha-marrom de alternaria (*Alternaria alternata*) considerada uma das principais doenças cítricas, aumenta o custo de produção, pois exige elevado número de aplicações de fungicidas químicos. Sendo necessário, portanto, a avaliação de novas formas de controle, de baixo impacto ambiental e eficientes.

Há uma crescente demanda por produtos agrícolas livres de resíduos de agrotóxicos e por uma agricultura de menor impacto sobre os recursos naturais. Nessa perspectiva, o uso de produtos à base de agentes biológicos para o controle de doenças e pragas de plantas tem obtido forte crescimento nos últimos anos. Atualmente, são mais de 40 espécies de antagonistas utilizados para o controle de doenças de plantas, sendo o gênero *Trichoderma* responsável por quase 50% dos antagonistas comercializados, seguido de *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Paecilomyces* e *Streptomyces*.

Entre estes gêneros, espécies do *Trichoderma* possuem a capacidade de controlar um grande número de doenças de plantas através de propriedades antagônicas baseadas na ativação de um arsenal de mecanismos, o que possibilita atividade contra o fitopatógeno. *B. subtilis* destaca-se no controle de doenças pós colheita e do filoplano, é uma bactéria muito versátil, sendo eficiente na prevenção e controle de doenças causadas por várias espécies de patógenos em diversas culturas.

Na sanidade das plantas, além da ação dos micro-organismos antagonistas, altos índices de produção e qualidade de frutos cítricos são alcançados por meio do

equilíbrio no fornecimento de micro e macronutrientes e, os quais atuam direta ou indiretamente no metabolismo vegetal. Os fertilizantes organominerais agrupam elementos químicos e orgânicos essenciais para as plantas, garantido a expansão da citricultura em solos de baixa fertilidade.

No mercado existe disponíveis inúmeros fertilizantes organominerais, neste trabalho foi escolhido o adubo organomineral da marca comercial Beifort[®] que é elaborado a partir de extratos líquidos da compostagem do bagaço, engaço e semente de uva. Resíduos da uva (bagaço, engaço e semente), embora biodegradáveis, necessitam de um tempo mínimo para sua decomposição, constituindo uma fonte de poluentes ambientais se não forem trabalhadas. Segundo o fabricante o produto deve fornecer nutrientes e micronutrientes essenciais para o desenvolvimento das plantas, carbono orgânico para o solo, ácidos húmicos e fúlvicos, os quais auxiliam a planta na absorção de outros nutrientes presentes no solo, a fortalecendo contra os ataques de pragas e doenças.

Considerando as informações, neste trabalho foi avaliado a ação do fertilizante isoladamente e na interação com *Trichoderma* e *Bacillus subtilis* no controle da mancha marrom de alternaria.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar o potencial de *Trichoderma* spp., *Bacillus subtilis* e de fertilizante Organomineral com ácidos húmicos e fúlvicos no controle da Mancha Marrom de *Alternaria* em tangerinas “Ponkan”.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar *in vitro* *Trichoderma* spp. e *Bacillus subtilis* quanto a ação antagonica sobre o fitopatógeno *Alternaria alternata*;
- Confirmar a patogenicidade do isolado de *Alternaria alternata* em plantas de tangerina “ponkan”;
- Avaliar *in planta* a ação de *Trichoderma* spp. e de *Bacillus subtilis* no controle da Mancha Marrom de *Alternaria* em tangerina “Ponkan”;
- Avaliar o efeito do tratamento com fertilizante organomineral no controle da Mancha Marrom de *Alternaria* em tangerina “Ponkan”;
- Avaliar o efeito da consorciação de fertilizante organomineral com *Bacillus subtilis* no controle da Mancha Marrom de *Alternaria* em tangerina “Ponkan”;
- Avaliar o efeito da consorciação de fertilizante organomineral com *Trichoderma* spp. no controle da Mancha Marrom de *Alternaria* em tangerina “Ponkan”.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Importância econômica dos citros

De origem asiática, as plantas cítricas foram introduzidas pelas primeiras expedições colonizadoras no Brasil, onde com melhores condições para se desenvolverem e produzir do que nas próprias regiões de origem, os citros se expandiram para todo o país. Variedades como tangerinas e Tahiti contribuem para o agronegócio dos citros no Brasil (Lopes et al., 2011).

Desde as últimas décadas a cadeia agroindustrial citrícola no Brasil tem grande importância, pois os citros se enquadram entre os principais produtos de exportação, (Neves et al., 2001). Em 2009, as exportações do complexo citrícola totalizaram 2,15 milhões de toneladas de produtos, correspondendo a US\$ 1,84 bilhões em receita, representando cerca de 3% das exportações do agronegócio brasileiro (Neves et al., 2010).

Para a exportação dos citros, os exportadores brasileiros precisam atender a uma série de exigências que envolvem questões fitossanitárias, de embalagem, consistência na qualidade do produto e regularidade na entrega para atender a legislação em vigor do país importador (Neves et al., 2010).

O Brasil é um dos principais produtores de tangerinas no mundo, perdendo somente da China, Espanha e Japão (Viana, 2010). Em 2015, foram produzidas 999.686 toneladas de tangerinas no Brasil, sendo a região sudeste o principal polo produtor, a região sul é o segundo principal polo produtor da fruta (figura 1) (IBGE - Produção Agrícola Municipal, 2015).

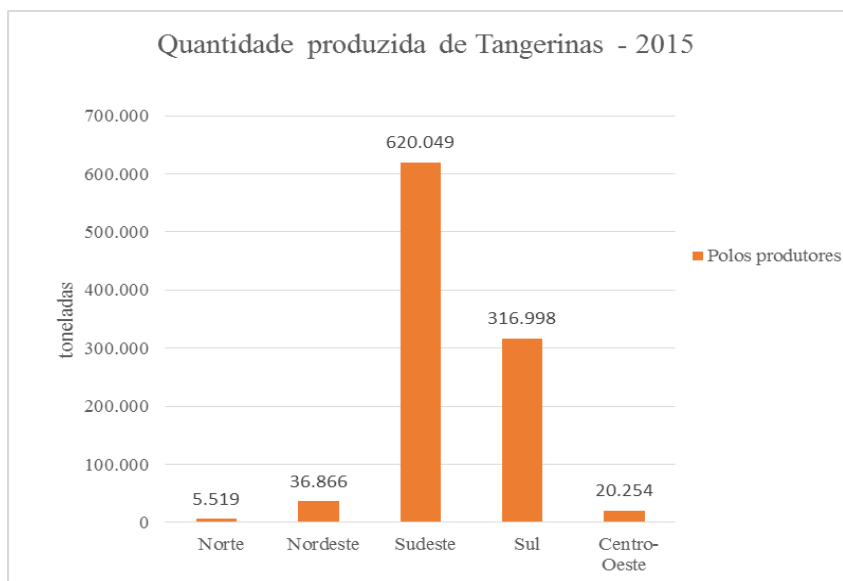


Figura 1. Produção de Tangerinas no Brasil. Fonte: IBGE (2015).

O Rio Grande do Sul se destaca na produção de citros por apresentarem diversidade de variedades cultivadas, com produção familiar e cooperativismo. Os municípios que se destacam na produção de tangerinas são Montenegro, Pareci e Harmonia, onde parte da produção é transformada em doces, geleias e vinhos (Viana, 2010). O Estado é que possui maior área plantada de tangerinas, com 13.049 hectares, ganhando do estado de São Paulo que possui 11.354 hectares plantados da fruta (figura 2) (IBGE - Produção Agrícola Municipal, 2015).

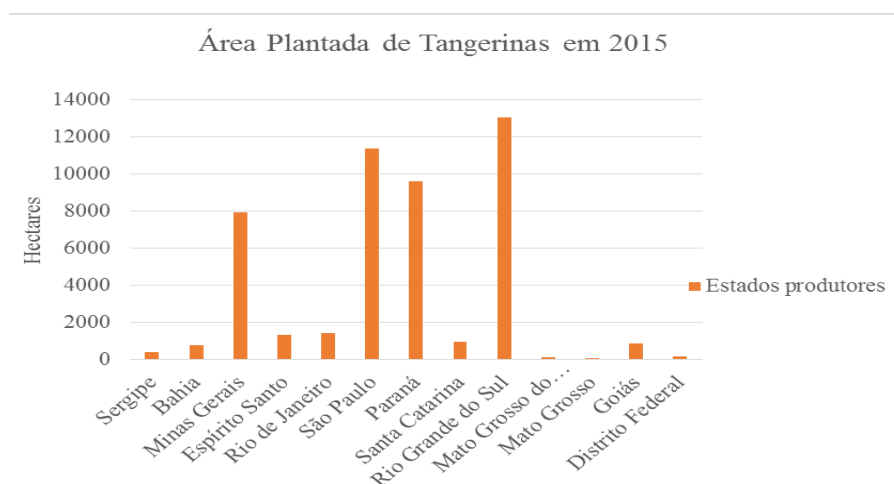


Figura 2. Área plantada em hectares de tangerineiras no Brasil. Fonte: IBGE (2015).

Apesar da alta produtividade, os citros estão sujeitos a uma série de patógenos.

3.2. Os citros e a suas principais doenças

Os citros compreendem um grande grupo de plantas do gênero *Citrus* e outros gêneros afins (*Fortunella* e *Poncirus*) ou híbridos da família Rutaceae, representado na maioria, por laranjas (*Citrus sinensis*), tangerinas (*Citrus reticulata* e *C. deliciosa*), limões (*Citrus limon*), limas ácidas como o Tahiti (*Citrus latifolia*) e o Galego (*Citrus aurantiifolia*), e doces como a lima da Pérsia (*Citrus limettioides*), pomelo (*Citrus paradisi*), cidra (*Citrus medica*), laranja-azeda (*Citrus aurantium*) e toranjas (*Citrus grandis*) (Lopes et al., 2011). A maioria dessas espécies é hospedeira de inúmeras pragas e doenças que limitam sua produção. Pragas e doenças foram responsáveis pela erradicação de 40 milhões de árvores cítricas no Brasil na década de 2000-2010, quando a mortalidade saltou de 4% para 7,5%, sendo que 39 milhões de árvores estavam situadas no cinturão citrícola de São Paulo e Triângulo. As doenças foram responsáveis por perdas de quase 80 milhões de caixas de laranjas por ano (Neves et al., 2010).

3.2.1. Mancha Marrom

A Mancha Marrom de *Alternaria* (MMA) ou simplesmente Mancha Marrom foi constatada no Brasil em 2001 (Colturato et al., 2009) e, desde então vem ganhando destaque face aos danos provocados na produção de tangerinas. De ocorrência até então no Estado do Rio de Janeiro, esta doença ganhou maiores proporções após 2003, causando sérios danos à citricultura dos estados de São Paulo, Minas Gerais e Rio Grande do Sul (Cottas, 2008).

A MMA é causada pelo fungo *Alternaria alternata* f. sp. citri, fungo saprofítico, que sobrevive nos tecidos da planta cítrica. (Peres et al., 2003) O fungo

reproduz-se sobre o material vegetal da planta suscetível, por meio da formação de esporos assexuais (conídios) (Timmer et al., 2000).

Os conídios possuem uma parede espessa e são resistentes ao ressecamento e outras condições adversas (Spósito et al. 2003), cuja liberação está relacionada com a ocorrência de condições ideais para o patógeno, sendo facilmente disseminados pelo vento (figura 3) (Timmer et al., 2000). As condições ideais para infecção ocorrem com temperaturas em torno de 20 a 27°C e 10 a 12 horas de molhamento foliar contínuo (Timmer et al., 2000).

Na germinação, os conídios de *A. alternata* f. sp. *citri* liberam toxinas específicas que matam as células do hospedeiro. Estas toxinas permitem a infecção e a colonização dos tecidos pelo fungo, possuindo papel fundamental na expressão dos sintomas e na ocorrência da doença na planta hospedeira (Spósito et al., 2003). A toxina no sistema vascular produz clorose e necrose que se estendem ao longo das lesões (Colturato et al., 2009).

