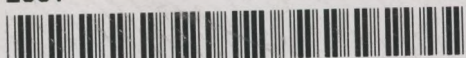


Metodos alternativos de ...
2007 TS-PP-2008.00531



CNPMA-7543-1

EMBRAPA

AINFO/CNPMA

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

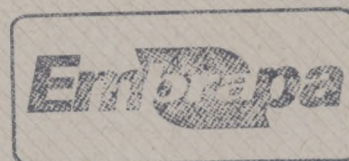
MÉTODOS ALTERNATIVOS DE CONTROLE DE *Guignardia citricarpa*
E *Penicillium digitatum* NA CULTURA ORGÂNICA E CONVENCIONAL
DE CITROS.

EDUARDO ROBERTO DE ALMEIDA BERNARDO

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da Unesp - Câmpus de Botucatu,
para obtenção do título de Doutor em
Agronomia (Proteção de Plantas).

BOTUCATU - SP

Novembro - 2007



0531
2007
ex. 1
TS-PP-2008.00531

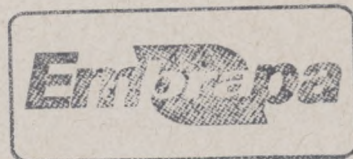
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**MÉTODOS ALTERNATIVOS DE CONTROLE DE *Guignardia citricarpa*
E *Penicillium digitatum* NA CULTURA ORGÂNICA E CONVENCIONAL
DE CITROS.**

EDUARDO ROBERTO DE ALMEIDA BERNARDO

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da Unesp - Câmpus de Botucatu,
para obtenção do título de Doutor em
Agronomia (Proteção de Plantas).

BOTUCATU - SP
Novembro - 2007



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**MÉTODOS ALTERNATIVOS DE CONTROLE DE *Guignardia citricarpa*
E *Penicillium digitatum* NA CULTURA ORGÂNICA E CONVENCIONAL
DE CITROS.**

EDUARDO ROBERTO DE ALMEIDA BERNARDO

Orientador: Prof. Dr. Wagner Bettiol

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da Unesp - Câmpus de Botucatu,
para obtenção do título de Doutor em
Agronomia (Proteção de Plantas).

BOTUCATU - SP

Novembro – 2007

OFEREÇO

À Camila, amor de minha vida e para toda uma vida,
pelo companheirismo, amizade, confiança,
dedicação, otimismo e felicidade a mim dados.

DEDICO

Aos meus pais Luiz Adilson e Carmen,
pelo incentivo, confiança e apoio depositados.

HOMENAGEM

Ao meu orientador e amigo Prof. Dr Wagner Bettiol, pelo empenho, dedicação na condução e realização deste trabalho, convivência, amizade e ensinamentos.

Ao meu grande amigo Dr. Daniel Cassetari Neto, da Universidade Federal do Mato Grosso, pelo estímulo, honestidade, exemplo profissional e os conhecimentos dispensados durante toda minha vida acadêmica.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado coragem para superar todas as barreiras.

À CAPES, pela concessão da Bolsa de Estudo para a realização deste trabalho.

À Embrapa Meio Ambiente, por toda a logística oferecida para a realização e condução dos trabalhos.

Aos funcionários do Campo Experimental da Embrapa Meio Ambiente: Brasilino, Waldemore, Antonio, Laércio, Vicente, Abrahão e Henrique, pelo indispensável auxílio na realização dos trabalhos.

Aos Professores do Departamento de Proteção de Plantas, pela contribuição de cada um em minha formação profissional.

Ao meu irmão, amigo e parceiro para todas as horas e nas horas mais difíceis Tiago Zucchi, pela amizade, companheirismo e paciência.

Ao meu irmão Fábio Rogério de Almeida Bernardo, Andréa e meus sobrinhos queridos Annelise e Pedro.

À segunda família em Pouso Alegre-MG, composta por Miriam, Valdir, João Vitor, Diego, Rafael, Renata e D. Radda, pela amizade e acolhida recebida.

Ainda em Pouso Alegre, Macário, Cândida, Karina e Elias, pela amizade e consideração.

À Dirce, Ademar (Demá), Ricardo e Michele, pela amizade e carinho a mim dedicados.

Aos amigos da Embrapa Meio Ambiente, em especial a Alexandre Sereda, Élide, Luciana(s), Sarah, Zayame, Liliana e Manuel.

Aos funcionários do Laboratório de Microbiologia da Embrapa Meio Ambiente João Luiz, Márcia, Elke e Rosely, pelo carinho, dedicação, presteza e profissionalismo com que atuam.

Aos pesquisadores da Embrapa Meio Ambiente, em especial aos Drs. Wagner Bettiol, Itamar Soares de Melo, Raquel Ghini e Célia M. M. Souza.

Ao Sr. Paulo D'Andrea, pela concessão do Microgeo® e das áreas de sua propriedade para a condução dos estudos.

À seção de Pós-Graduação do Câmpus da FCA, pela presteza quando solicitada.

Ao Conselho do Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Proteção de Plantas da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP/FCA, pela oportunidade de realização dos trabalhos.

A todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho.

AGRADEÇO.

SUMÁRIO

página

1	RESUMO.....	
2	SUMMARY.....	
3	INTRODUÇÃO.....	
4	REVISÃO DE LITERATURA.....	
	4.1 – <i>Guignardia citricarpa</i>	
	4.2 – Sintomatologia da pinta-preta.....	
	4.3 – Medidas de controle da pinta-preta.....	
	4.4 – Controle biológico.....	
	4.5 – Biofertilizantes.....	
	CAPITULO I – CONTROLE DA PINTA-PRETA DOS FRUTOS CÍTRICOS EM CULTIVO ORGÂNICO COM AGENTES DE BIOCONTROLE E PRODUTOS ALTERNATIVOS.....	
	Resumo.....	
	Abstract.....	
	Referências	
	CAPÍTULO II – CONTROLE DA PINTA-PRETA DOS FRUTOS CÍTRICOS EM CULTIVO CONVENCIONAL COM BIOFERTILIZANTES.....	
	Resumo.....	
	Abstract.....	
	Referências	
	CAPÍTULO III – CONTROLE BIOLÓGICO DE <i>Guignardia citricarpa</i> e <i>Penicillium digitatum</i> EM PÓS-COLHEITA DE LARANJA 'PERA' ORGÂNICA.....	
	Resumo.....	
	Abstract.....	

Referências

5 CONCLUSÕES.....

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....

METODOS ALTERNATIVOS DE CONTROLE DE *Guignardia citricarpa* E *Penicillium digitatum* NA CULTURA ORGÂNICA E CONVENCIONAL DE CITROS. Botucatu, 2007. 83p. Tese (Doutorado em Agronomia/Proteção de Plantas) –

Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.

Autor: EDUARDO ROBERTO DE ALMEIDA BERNARDO

Orientador: WAGNER BETTIOL

RESUMO

O Brasil é o maior produtor de laranja e o maior exportador mundial de suco concentrado. A pinta preta dos citros, causada por *