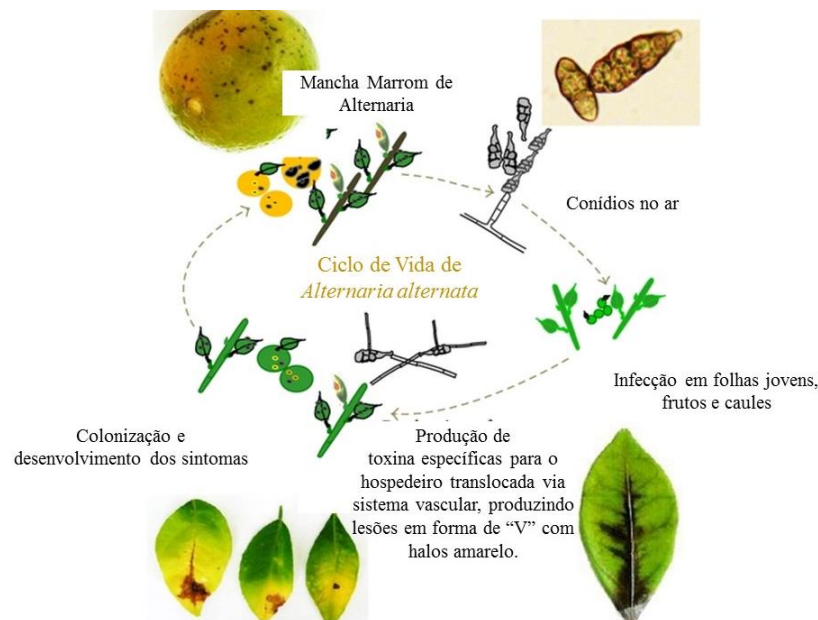


Figura 3. Ciclo de vida do patógeno *Alternaria alternata*.

Fonte: Adaptada de Chung, 2012.

O fungo causa lesões em folhas novas, frutos e ramos. O período de suscetibilidade varia de acordo com o tecido. Em folhas, o tecido fica suscetível até a folha atingir sua expansão máxima. Após infectada, os sintomas nas folhas são observados em 48 horas na forma de pequenas manchas necróticas, marrons a negras, rodeadas por um halo amarelado. Essas lesões se expandem, tornando-se circulares ou irregulares de tamanho variável, podendo ocupar grandes áreas da superfície foliar e atingir as nervuras. Em ramos jovens, os sintomas são semelhantes aos observados em folhas, com lesões de 1 a 10 mm de diâmetro. Nos frutos, a infecção pode ocorrer desde a queda das pétalas até o seu desenvolvimento, estando estes suscetíveis até 4 meses após a florada. As lesões nos frutos são pequenas manchas necróticas escuras, podendo variar de tamanho conforme a idade do fruto. Em alguns casos, podem ser observadas lesões cujo centro torna-se corticoso e saliente, formando uma pústula. Dependendo da intensidade da doença, as lesões podem causar a desfolha da planta, morte de ramos e queda prematura de frutos. Os frutos que se mantêm fixos à planta perdem seu valor para o mercado *in natura* devido às lesões causadas pelo fungo (Spósito et al., 2003).

Práticas culturais como adubação nitrogenada pesada, excesso de irrigação, assim como podas severas realizadas em épocas inadequadas, que levam a um grande fluxo vegetativo, e, portanto, formação de tecido suscetível ao fungo devem ser evitadas (Spósito et al., 2003).

Essas modificações culturais ajudam a reduzir o impacto desta doença, sendo o meio de controle mais utilizado as aplicações de fungicidas químicos; porém a MMA é uma doença de difícil controle sendo necessárias de 7 a 10 aplicações de fungicidas químicos (Colturato et al., 2009). A utilização inadequada de determinados grupos químicos de fungicidas pode provocar o surgimento de populações resistentes, por isso

é importante que não se aplique produtos de um mesmo grupo químico mais que duas vezes por safra (Santos Filho et al., 2009).

Apesar de existir legislação específica sobre uso, registro e comércio de agrotóxicos, entre outras medidas voltadas para a qualidade de vida e do meio ambiente, ela não é eficaz para evitar o uso irregular e até mesmo ilegal de insumos agrícolas (Geremia, 2011).

3.3. Métodos alternativos de controle da mancha marrom de alternaria

3.3.1. Controle Biológico

O controle biológico de pragas e doenças constitui-se em uma alternativa importante para o atendimento da crescente demanda da sociedade por produtos e alimentos livres de resíduos deixados pelas aplicações de agrotóxicos. Além disso, a questão ambiental está diretamente associada a esse ensejo social de mudança do padrão químico convencional para métodos integrados de produção (Lopes, 2009). Neste foco, o controle biológico utiliza diferentes meios para atingir seu alvo, restringindo as chances de seleção de linhagens resistentes. Além disso, não contamina os alimentos e nem o ambiente, participando naturalmente da ciclagem dos nutrientes (Ribeiro, 2009).

Do ponto de vista econômico, um inimigo natural efetivo é aquele que é capaz de regular a densidade populacional de uma praga e mantê-la em níveis abaixo do dano econômico estabelecido para um determinado cultivo. Dentro desse contexto, o uso de micro-organismos que antagonizam patógenos de plantas é uma opção sustentável para o controle de doenças na agricultura, doenças estas que se perpetuam por anos de cultivo agrícola, apesar do uso intenso de agrotóxicos (Ribeiro, 2009).

O controle biológico apresenta-se como uma estratégia de grande interesse e importância para viabilizar a redução ou substituição do uso de pesticidas. Nesta

estratégia o controle das doenças pode ser obtido pela manipulação do ambiente, de forma a favorecer a população dos micro-organismos benéficos presentes, ou pela introdução massal de antagonistas previamente selecionados (Lucon, 2008).

No Brasil, a aplicação de controle biológico não é ainda a primeira opção para os produtores e entre os aspectos que justificam a baixa aplicabilidade desta forma de controle, está a limitada disponibilidade de produtos comerciais registrados no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). Outra justificativa é a difusão de conceitos, princípios e vantagens envolvidos no uso de bioprodutos que é deficiente e a limitação do conhecimento dos consumidores sobre as consequências para a saúde pública e ambiental do uso intensivo de agrotóxicos (Machado et al., 2012).

Para o desenvolvimento de produtos de biocontrole, há necessidade de vários passos, como: coleta, isolamento, identificação e caracterização dos micro-organismos; desenvolvimento da produção dos mesmos em meios de cultivo; otimização do processo fermentativo e escalonamento dos processos; estudos de formulação e aplicação em campo; obtenção do Registro Especial Temporário (RET); registro e comercialização do produto (Silva & Mello, 2007).

3.3.1.1. *Bacillus* spp.

Grigoletti Júnior et al. (2000) enfatizam que *Bacillus* são geralmente encontrados no solo, habitando também ambientes extremos, como desertos e geleiras. A ação destas bactérias para controle biológico não é específica, atuando tanto sobre patógenos foliares como radiculares.

Algumas espécies de *Bacillus* são secretoras de substâncias estruturalmente semelhantes aos antibióticos, conhecidas como bacteriocinas, capazes de inibir ou matar uma grande variedade de outros micro-organismos (Garcia, 2008).

B. subtilis é efetivo na prevenção e controle de doenças causadas por várias espécies de fungos patogênicos, pois inibe a germinação dos esporos e o crescimento do tubo germinativo e micelial dos fungos, bloqueando o ataque do patógeno à superfície foliar pela formação de uma zona de inibição e também por indução de resistência no hospedeiro (D'Agostino & Morandi, 2009).

O biocontrole promovido por *B. subtilis* pode ser de natureza direta ou indireta (Ryu et al., 2004; Ongena et al., 2007; Leelasuphakul et al., 2008). O antagonismo direto tem o envolvimento de antibiose, como a síntese de substâncias antimicrobianas, a competição por espaço e nutrientes e a síntese de compostos voláteis (Leelasuphakul et al., 2008) e o mecanismo indireto é exercido pela resistência sistêmica induzida (ISR).

B. subtilis pode colonizar todos os órgãos vegetativos das plantas, sendo de forma epifítica, endofítica e na forma de rizobactéria, o que possibilita um amplo espectro para o uso agrônômico (Lanna Filho et al., 2010).

O sucesso do biocontrolador na promoção de crescimento de plantas está intrinsecamente relacionado com as suas características biológicas (Lanna Filho et al., 2010), como o auxílio à planta na solubilização de nutrientes, na fixação de nitrogênio, na síntese de fitormônios e na melhoria das condições do solo. Além dos benefícios indiretos: como supressão do ambiente dos fitopatógenos (Manjula & Podile, 2005).

O crescimento do sistema radicular pode ser induzido por isolados de *B. subtilis*, devido a sua capacidade de regulação hormonal das plantas através da síntese de auxina, giberilina e citocinina (Tsavkelova et al., 2006 e Persello-Cartieaux et al., 2003).

Além da ação contra patógenos fungicos, *B. subtilis* tem demonstrado ação contra nematóides. Os principais mecanismos associados à ação de rizobactérias como

B. subtilis no controle desses patógenos envolvem a redução da eclosão de larvas juvenis e da atratividade das raízes, em razão da produção de toxinas e alteração dos exsudatos radiculares, além da indução de resistência sistêmica na planta hospedeira (Sikora & Hoffmann-Hergarten, 1992 *apud* Fernandes et al., 2014).

Além disso, isolados desta bactéria apresentam facilidades para a manutenção de sua viabilidade em bioformulados. Assim, a potencialidade para o incremento da produtividade vegetal, bem como a redução de doenças, tem se tornado evidente para essa espécie de *Bacillus* (Lanna Filho et al., 2010).

Arguelles-Arias et al. (2009), ao estudar um isolado de *B. amyloliquefaciens* designado como GA1, identificaram que este isolado em particular pode representar uma importante fonte de antibióticos e outros metabólitos secundários que podem ser aplicados no biocontrole de patógenos de plantas. Trivedi e Pandey (2008) identificaram que isolados de *B. megaterium* são capazes de produzir compostos voláteis ou com capacidade de difusão, que inibem o crescimento de fungos fitopatogênicos como *Alternaria alternata* e *Fusarium oxysporum*.

3.3.1.2. *Trichoderma* spp.

Amplamente distribuído por todo o mundo, o gênero *Trichoderma* ocorre em quase todos os tipos de solo e ambientes naturais, especialmente naqueles contendo matéria orgânica. Muitas espécies de *Trichoderma* são também encontradas na rizosfera de plantas. O fato das espécies de *Trichoderma* desenvolverem-se em vários substratos justifica a importância biotecnológica atribuída a esse grupo de fungos (Esposito & Silva, 1998).

Trichoderma spp. são fungos de vida livre, ubíquos e altamente interativos com a planta na raiz e solo, bem como no interior de plantas (Pomella & Ribeiro, 2009).

As espécies do gênero *Trichoderma* exibem variabilidade entre as linhagens com relação à atividade de biocontrole, espectro de ação contra hospedeiros, propriedades fisiológicas e bioquímicas, como também, adaptabilidade ecológica e ambiental (Silva, 2000 apud Silva & Mello, 2007).

Várias espécies de *Trichoderma* possuem um conjunto de mecanismos de ação e produzem substâncias antimicrobianas que garantem um amplo espectro de atividade contra diferentes fitopatógenos, portanto possuem capacidade de controlar várias doenças. Além disso, algumas linhagens de *Trichoderma* promovem o crescimento de plantas pelo aumento na disponibilidade de nutrientes e produção de hormônios de crescimento (Lucon, 2008).

O parasitismo parece ser o mecanismo mais eficiente de antagonismo do controle biológico natural. Os hiperparasitas por viverem às custas dos patógenos, estão sujeitos as mesmas variações ambientais e dependem das mesmas condições do organismo parasitado. Dentre os fungos filamentosos, *Trichoderma* é reconhecidamente o hiperparasita mais importante (Grigoletti Júnior et al., 2000).

As propriedades apresentadas por isolados antagonistas de *Trichoderma* são: Competição - segundo Bettiol e Ghini (1995), a competição é referente à interação entre dois ou mais organismos empenhados na mesma ação ou substrato. A competição entre micro-organismos ocorre, principalmente, por alimento, espaço e oxigênio. A competição por nutrientes com fitopatógenos, inclusive com aqueles de menor tamanho, pode proporcionar condições ambientais favoráveis às plantas e com isto promover seu crescimento e desenvolvimento (Almança, 2008); Antibiose - é definida como a interação entre organismos na qual indivíduos de uma população secretam metabólitos voláteis e/ou não-voláteis capazes de inibir ou impedir o desenvolvimento dos indivíduos de uma população de outra espécie. Esses metabólitos são usualmente

denominados antibióticos (Benítez et al., 2004); Parasitismo ou hiperparasitismo - é a situação em que um micro-organismo vive sobre e alimenta-se de outro. Os hiperparasitas atacam hifas e estruturas de reprodução e sobrevivência dos patógenos de plantas, reduzindo a infecção e o inóculo do patógeno (Bettiol & Ghini, 1995). Nesse contexto, Ribeiro (2009) descreve que *Trichoderma* spp. pode exercer biocontrole direto numa variedade de fungos, sendo que essa habilidade, assim como as outras, varia de isolado para isolado, de espécie para espécie, e é dependente do fungo antagonizado; Predação – é a habilidade da hifa de *Trichoderma* spp. crescer ativamente em direção às hifas de outros fungos, com o objetivo de predação e de alimentação (Zucchi, 2010).

Entretanto, o importante para o controle biológico não é a ocorrência isolada de uma ação antagonista, mas sim um complexo de mecanismos de ação que funcionam simultaneamente (Bettiol et al., 2009). E de acordo com Harman (2000), é muito provável a existência de outros mecanismos de ação ainda não descritos desenvolvidos pelas espécies antagonistas de *Trichoderma*.

3.3.2. Ácidos Húmicos e Fúlvicos

O solo em sua magnitude é um sistema vivo e em contínua evolução. Nele vivem milhares de organismos e animais intimamente dependentes da matéria orgânica, que lhes fornece energia e nutrientes para sua sobrevivência. A natureza predominante da população microbiana, seu número, as espécies e o seu grau de atividade são consequências da qualidade e quantidade dos materiais que retroalimentam a matéria orgânica que lhes serve de alimento; e das condições físicas (textura, aeração e umidade) e químicas (salinidade, nutrientes, pH e elementos tóxicos) encontradas no solo (Silva Filho & Silva, 2002). O estudo da matéria orgânica em agroecossistemas

brasileiros é um tema estratégico para que se alcance a sustentabilidade da agricultura em ecossistemas tropicais e de preservação ambiental (Cunha et al., 2007).

As substâncias húmicas são compostos poliméricos heterogêneos, resultantes da decomposição de resíduos vegetais e animais em diferentes estágios de decomposição. Genericamente é uma mistura de lipídios, proteínas, carboidratos e compostos fenólicos que fornecem grande quantidade de grupos funcionais em suas estruturas, passíveis às interações que beneficiem processos de biodisponibilidade de nutrientes para o ambiente (Stehlickova et al., 2009).

As substâncias húmicas podem ser classificadas de acordo com a sua solubilidade, reatividade e tamanho de suas moléculas em humina, ácidos húmicos e fúlvicos. A humina é a fração insolúvel tanto em meio alcalino como em meio ácido; o ácido húmico é a fração escura extraída geralmente em meio alcalino e insolúvel em meio ácido diluído; e os ácidos fúlvicos são frações coloridas alcalino-solúveis que se mantêm em solução após a remoção dos ácidos húmicos por acidificação (Oliveira, 2011).

O emprego agrícola de produtos à base de ácidos húmicos como fertilizantes orgânicos, condicionadores de solo e estimuladores fisiológicos tem crescido bastante nas últimas décadas em todo o mundo e, mais recentemente, no Brasil. Existe hoje no mercado nacional uma série de produtos que contêm ácidos húmicos, extraídos de depósitos minerais (leonardita, lignita, etc), solos orgânicos (turfeiras) ou obtidos por humificação de resíduos vegetais (Benites et al., 2006).

As indústrias de fertilizantes utilizam turfa, xisto betuminoso e carvão mineral na composição dos adubos organo-minerais para aumentar os teores de matéria orgânica do solo, dando origem ao chamado complexo coloidal argilo húmico, responsável pela

alteração das propriedades físicas do solo, como aeração e retenção de água, entre outras (Clasen et al., 1998).

A fertilidade dos solos geralmente é fortemente relacionada às características moleculares da fração alcalino solúvel do carbono orgânico, isto é, os ácidos húmicos (AH). Esta fração, ao mesmo tempo é dinâmica, refletindo mudanças no uso do solo, e também é uma das frações responsáveis pela acumulação da matéria orgânica no solo (Cunha et al., 2007). A função das SH no solo está intimamente ligada às suas características: física, química e biológica. Fisicamente, o húmus interfere no solo modificando sua cor, textura, estrutura, etc. Quimicamente, atua modificando a solubilidade de certos minerais do solo, combinando-se com alguns elementos. Biologicamente, o húmus serve para o desenvolvimento das plantas superiores e propiciando um lento e contínuo fluxo de elementos nutritivos para a alimentação vegetal (Tavares & Costa, 2005).

Os ácidos fúlvicos (AF) desempenha várias funções importantes no solo que auxiliam a manter as suas propriedades físicas e químicas e sua capacidade de complexar íons metálicos é uma delas. A ação quelante do AF permite que íons metálicos essenciais não sejam lixiviados e que íons tóxicos tenham sua ação nociva diminuída. Essa função determina, em parte, a disponibilidade de metais no solo influenciando em sua nutrição (Souza et al., 2006).

Pela importância que a matéria orgânica exerce no que diz respeito à sustentabilidade de ecossistemas e em razão das alterações que diferentes sistemas de uso e manejo de solo exercem sobre a dinâmica do carbono, sobre o grau de fertilidade de solos e sobre o efeito estufa, torna-se necessária a realização de ações de pesquisas no sentido de verificar quais as práticas que mais contribuem para aumentar o armazenamento de matéria orgânica no solo (Dias et al., 2007).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Local

Os testes *in vitro* e *in vivo* foram desenvolvidos nas instalações da empresa Beifiur Ltda., localizada nas coordenadas geográficas de latitude S29°13'43.9", longitude O51°30'47.1" e altitude aproximada de 679 metros, na cidade de Garibaldi/RS. O trabalho *in vivo* foi realizado em uma estufa no sentido norte-sul, com dimensões de 19,20 m de largura por 30 m de comprimento, totalizando 576 m², e o *in vitro* no laboratório de pesquisa da empresa.

4.2. Material vegetal

Foram utilizadas 192 mudas de tangerineiras “Ponkan” de 1 ano de idade dispostas em vasos de 5 litros em casa de vegetação. As mudas foram adquiridas do Viveiro Zimmer, situado na cidade de Pareci Novo, RS.

4.3. Obtenção dos micro-organismos

O isolado do fungo de *Alternaria alternata* utilizado neste trabalho pertence a Micoteca do Laboratório de Fitopatologia, do Instituto de Biotecnologia, da Universidade de Caxias do Sul. Para o desenvolvimento do trabalho o fungo *A. alternata* foi revigorado em meio de cultura BDA (batata, dextrose e ágar), em incubadora com temperatura de 25°C com fotoperíodo de 12 horas, durante 7 dias. Foram utilizados suspensões de *Trichoderma* spp. já disponíveis na formulação de TRICHODEL[®] e de *Bacillus subtilis* presentes na formulação de BACTEL[®] ambos da empresa ECCB Ltda. para os testes *in vitro* e *in vivo*.

4.3.1 Produção de inóculo de *Alternaria alternata*

O fungo *A. alternata* foi repicado em placas de Petri contendo meio BDA (batata, dextrose e ágar). Estas placas foram incubadas por sete dias a 25° C com fotoperíodo de 12 horas. Para a obtenção da suspensão de conídios foi adicionado 10mL de água destilada esterilizada na superfície de cada placa. Foi feita uma raspagem com o auxílio de uma alça de Drigalsky para a retirada dos conídios. Essa suspensão foi filtrada em dupla camada de gaze esterilizada. A concentração de conídios da suspensão foi ajustada para 1×10^5 conídios.mL⁻¹. Essa suspensão foi utilizada no ensaio de patogenicidade e no ensaio *in vivo*.

4.3.2 Avaliação da patogenicidade do isolado de *Alternaria alternata*

Foi utilizada a metodologia adaptada de Peever et al., (1999), foram selecionadas 20 plantas de tangerineiras (10% do total das mudas utilizadas no teste *in vivo*) e coletadas 4 folhas jovens de cada planta selecionada. As folhas foram lavadas em água corrente e acondicionadas em placa de Petri (4 folhas por placa, sendo que cada folha representa uma repetição), contendo uma camada de papel filtro e algodão umedecidos com água destilada autoclavada (figura 4). Logo em seguida, 2mL/folha de uma suspensão aquosa com 1×10^5 conídios.mL⁻¹, foram pulverizados com borrifador manual sobre a superfície abaxial das folhas, que permaneceram incubadas a 25°C, fotoperíodo de 12 horas, por 3 dias. As folhas foram avaliadas visualmente para se verificar o surgimento de lesões causadas pelo patógeno, provando ou não a sua patogenicidade nas folhas de tangerineiras, as avaliações ocorreram nos períodos de 48 e 72 horas após a incubação.

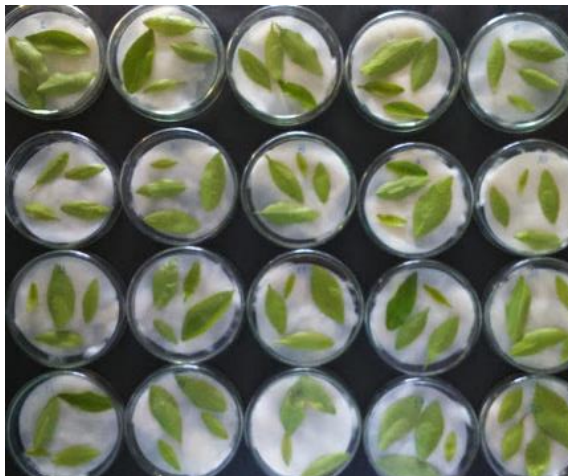


Figura 4. Avaliação da patogenicidade do isolado de *Alternaria alternata*, *in vitro*, utilizando folhas de tangerineiras.

4.3.3. Teste de viabilidade dos conídios de *Trichoderma* spp.

Para o teste de viabilidade dos conídios adaptou-se as metodologias de Ridell (1950) e Bettiol et al., (2012), dentro de placas de Petri, foram colocados bastão de vidro em forma de V como suporte para uma lâmina contendo sobre ela uma camada de BDA (figura 5).



Figura 5. Esquema representativo do teste de viabilidade dos conídios de *Trichoderma* spp.

Sobre essa camada de BDA foram colocadas três alíquotas de 1 μ L do produto Trichodel[®] com o auxílio de uma alça de platina, o teste foi realizado em triplicata.

As placas contendo as lâminas com as gotas de suspensão foram transferidas para incubadora a 25° C, no escuro. Após iniciarem a germinação (apresenta variação de

9 a 20 h após a incubação em função do produto) foi avaliada a viabilidade usando microscópio óptico no aumento de 400x.

O conídio foi considerado viável, quando germinado. Foi contado pelo menos 50 conídios por alíquota. A taxa média de viabilidade foi calculada utilizando a fórmula: Viabilidade (%) = (média do número de conídios viáveis/total de conídios) X 100.

4.3.4. Avaliação do potencial antagônico de suspensão de conídios de *Trichoderma* spp.

O produto comercial formulado à base de *Trichoderma* spp. foi testado contra o isolado de *A. alternata*. Os fungos foram inoculados em cultura dupla, em placas de Petri contendo o meio BDA (figura 6). *A. Alternata* foi inoculado 24 horas antes de *Trichoderma* e as placas foram mantidas a 25° C e fotoperíodo de 12 horas. O *Trichoderma* desafiado foi considerado um tratamento, realizado com quatro repetições, onde cada placa de Petri representa uma repetição. Para avaliação do antagonismo foi utilizada a escala proposta por Bell et al., (1982) (1= antagonista cresce ¼ da placa; 2 = antagonista cresce 2/4 da placa; 3 = antagonista cresce ¾ e sobrepõem-se a colônia do fitopatógeno; 4 = antagonista cresce 4/4 da placa e sobrepõem-se a colônia do fitopatógeno).

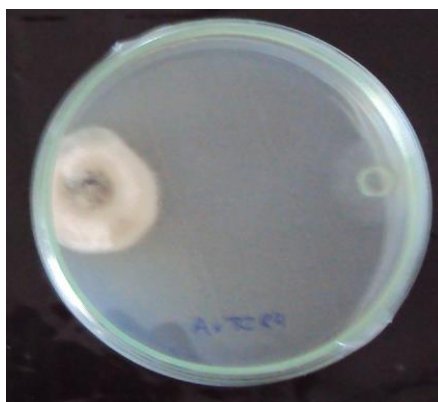


Figura 6. Avaliação do potencial antagônico de *Trichoderma* spp. contra *Alternaria alternata* em cultura dupla.

4.3.5. Teste de viabilidade do formulado de *Bacillus subtilis*

Para a avaliação da viabilidade de *Bacillus subtilis* do produto Bactel[®], uma alíquota de 1 mL do produto foi diluída em 9 mL de solução salina (10^{-1}) (9g de Cloreto de sódio em 1000mL de água destilada), 1mL dessa nova solução foi diluída novamente em 9 mL de solução salina (10^{-2}) e assim, sucessivamente, até a diluição 10^{-8} . 100µL da solução das diluições 10^{-7} e 10^{-8} foram colocadas no centro da placa de Petri contendo meio de cultura AN e espalhadas com a alça de Drigalski. As placas foram mantidas em incubadora em temperatura igual a 30°C (+/- 0,5) por 24 horas. Foram consideráveis viáveis as colônias crescidas na placa de Petri, sendo utilizado o cálculo de unidade formadora de colônia (UFC)/mL para verificar a contagem de conídios viáveis. O experimento foi realizado com 4 repetições. (UFC/mL = média do número de colônias em cada alíquota X diluição utilizada X 10).

4.3.6. Teste de antagonismo com a formulação de *Bacillus subtilis*

Para avaliação da antibiose de *B. subtilis*, base do produto comercial BACTEL[®] sobre o desenvolvimento de *A. alternata*, a metodologia empregada foi a de Angonese et al. (2009). O fitopatógeno foi inoculado no centro da placa de Petri, 24 horas antes da bactéria e incubado a 25°C, com fotoperíodo de 12 horas. O *B. subtilis* foi inoculado através de estrias a 1 cm da borda da placa, foram feitas duas estrias em extremidades opostas (figura 7), as placas foram mantidas em incubadora, com fotoperíodo de 12 horas e temperatura igual a 25°C por sete dias. Para a avaliação foi observada a formação ou não da zona de inibição de *Bacillus subtilis* em relação ao fitopatógeno, comparando-se com a placa testemunha (inoculada somente com o fitopatógeno). Este teste foi realizado com quatro repetições.

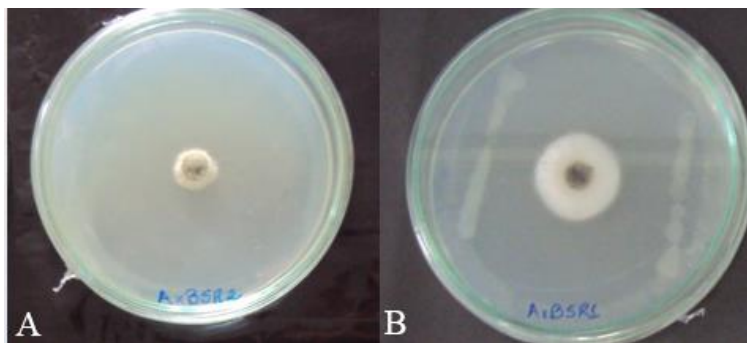


Figura 7. Antagonismo de *Bacillus subtilis* em *Alternaria alternata*. A) Placa testemunha, contendo somente o fitopatógeno. B) Fitopatógeno desafiado pelo biocontrolador.

4.4. Efeito do fertilizante sobre os agentes de biocontrole

Para avaliar o efeito do fertilizante organomineral Classe A 645, um disco de ágar (0,8 cm de diâmetro) contendo *Trichoderma* spp. foi colocado no centro de uma placa de Petri contendo BDA ou BDA acrescido de 6 mL.L^{-1} (dosagem máxima indicada pelo fabricante) do fertilizante organomineral, sendo o crescimento do micro-organismo acompanhado durante 7 dias. A colônia do fungo foi medida com régua 24 horas após a colocação da colônia no meio de cultura e também, 72 horas, 120 horas e 168 horas (7 dias) depois.

Para avaliar o efeito do fertilizante organomineral no crescimento de *Bacillus subtilis* foram comparados o crescimento da bactéria em três tratamentos: fertilizante mineral, água e o fertilizante organomineral classe A 645. Foi diluído 1mL do fertilizante mineral contendo 8% de Nitrogênio, 6% de Fósforo e 7% de Potássio em 100 mL de água em erlenmeyer de 250mL. Para o fertilizante organomineral foi utilizada a mesma diluição em água em erlenmeyer de mesmo volume. A todas as soluções após autoclavagem, foram acrescidas 100 μ L da solução bacteriana, e incubadas em agitador com temperatura de 30°C e agitação de 150rpm. Foi avaliada a

população de *Bacillus subtilis* em UFC/mL em cada tratamento nos dias 0, 1 e 3 após a inoculação. Para a avaliação das unidades formadoras de colônia (UFC/mL) uma alíquota de 1 mL da solução foi diluída em 9 mL de solução salina (10^{-1}) (9g de Cloreto de sódio em 1000mL de água destilada), 1mL dessa nova solução foi diluída novamente em 9 mL de solução salina (10^{-2}) e assim, sucessivamente, até a diluição 10^{-5} .

100µL da solução das diluições 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} foram colocadas no centro da placa de Petri contendo meio de cultura AN e espalhadas com a alça de Drigalski. As placas foram mantidas em incubadora em temperatura igual a 30°C (+/- 0,5) por 24 horas em cada dia de avaliação. Após o crescimento das colônias, elas foram quantificadas e utilizada a fórmula: UFC/mL = média do número de colônias em cada alíquota X diluição utilizada X 10 para a quantificação populacional das bactérias. Todos os ensaios foram realizados com 4 repetições.

4.5. Avaliação *in vivo*

O experimento foi realizado com delineamento inteiramente casualizado, constituído de 8 tratamentos e 4 repetições (Tabela 1). Cada repetição foi composta por 6 plantas, dispostas em vasos no interior da casa de vegetação.

Tabela 1. Tratamentos utilizados nos ensaios *in vivo* em plantas de tangerineiras

Nº	Tratamentos	Marca Comercial	Dosagem	Número de aplicações
1	Testemunha (somente água)			2
2	Triazol + Estrobilurina	Nativo*	0,3 mL.L ⁻¹	2
3	<i>Trichoderma</i> spp.	TRICHODEL	1mL.L ⁻¹	2
4	<i>B. subtilis</i>	BACTEL	1mL.L ⁻¹	2
5	Fertilizante com ácido húmico e	Beifort	1mL.L ⁻¹	2

ácido fúlvico			
6	<i>Trichoderma</i> + <i>B. subtilis</i>	TRICHODEL e BACTEL	1mL.L ^{-1**} 2
7	Fertilizante com ácido húmico e ácido fúlvico + <i>Trichoderma</i>	Beifort e TRICHODEL	1mL.L ^{-1**} 2
8	Fertilizante com ácido húmico e ácido fúlvico + <i>B. subtilis</i>	Beifort e BACTEL	1mL.L ^{-1**} 2

* fungicida químico registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento para uso na cultura de tangerineiras, no controle da Mancha Marrom de *Alternaria*.

** Utilizado 0,5 mL de cada produto, totalizando 1 mL diluído em água.

As mudas foram inoculadas, utilizando um borrifador manual, com uma suspensão aquosa de conídios de *A. alternata* na totalidade da parte aérea, e, em seguida foram protegidas por sacos plásticos previamente umedecidos na parte interior. Os sacos plásticos foram borrifados com 10 mL de água destilada, para garantir alta umidade relativa para a planta (Figura 8). A inoculação ocorreu na fase de brotação das mudas. E os tratamentos foram aplicados no aparecimento dos primeiros sintomas nas folhas, com intervalo de 7 dias entre eles, totalizando duas aplicações por tratamento.



Figura 8. Plantas de tangerineiras utilizadas para o tratamento *in vivo*. A) Inoculação de conídios de *Alternaria alternata*. B) Sacos plásticos umedecidos para garantir alta umidade relativa do ar para a planta.

Os tratamentos foram aplicados imediatamente após serem misturados a água, via foliar, com auxílio de um borrifador manual até o escoamento do líquido pelas folhas da planta.

As plantas foram avaliadas 7 dias e 15 dias após os tratamentos. A avaliação foi realizada nos 20 cm superiores da planta, visto que na parte apical estão as folhas mais jovens que são mais suscetíveis ao ataque do patógeno. Dentro deste intervalo de 20 cm, foram selecionadas dez folhas ao acaso e marcadas para serem avaliadas pela incidência de manchas e pela porcentagem da área lesionada, mediante o uso da escala diagramática validada por Martelli (2011) (figura 9).

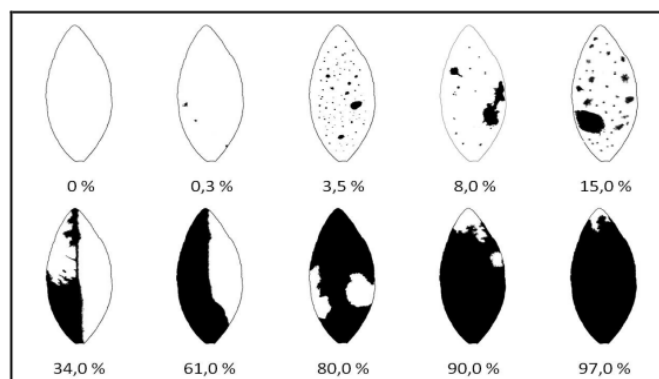


Figura 9. Representação de escala diagramática de dez níveis de Martelli (2011) para determinar a porcentagem de área foliar com sintoma da mancha causada por *Alternaria alternata*. Os níveis de sintoma em dez notas onde “0” representa a folha sem sintomas e as notas de “1” a “9” representam 0,3; 3,5; 8; 15; 34; 61; 80; 90 e 97% de área foliar afetada pela mancha. Martelli (2011).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Teste da patogenicidade

No teste de patogenicidade de *A. alternata* em folhas jovens de tangerina Ponkan realizado *in vitro*, os sintomas iniciais da doença foram visualizados em 48 horas em todas as folhas testadas, e, em 72 horas houve aumento nos sintomas da doença, atingindo todo o limbo foliar em pequenas manchas (figura 10), confirmando a patogenicidade de *A. alternata* em folhas de tangerineiras.

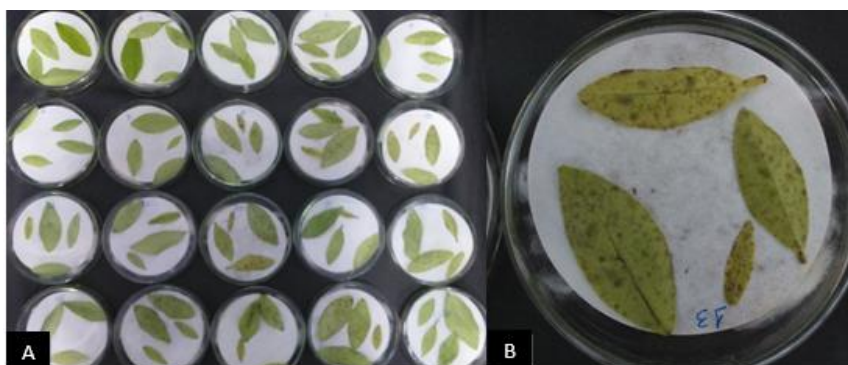


Figura 10. Sintomas de mancha marrom de alternaria em folhas jovens de tangerineiras.

A) Folhas de tangerineiras Ponkan com sintomas da doença, 48 horas após a inoculação do patógeno. B) Detalhe da folha com o sintoma da doença.

Martelli (2011) também observou lesões de MMA em variedades suscetíveis, na variedade Ponkan ele visualizou as lesões em 48 horas após a inoculação. Chagas et al., (2007) observaram sintomas quatro dias após a inoculação e a lesão se expandiu até atingir todo a área foliar, o que ocorreu em dez dias. Esses dados comprovam a patogenicidade deste patógeno em variedades suscetíveis de citros.

5.2. Viabilidade e antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* spp. em *Alternaria Alternata*

Os isolados de *Trichoderma* spp. foram avaliados quanto a sua viabilidade. A primeira avaliação foi feita utilizando a metodologia adaptada de Ridell (1950) e Bettiol

et al. (2012), que consiste na visualização, em microscópio óptico no aumento de 400x da germinação dos conídios (figura 11). Nessa avaliação os conídios de *Trichoderma* sp. obtiveram germinação média de 88,69%.

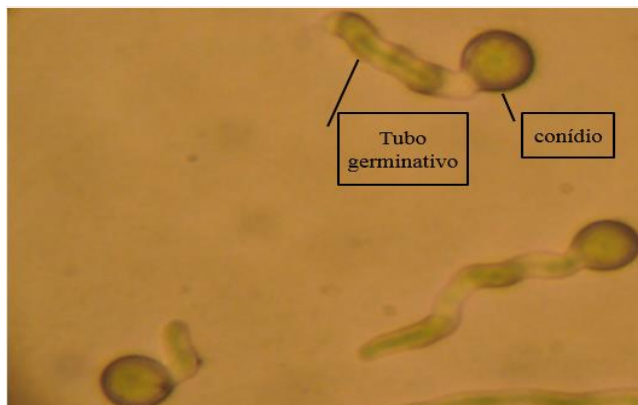


Figura 11. Germinação dos conídios de *Trichoderma* spp.

Na análise dos dados sobre o potencial antagonístico, o antagonista *Trichoderma* spp. alcançou nota máxima (4), demonstrando que o antagonista cresceu 4/4 da placa e sobrepôs-se a colônia do fitoparasita, de acordo com a escala de notas de Bell et al., (1982), (figura 12). Este resultado sugere maior velocidade de crescimento e utilização dos nutrientes pelo antagonista, diferentemente do patógeno. Foi observado também que os isolados antagonistas apresentaram esporulação sobre as colônias do patógeno, demonstrando hiperparasitismo sobre *A. alternata*.

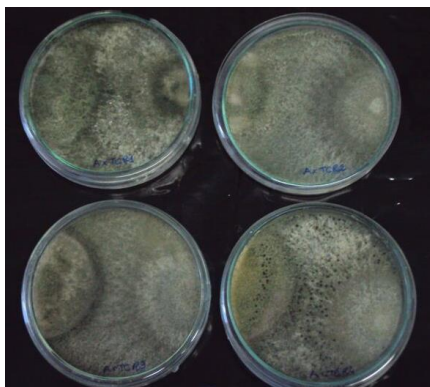


Figura 12. Antagonismo de *Trichoderma* spp. em *Alternaria alternata* após período de incubação de 7 dias.

Kupper et al. (2003) relatam que diversas vezes a eficácia dos antagonistas *in vitro* ou em casa de vegetação podem ser insuficientes para estabelecer o limiar de população exigida para um biocontrole no campo, mas pode servir como indicativo da viabilidade no controle de fitopatógenos sob condições naturais de infecção.

Faria et al. (2002) fizeram o pareamento e dois isolados de *T. harzianum* testados apresentaram antagonismo a *A. alternata*, esse dado corrobora com o resultado obtido neste trabalho.

5.3. Viabilidade e antagonismo *in vitro* de *Bacillus subtilis* em *Alternaria alternata*

Para a verificação da viabilidade de *Bacillus subtilis* do produto Bactel[®] foi utilizada a contagem de colônias através de diluições seriadas em meio de cultura de ágar nutritivo com gotas de 100µL do produto e o resultado obtido foi de $2,9 \times 10^9$ UFC/mL, resultado superior a garantia do fabricante que é de 1×10^9 UFC/mL.

No teste de antagonismo de *Bacillus subtilis* é possível observar a antibiose de *Bacillus subtilis* em *Alternaria alternata* (figura 13) onde o crescimento do fitopatógeno foi reduzido, resultados semelhantes foram encontrados por Veiga et al., (2013).

Angonese et al., 2009 demonstram que os isolados de *Bacillus* spp. avaliados, foram capazes de antagonizar a maioria dos fitopatógenos alvo (*Alternaria* spp. P20/09; *Botrytis* spp. 996, *Fusarium oxysporum* 120512 e *Colletotrichum* spp. 011/09), foi verificado também a formação de halo de inibição em torno das colônias dos isolados de *Bacillus* spp. Essa área também foi observada no presente estudo e pode ter sido determinada pela liberação de metabólitos de *Bacillus*, um dos fatores responsáveis pela inibição do crescimento dos fungos fitopatogênicos. Os resultados obtidos, corroboram

os resultados relatados pelos autores referenciados e demonstram que o gênero *Bacillus* possuem grande potencial para controle biológico de fungos alvos.

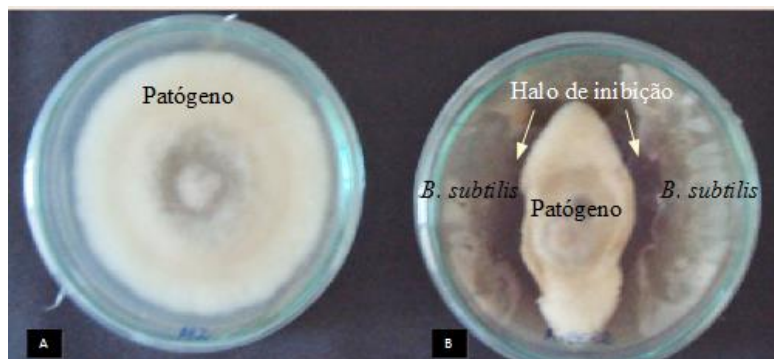


Figura 13. Antagonismo de *Bacillus subtilis* em *Alternaria alternata*. A) Crescimento de *Alternaria alternata* em placa controle. B) Crescimento do fitopatógeno em antagonismo com *Bacillus subtilis*.

5.4. Efeito do fertilizante sobre os agentes de biocontrole

Foi avaliado o crescimento do *Trichoderma* spp., quando acrescido o fertilizante ao meio de cultura BDA na dosagem de 6 mL.L^{-1} em comparação com o meio de cultura utilizando somente BDA. Os resultados indicam que a utilização do fertilizante em conjunto com o controle biológico pode favorecer o biocontrolador (figura 14). Diferenças no crescimento podem ser vistas nos dias 2, 3 e 5 sendo que a presença do fertilizante no meio de cultivo beneficiou o crescimento do fungo, apresentando diferenças de 0,54 cm , 0,88 cm e 0,94 cm, respectivamente (figura 14).

Aos 7 dias, o tamanho das colônias de equivalem, demonstrando uma maior velocidade de crescimento em meio BDA + fertilizante.

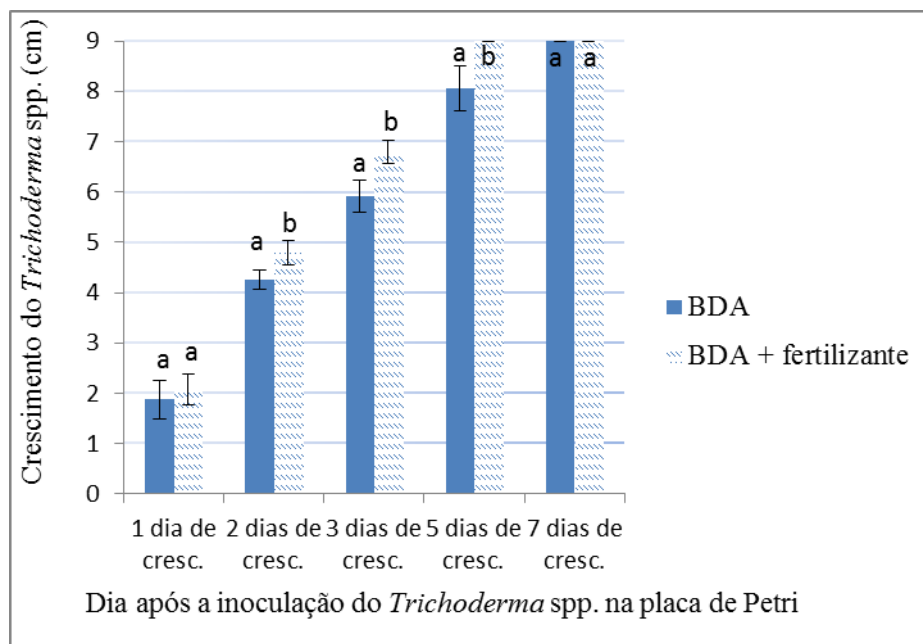


Figura 14. Crescimento do *Trichoderma* spp. em meio BDA + fertilizante e somente BDA.

*Médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Como verificado na figura 15, a população de *Bacillus subtilis* aumentou após 24 horas, de $6,04 \times 10^4$ UFC/mL, concentração verificada quando da adição da bactéria na solução organomineral autoclavada, para $1,16 \times 10^8$ UFC/mL, sugerindo que a solução organomineral foi utilizada como fonte de carbono para crescimento das bactérias. No tratamento com água autoclavada, a população de micro-organismos diminuiu de $5,33 \times 10^4$ UFC/mL no momento da mistura para $3,32 \times 10^4$ UFC/mL (em 24 horas) e $3,99 \times 10^3$ UFC/mL (no terceiro dia). Ainda na Figura 14, verifica-se que quando houve adição de bactérias ao fertilizante mineral autoclavado, a sua população diminuiu após 24 horas de inoculação, como já esperado, devido a ausência de fonte de carbono na solução mineral. Demonstrando a importância do carbono orgânico contido no fertilizante organomineral para o crescimento populacional de micro-organismos,

colaborando com o crescimento de agentes biológicos quando utilizado em conjunto com produtos biológicos.

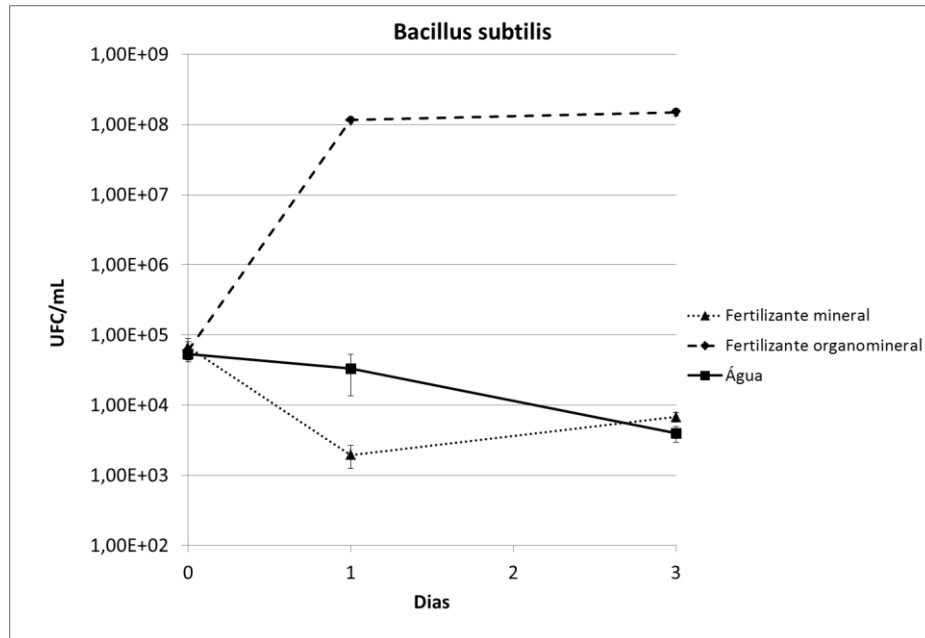


Figura 15. Demonstração da população de *Bacillus subtilis* nas soluções de fertilizante organomineral, fertilizante mineral e água autoclavada.

5.5. Avaliação *in vivo*

No teste *in vivo*, as plantas receberam os diferentes tratamentos na presença dos primeiros sintomas nas folhas. As plantas testemunhas apresentaram a maior nota na escala diagramática, ou seja, maior presença de sintomas nas folhas (90 a 97% de mancha na área foliar). Após 15 dias já apareceram sintomas nos ramos, desfolha e lesões praticamente em toda a área foliar devido à alta agressividade do patógeno (figura 16).



Figura 16. Sintomas de mancha marrom de alternaria nas plantas testemunhas.

A menor incidência de sintomas nas folhas foi alcançado pelo tratamento com o fungicida (T2) com notas médias de 1,25 e 1,50 na primeira e na segunda avaliação, respectivamente, seguido pelos tratamentos: Fertilizante com AH e AF + *Trichoderma* (T7), *Trichoderma* (T3) e *Trichoderma* + *B. subtilis* (T6) que não obtiveram diferenças estatísticas na primeira avaliação que ocorreu 7 dias após o primeiro tratamento e obtiveram média das notas na escala diagramática de 1,83, 1,92 e 2,0 respectivamente (figura 17).

Na segunda avaliação, que ocorreu 7 dias após o segundo tratamento, o fungo *Trichoderma* spp. teve controle superior ao tratamento com *Bacillus subtilis* e o fertilizante organomineral classe A – 645. Demonstrando o controle do patógeno em teste *in vivo* para plantas de tangerineiras.

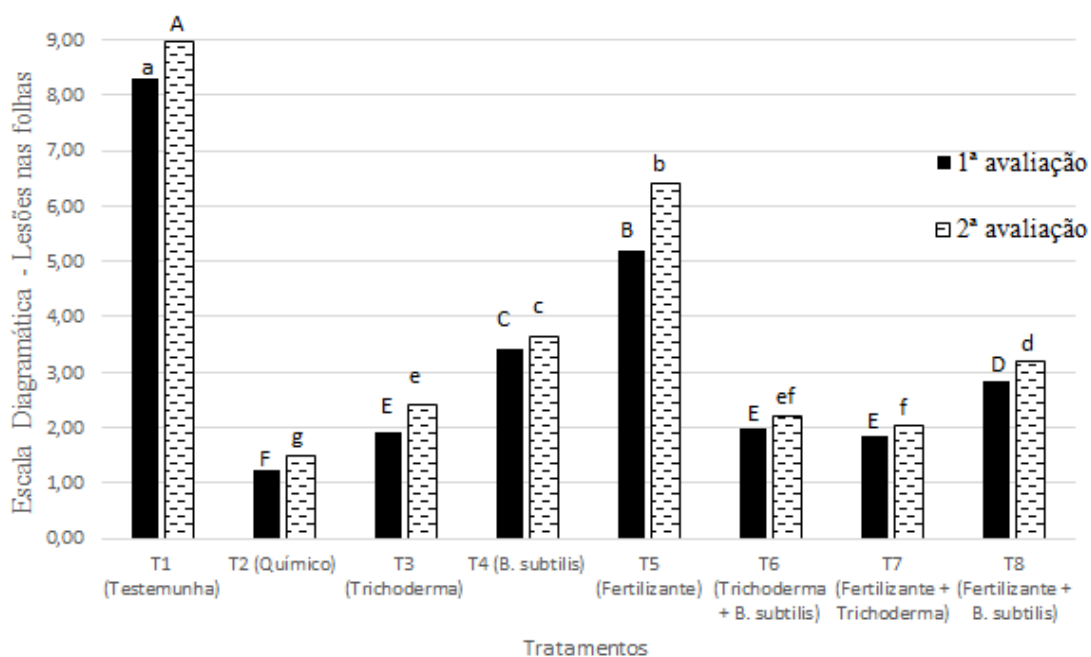


Figura 17. Média das notas na escala diagramática do nível de lesões nas folhas jovens de tangerineiras Ponkan nas avaliações de 7 e 15 dias após o primeiro tratamento.

*As médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Estudos como de Macedo (2014), Silva et al., (2011) e Benelli (2014) com *trichoderma* spp. também demonstraram que o bioagente possui capacidade de controle de diversos patógenos, tendo muitas vezes resultados de controle semelhante ao fungicida químico. Tornando-se uma opção de controle de patógenos ao produtor que deseja diminuir ou eliminar o uso de fungicidas químicos.

O tratamento com *B. subtilis* controlou a MMA com notas na escala diagramática de 3,43 e 3,67 nas duas avaliações respectivamente, sendo mais eficaz no controle do patógeno do que somente o uso de fertilizante organomineral classe 645. Porém, quando o produto a base de *Bacillus subtilis* foi utilizado em mistura com o fertilizante com ácidos húmicos e fúlvicos, o seu potencial de controle aumentou,

sugerindo que a bactéria se utiliza do fertilizante como fonte de alimento para seu crescimento, como demonstrado no teste *in vitro*.

Na mistura dos produtos à base de *Trichoderma* spp. e *Bacillus subtilis* (T6) não há diferença estatística quando se compara a mistura dos dois agentes com o *Trichoderma* spp. (T3), porém, quando compara-se a mistura com o tratamento à base de *Bacillus subtilis* (T4) pode-se verificar que o controle do patógeno foi maior com a mistura dos produtos. Concluindo-se que o bioagente *Trichoderma* spp. tem um maior potencial de controle do patógeno *Alternaria alternata* em folhas de tangerineiras.

Kupper et al., (2013) estudaram *Bacillus subtilis* para o controle de *Penicillium digitatum* em frutos cítricos, os resultados mostraram que a maioria dos isolados bacterianos inibiram o crescimento micelial do fitopatógeno.

Maciel et al., (2014) testaram o isolado de *Bacillus subtilis* UFV3918 contra *Fusarium sambucinum* em *Pinus elliottii* ENGELM e concluíram que o isolado foi eficiente no controle *in vitro* e promissor no biocontrole *in vivo*. Enquanto, Nogueira et al., (2011) testou o produto comercial Serenade a base de *Bacillus subtilis* na dose 7,5 mL.L⁻¹, aplicados em pulverização preventiva que controlou satisfatoriamente o oídio em meloeiro com índices de controle semelhante aos produtos químicos Amistar® e Score®.

Todos esses estudos demonstram o potencial de *Bacillus subtilis* como agente de biocontrole de doenças de plantas, que serão corroborados com os resultados encontrados nesse trabalho.

O tratamento com o fertilizante também reduziu os sintomas causados pela *Alternaria alternata* atingindo as notas de 5,2 e 6,41 na escala diagramática nos dias 7 e 15 respectivamente (figura 17), diferindo estatisticamente das plantas testemunhas. Há poucos estudos sobre o potencial de ácidos húmicos e fúlvicos no desenvolvimento de

resistência à doenças em plantas. Portanto, é necessário mais pesquisas relacionadas ao auxílio desses ácidos no controle e/ou a resistência de plantas à doenças.

O controle do patógeno realizado pelo fertilizante pode ter ocorrido devido a duas hipóteses, sendo a primeira ligada a nutrição da planta, pois teoricamente uma planta melhor nutrida resistiria melhor ao ataque de patógenos. A segunda hipótese seria a presença de micro-organismos no fertilizante. Os micro-organismos do fertilizante foram isolados e identificados por sequenciamento genético através do laboratório Analitus Análises Biotecnológicas de Caxias do Sul e entre os microrganismos identificados estão o *Bacillus amyloliquefaciens* e o *Bacillus megaterium*, que são micro-organismos utilizados no controle biológico de fitopatógenos como demonstrado nos trabalhos de Arguelles-Arias et al., (2009) e Trivedi e Pandey (2008), porém, testes devem ser realizados para comprovar a eficiência desses microrganismos no controle biológico.

O uso da mistura do produto a base de *Trichoderma* spp. + o fertilizante organomineral (T7), mostrou-se eficiente no controle do patógeno na primeira e na segunda avaliação. Na primeira avaliação não ocorreu diferença estatística entre os dois tratamentos, demonstrando que o uso do fertilizante auxilia o biocontrolador, pois no T7 (*Trichoderma* spp. + fertilizante organomineral) foi utilizada metade da dose de *Trichoderma* spp. (0,5 mL do produto a base de *Trichoderma* spp. L⁻¹ de água) utilizada no T3 (*Trichoderma* spp.) (1 mL do produto a base de *Trichoderma* spp. L⁻¹ de água).

A segunda avaliação mostrou que a mistura dos produtos (T7) foi mais eficiente do que o uso somente do produto a base de *Trichoderma* spp. (T3), aumentando o controle do patógeno, demonstrando que o uso do fertilizante pode colaborar com o micro-organismo a longo prazo.

Alves (2014) avaliou o controle da MMA em tangerinas Dancy por meio de aplicação de biofertilizantes, estes diminuíram o crescimento lesional da MMA em frutos destacados, tendo o biofertilizante efeito tóxico na germinação dos esporos de *Alternaria alternata*.

Alves et al., (2013) avaliaram o efeito de biofertilizantes no controle da doença em folhas de Tangerina Dancy, e constataram que houve diminuição de crescimento das lesões em até 14% sob aplicação de biofertilizante. Os resultados encontrados pelos pesquisadores corroboram com os dados apresentados no uso do fertilizante organomineral 645. Sendo a utilização de biofertilizante aplicado via foliar uma alternativa potencial para o controle da MMA, podendo substituir e/ou diminuir a utilização de fungicidas químicos em tangerineiras Ponkan.

6. CONCLUSÕES

- *Trichoderma* spp. e *Bacillus subtilis* apresentam ação antagônica *in vitro* sobre o fitopatógeno *Alternaria alternata*;
- O isolado de *Alternaria alternata* demonstrou ser patogênico em folhas jovens de tangerineira “ponkan”;
- Adição de fertilizante aos micro-organismos nos testes *in vitro* favoreceram o crescimento de *Trichoderma* spp. e *Bacillus subtilis*;
- *Trichoderma* spp. e *Bacillus subtilis* são eficientes no controle de *Alternaria alternata* em tangerineiras Ponkan;
- *Trichoderma* spp. tem efeito superior em comparação com *Bacillus subtilis* no controle de *Alternaria alternata* em folhas de tangerineira Ponkan.
- O uso do fertilizante organomineral diminuiu a incidência de MMA em folhas jovens de tangerina Ponkan e aumentou o potencial de controle dos produtos biológicos;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMANÇA, M. A. K. **Aspectos da interação arroz - *Trichoderma* spp. em solos alagados.** 2008. 69 f. Tese (Doutorado) - Curso de Agronomia, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008. Disponível em:

<<http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/28047/000767111.pdf?sequence=1>>

Acesso em: 17 jan. 2014.

ALVES, S. A. F. **Manejo da mancha marrom de Alternária (*Alternaria alternata* f. sp. *citri* em tangerina com biofertilizante.** 2014. 27f. TCC (Graduação) - Curso de Bacharelado em Agroecologia, Centro de Ciências Agrárias e Ambientais, Universidade Estadual da Paraíba, Lagoa Seca, 2014.

ALVES, S. A. F.; BEZERRA, M. C.; SILVA FILHO, A.M.; MOURA, A. Q.; FERNANDES, J. D.; MONTEIRO, A. F. F.; CORREA, E. B. Efeito de biofertilizante no controle da mancha de alternaria em folhas de tangerina Dancy (*Citrus tangerina*). In: **VI Congresso Brasileiro de Defensivos Naturais, 2013**, João Pessoa. VI Congresso Brasileiro de Defensivos Naturais: da prospecção a utilização, 2013. P.156.

ANGONESE, M. T.; DELLA JÚNIOR, G. L. H. P.; PANSERA, M. R.; PAGNO, R. S.; MEZZOMO, F.; ZORZI, E.; PEREIRA, C. O. F.; Ribeiro, R. T. da S. Efeito Fungistático de *Bacillus* spp. sobre Fungos Fitopatogênicos. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Cruz Alta, v. 4, n. 2, nov. 2009. Disponível em: <<http://www.aba-agroecologia.org.br/revistas/index.php/rbagroecologia/article/view/8256>>. Acesso em: 18 ago. 2014.

ARGUELLES- ARIAS, A.; ONGENA, M.; HALIMI, B.; LARA, Y.; BRANS, A.; JORIS, B.; FICKERS, P. *Bacillus amyloliquefaciens* GA1 as a source of potent antibiotics and other secondary metabolites for biocontrol of plant pathogens. **Microbial Cell Factories**, 8: 1-12, 2009.

BELL D.K.; WELLS H.D.; MARKHAM C.R. In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology*, Saint Paul, v.72, n. 4, p.379- 382, 1982.

BENELLI, S. **Controle de mofo cinzento causado por *Botrytis cinerea* em *Impatiens walleriana* com o uso de *Trichoderma* spp.** 2014. 38 f. TCC (Graduação) - Curso de Agronomia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2014.

BENÍTEZ, T.; RINCÓN, A. M.; LIMÓN, M. C.; CODÓN, A. C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**, Sevilla, v. 7, n. 1, p.249-260, set. 2004. Disponível em: <http://scielo.isciii.es/scielo.php?pid=S113967092004000400003&script=sci_arttext&tlng=en>. Acesso em: 03 set. 2013.

BENITES, V. de M.; POLODORO, J. C.; MENEZES C. C.; BETTA M. Aplicação foliar de fertilizante orgânico mineral e soluções de ácido húmico em soja sob plantio direto. **Embrapa Solos: Circular técnica**, Rio de Janeiro, n. 35, p.1-6, dez. 2006. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/856031>>. Acesso em: 20 jan. 2014.

BETTIOL, W.; GHINI, R. Controle Biológico. *In* **Manual de Fitopatologia, Princípios e conceitos** (BERGAMIN FILHO, A; KIMATI, H; AMORIM, L.). 3ª ed. São Paulo, Agronômica Ceres, v. 1, p. 717-728, 1995.

BETTIOL, W.; GHINI, R.; MARIANO, R. R. L.; MICHEREFF, S. J.; MATTOS, L. P. V.; ALVARADO, I. C. M.; PINTO, Z. V. Supressividade a fitopatógenos habitantes do solo. *In: Biocontrole de doenças de plantas: Uso e perspectivas.* (BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B.) 1ª ed. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. Capítulo 12. p. 187-208.

BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B.; PINTO, Z. V.; NASCIMENTO, R.; AGOSTINI, E. R. dos S.; LUCON, C. M. M.; HARAKAVA, R.; HADDAD, P. E. Avaliação da qualidade de produtos à base de *Trichoderma* *In* **IV CURSO TEÓRICO E PRÁTICO. Embrapa Meio Ambiente**, Jaguariúna, set. 2012.

CHAGAS, E. A.; CAZETTA, J. O.; LEMOS, E. G. M.; PASQUAL, M.; GOES, A. de; RAMOS, J. D.; PIO, R.; BARBOSA, W.; MENDONÇA, V.; AMBROSIO, L. A. Identificação de híbridos de citros resistentes à mancha-marrom-de-alternaria por meio de fAFLP e testes de patogenicidade. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 7, p.975-983, jul. 2007. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/pab/v42n7/09.pdf>>. Acesso em: 04 maio 2016.

CHUNG, K. R. Stress Response and Pathogenicity of the Necrotrophic Fungal Pathogen *Alternaria alternata*. **Hindawi Publishing Corporation: Scientifica**, Florida, v. 2012, p.1-17, out. 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.6064/2012/635431>>. Acesso em: 20 ago. 2016.

CLASEN, H. A. C.; LESSA, R. T.; KAEMMERER, M.; KOETZ, P. R. Ácidos húmicos e fúlvicos do carvão da jazida de Candiota. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 4, n. 1, p.35-40, jan.-abr. 1998. Disponível em: <<http://www2.ufpel.edu.br/faem/agrociencia/v4n1/artigo07.pdf>>. Acesso em: 20 jan. 2014.

D'AGOSTINO, F.; MORANDI, M. A. B. Análise da viabilidade comercial de produtos à base de *Bacillus Subtilis* e *Bacillus Pumilus* para o controle de fitopatógenos no Brasil. In: **Biocontrole de doenças de plantas: Uso e perspectivas**. (BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B.) 1ª ed. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. Capítulo 20. p. 299-316.

COLTURATO, A.B.; PAULOSI, T.; VENÂNCIO, W.S.; FURTADO, E.L. Eficiência e custo do controle químico da mancha de alternaria em tangor murcote. **Summa Phytopathol**, Botucatu, v. 35, n. 3, p.210-215, 2009. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/sp/v35n3/a08v35n3.pdf>>. Acesso em: 10 jan. 2014.

COTTAS, M. P. **Mancha Marrom de Alternaria, uma opção de controle**. 2008. Agrofít. Disponível em: <http://www.agrofit.com.br/portal/index.php?view=article&catid=54:citros&id=105:mancha-marrom-de-alternaria-uma-opcao-de-controle&option=com_content&Itemid=18>. Acesso em: 13 jan. 2014.

CUNHA, T. J. F.; MADARI, B. E.; BENITES, V. de M.; CANELLAS, L. P.; NOVOTNY, E. H.; MOUTTA, R. de O.; TROMPOWSKY, P. M.; SANTOS, G. de A. Fracionamento químico da matéria orgânica e características de ácidos húmicos de solos com horizonte a antrópico da Amazônia (Terra Preta). **Acta Amazonica**, Manaus, v. 37,

n. 1, p.91-98, jan. 2007. Disponível em: <<https://acta.inpa.gov.br/fasciculos/37-1/PDF/v37n1a10.pdf>>. Acesso em: 20 jan. 2014.

DIAS, B. de O.; SILVA, C. A.; SOARES, E. M. B.; BETTIOL, W. Estoque de carbono e quantificação de substâncias húmicas em latossolo submetido a aplicação contínua de lodo de esgoto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, 31, p.701-711, 2007. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbcs/v31n4/a11v31n4.pdf>>. Acesso em: 20 jan. 2014.

ESPOSITO, E.; SILVA, M. Systematics and environmental application of the genus *Trichoderma*. **Critic Rev Microbiol**, v. 24, p. 89-98, 1998.

FARIA, A.Y.K.; NETO, D.C.; ALBURQUERQUE, M.C. de F. Atividade Antagônica *In vitro* de *Trichoderma Harzianum* a patógenos de sementes de algodoeiro. **Revista Tropical**, v.6, n. 1, p 59-68, 2002.

FERNANDES, R. H.; VIEIRA, B. S.; FUGA, C. A. G.; LOPES, E. A. *Pochonia chlamydosporia* e *Bacillus subtilis* no controle de *Meloidogyne incognita* E M. *Javanica* em mudas de tomateiro. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 30, n. 1, p.194-200, jan.- fev. 2014. Disponível em: <www.seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/article/viewFile/.../13700>. Acesso em: 20 jan. 2014.

GARCIA, G. R. **Caracterização microbiológica e avaliação de uma cepa de *Bacillus subtilis* no desempenho de bezerros da raça holandesa**. 2008. 68 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Jaboticabal,

2008. Disponível em: <<http://www.fcav.unesp.br/download/pgtrabs/micro/d/2387.pdf>>.

Acesso em: 17 jan. 2014.

GEREMIA, B. **Agrotóxicos: O emprego indiscriminado de produtos químicos no ambiente de trabalho rural e a responsabilização por danos à saúde.** 2011. 147 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Direito, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2011.

GRIGOLETTI JÚNIOR, A.; SANTOS, Á. F. dos; AUER, C. G. Perspectivas do uso do controle biológico contra doenças florestais. **Revista Floresta**, Curitiba, v. 30, n. 12, 2000. Disponível em: <<http://ojs.c3sl.ufpr.br/ojs/index.php/floresta/article/view/2362>>. Acesso em: 22 jan. 2014.

HARMAN, G. E. Myths and dogmas of biocontrol: Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. **Plant Disease**, New York, v. 84, n. 4, p.377-393, abr. 2000. Disponível em: <http://www.hort.cornell.edu/departament/faculty/harman/pubs/Myths_Dogmas_pub.pdf>. Acesso em: 25 ago. 2013.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção Agrícola Mundial.** 2015. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam/2015/default.shtm>>. Acesso em: 15 set. 2016.

KUPPER, K. C.; CERVANTES, A. L. L.; KLEIN, M. N.; SILVA, A. C. da. Avaliação de microrganismos antagônicos, *Saccharomyces cerevisiae* e *Bacillus subtilis* para o controle de *Penicillium digitatum*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.

35, n. 2, p.425-436, jun. 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452013000200011>>. Acesso em: 30 maio 2016.

KUPPER, K. C; FERNANDES, N. G.; GOES, A. de. Controle biológico de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 3, mai- jun. 2003. Bimestral. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/fb/v28n3/a05v28n3.pdf>>. Acesso em: 19 jan. 2014.

LANNA FILHO, R.; FERRO, H. M; PINHO, R. S. C. de. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. **Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas**, Chapadinha, v. 4, n. 2, p.12, 2010. Trimestral. Disponível em: <<http://www.periodicoseletronicos.ufma.br/index.php/ccaatropica/article/view/145/96>>. Acesso em: 20 jan. 2014.

LEELASUPHAKUL, W. et al. Growth inhibitory properties of *Bacillus subtilis* strains and their metabolites against the green mold pathogen (*Penicillium digitatum* Sacc.) of citrus fruit. Postharvest. **Biology and Technology**, v.48, p.113-121, 2008.

LOPES, R. B. A indústria no controle biológico: produção e comercialização de microrganismos no Brasil. In: **Biocontrole de doenças de plantas: Uso e perspectivas**. (BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B.) 1ª ed. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. Capítulo 2. p. 15-28.

LOPES, E. B.; ALBUQUERQUE, I. C. de; ARAÚJO, E. Mancha-marrom-de-alternaria: uma grave doença nos pomares de tangerina da Paraíba. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, João Pessoa, v. 3, n. 3, p.23-27, set. 2009. Disponível em:

<http://www.emepa.org.br/revista/volumes/tca_v3_n3_set/tca05_mancha_marrom.pdf>.

Acesso em: 13 jan. 2014.

LOPES, J.M.S.; DÉO, T.F.G.; ANDRADE, B.J.M.; GIROTO, M.; FELIPE, A.L.S.; JUNIOR, C.E.I.; BUENO, C.E.M.S.; SILVA, T.F.; LIMA, F.C.C. Importância econômica do citros no Brasil. **Revista Científica Eletrônica de Agronomia** – issn: **1677-0293**, Garça, Ano X, n. 20, dez. 2011. Semestral. Disponível em: <http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/RtmuqxyLi4i5jUH_2013-5-17-17-13-31.pdf>. Acesso em: 11 jan. 2014.

LUCON, C. M. M. Trichoderma no controle de doenças de plantas causadas por patógenos de solo. **Instituto Biológico: Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Vegetal**, São Paulo, n. 77, ago. 2008. Disponível em: <http://www.biológico.sp.gov.br/artigos_ok.php?id_artigo=77>. Acesso em: 16 jan. 2014.

MACEDO, V. M. **Isolados de *Trichoderma* sp. como agentes promotores de crescimento e indutores de resistência em citros**. 2014. 112 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Agroecologia e Desenvolvimento Rural, Universidade Federal de São Carlos, Araras, 2014. Disponível em: <<https://repositorio.ufscar.br/handle/ufscar/174>>. Acesso em: 04 mai. 2016.

MACHADO, D. F. M.; PARZIANELLO, F. R.; SILVA, A. C. F. da; ANTONIOLLI, Z. I. *Trichoderma* no Brasil: o fungo e o bioagente. **Revista de Ciências Agrárias**, Santa Maria, v. 35, n. 1, p.274-288, out. 2012. Disponível em: <<http://www.scielo.gpeari.mctes.pt/pdf/rca/v35n1/v35n1a26.pdf>>. Acesso em: 17 jan. 2014.

MACIEL, C. G.; WALKER, C.; MUNIZ, M. F. B.; ARAÚJO, M. M. Antagonismo de *Trichoderma* spp. E *Bacillus subtilis* (UFV3918) a *Fusarium sambucinum* em *Pinus elliottii* ENGELM. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 38, n. 3, p.505-512, mar. 2014. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-67622014000300013&script=sci_abstract&tlng=pt>. Acesso em: 30 maio 2016.

MANJULA, K.; PODILE, A.R.. Increase in seedling emergence and dry weight of pigeon pea in the field with chitin-supplemented formulations of *Bacillus subtilis* AF 1. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.21, p.1057–1062, 2005.

MARTELLI, I. B. **Manejo da mancha marrom de alternária em citros: poda de limpeza e correlação com a lagarta minadora**. 2011. 42 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Agricultura Tropical e Subtropical, Instituto Agronômico de Campinas, Campinas, 2011. Disponível em: <http://www.iac.sp.gov.br/areadoinstitutoposgraduacao/dissertacoes/pb1215309_IVAN_BORTOLATO_MARTELLI.pdf>. Acesso em: 2 jun. 2015.

NEVES, E. M.; DAYOUB, M.; DRAGONE, D. S.; NEVES, M. F. Citricultura brasileira: efeitos econômico-financeiros, 1996 – 2000. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 2, p.432-436, ago. 2001. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbf/v23n2/7998.pdf>>. Acesso em: 6 jan. 2014.

NEVES, M. F.; TROMBIN, V. G.; MILAN, P.; LOPES, F. F.; CRESSONI, F.; KALAKI, R. Exportações citrícolas. In: NEVES, M. F. **O Retrato da citricultura brasileira**. FEA /USP Ribeirão Preto, 2010. p. 17-20. Elaboração: Markestrat - Centro de Pesquisa e Projetos em Marketing e Estratégia.

NEVES, M. F.; TROMBIN, V. G.; MILAN, P.; LOPES, F. F.; CRESSONI, F.; KALAKI, R. Barreiras fitossanitárias e exigências técnicas. In: NEVES, M. F. **O Retrato da citricultura brasileira**. FEA /USP Ribeirão Preto, 2010. p. 24-26.

Elaboração: Markestrat - Centro de Pesquisa e Projetos em Marketing e Estratégia.

NOGUEIRA, D. R. S.; ALBUQUERQUE, L. B.; ARAUJO, J. A. de M.; VALE, E. V. G.; SALES JUNIOR, R. Eficiência de *Bacillus subtilis* e *B. pumilus* no controle de *Podosphaera xanthii* em meloeiro. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável: GRUPO VERDE DE AGRICULTURA ALTERNATIVA**, Mossoró, v. 6, n. 3, p.125-130, jul. 2011. Disponível em: <<http://www.gvaa.com.br/revista/index.php/RVADS/article/view/764/681>>. Acesso em: 30 maio 2016.

OLIVEIRA, E. A. B. de. **Avaliação de método alternativo para extração e fracionamento de substâncias húmicas em fertilizantes orgânicos**. 2011. 53 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Agricultura Tropical e Subtropical, Instituto Agronômico de Campinas, Campinas, 2011. Disponível em: <http://www.iac.sp.gov.br/areadoinstituto/posgraduacao/dissertacoes/pb1213909-ELIEZER_AUGUSTO_BAETA_DE_OLIVEIRA.pdf>. Acesso em: 27 nov. 2015.

ONGENA, M.; JOURDAN, E.; ADAM, A.; PAQUOT, M.; BRANS, A.; JORIS, B.; ARPIGNY, J.- L.; THONART, P. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. **Environmental Microbiology**, v.9, p.1084-1090, 2007.

PEEVER, T.L.; CANILHOS, Y.; OLSEN, L.; IBÁÑEZ, A.; LIU, Y.C. & TIMMER, L.W. Population genetic structure and host specificity of *Alternaria spp.* causing brown

spot of Minneola tangelo and rough lemon in Florida. **Phytopathology**, v.89, p.851-860, 1999.

PERES, N.A.R.; AGOSTINI, J.P.; TIMMER, L.W. Outbreaks of *Aternaria* brown spot of citrus in Brazil and Argentina. **Plant Disease**, St Paul ,v.87, p.750, 2003.

PERSELLO-CARTIEAUX, F.; NUSSAUME L.; ROBAGLIA, C. Tales from the underground: Molecular plant-rhizobacteria interactions. **Plant Cell and Environment**, v.26, p.186–199, 2003.

POMELLA, A. W. V. RIBEIRO, R. T. da S. Controle biológico com *Trichoderma* em grandes culturas – uma visão empresarial. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. **Biocontrole de doenças de plantas: Uso e perspectivas**. 1ª ed. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. Capítulo 1. p. 7-14.

RIBEIRO, T. da S. **O fungo *Trichoderma spp.* no controle de fitopatógenos: dificuldades e perspectivas**. 2009. 35 f. Monografia (Especialização) - Curso de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

RIDELL, R. W. Permanent stained mycological preparations obtained by slid culture. **Mycologia**, v.42, p. 265-270, 1950.

RYU, C.M.; FARAG, M.A.; HU, C.-H.; REDDY, M.S.; KLOPPER, J.W.; PARÉ, P.W. Bacterial Volatiles Induce Systemic Resistance in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v.134, p.1017–1026, 2004.

SANTOS FILHO, H. P.; LARANJEIRA, F. F.; OLIVEIRA, A. A. R. Mancha Marrom de Alternaria em tangerinas. **Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical: Citros**

em Foco, Cruz das Almas, n. 33, p.1-2, dez. 2009. 1ª edição: versão online. Disponível em: <http://www.cnpmf.embrapa.br/publicacoes/produto_em_foco/citros_33.pdf>. Acesso em: 10 jan. 2014.

SIKORA, R.A. & HOFFMANN-HERGARTEN, S. Importance of plant health-promoting rhizobacteria for the control of soil-borne fungal disease and plant parasitic nematodes. **Arabian Journal of Plant Protection**, v. 10(1), p. 53-48, 1992.

SILVA, J. B. T. da; MELLO, S. C. M. de. Utilização de *Trichoderma* no Controle de Fungos Fitopatogênicos. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, Brasília, v. 241, p.1-17, dez. 2007. Disponível em: <<http://www.cenargen.embrapa.br/publica/trabalhos/doc241.pdf>>. Acesso em: 17 jan. 2014.

SILVA, P.R.Q. da. **Transformação de *Trichoderma harzianum* com os genes da proteína fluorescente verde e de resistência ao fungicida benomil**. Tese de doutorado, Brasília, UnB, 130p., 2000.

SILVA FILHO, A. V. da; SILVA, M. I. V. da. Importância das Substâncias Húmicas para a Agricultura. **II Simpósio nacional sobre as culturas do Inhame e do Taro**, João Pessoa, v. 2, nov. 2002. Disponível em: <<http://www.emepa.org.br/anais/volume2/av209.pdf>>. Acesso em: 20 jan. 2014.

SILVA, V. N. da; GUZZO, S. D.; LUCON, C. M. M.; HARAKAVA, R. Promoção de crescimento e indução de resistência à antracnose por *Trichoderma* spp. em pepineiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 46, n. 12, p.1609-1618, dez.

2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2011001200005>>. Acesso em: 30 maio 2016.

SOUZA, C. R. de; GUIMARÃES, E.; MANGRICH A. S.; MERCÊ A. L. R. Estudo da complexação de ácido fúlvico extraído de solos de plantio direto com íons Ni(II) e Pb(II) por titulação potenciométrica. **29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química: Sociedade Brasileira de Química (SBQ)**, Águas de Lindóia, maio 2006. Disponível em: <<https://sec.s bq.org.br/cd29ra/resumos/T0493-1.pdf>>. Acesso em: 20 jan. 2014.

SPÓSITO, M.B.; JÚNIOR, J.B.; BASSANEZI, R.B.; YAMAMOTO, P.T. Risco marrom. **Revista Cultivar Hortaliças e Frutas**, abril/maio, n.19, 2003. Disponível em: <<http://www.grupocultivar.com.br/artigos/risco-marrom>>. Acesso em: 22 jan. 2015.

STEHLICKOVA, J.; SVAB, M.; WIMMEROVA, L.; KOZLER, J. Intensification of phenol biodegradation by humic substances. **Int. Biodet. Biodegr.**, v. 63, p. 923-927, 2009.

TAVARES, R. L. M.; COSTA, C. A. C. Avaliação da densidade e pureza através de método gravimétrico do ácido fúlvico extraído de serapilheira coletada em área de cultivo de açaí *Euterpe oleracea*. **57ª Reunião Anual da Sbpq**, Fortaleza, jul. 2005. Disponível em: <http://www.sbpqnet.org.br/livro/57ra/programas/senior/RESUMOS/resumo_3288.html>. Acesso em: 20 jan. 2014.

TIMMER, L.W.; SOLEL, Z.; OROZCO SANTOS, M. Alternaria brown spot of mandarin. In: TIMMER, L.W.; GANSEY, S.M.; GRAHAM, J.H. (Ed.). **Compendium of citrus diseases**. 2nd ed. Minnesota: APS Press, 2000. p.19-20.

TRIVEDI, P.; PANDEY, A. Plant growth promotion abilities and formulation of *Bacillus megaterium* strain B 388 isolated from a temperate Himalayan location. **Ind J Microbiol**, 48:342–347, 2008.

TSAVKELOVA, E.A.; KLIMOVA, S. Y.; CHERDYNTSEVA, T. A.; NETRUSOV, A. I. Microbial Producers of Plant Growth Stimulators and Their Practical Use: A Review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v.42, p.117–126, 2006.

VEIGA, F.A.; RÖSLER, J.P.; WEI, L.Y.; AZEVEDO, G.R.; CAMILO, S.B. ATIVIDADE DE *Bacillus* spp. NO CONTROLE DE *Alternaria alternata*. In: 1º SIMPÓSIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2013, São Paulo. **Anais**. São Paulo: Faculdade Cantareira, 2013. Disponível em: <http://www.cantareira.br/sicfic2013/10_30.pdf>. Acesso em: 04 maio 2016.

ZUCCHI, F. *Trichoderma* spp em áreas cultivadas do cerrado. 2010. **JV Biotecnologia**. Disponível em: <<http://www.agronomianet.com.br/Trichoderma.pdf>>. Acesso em: 19 jan. 2014.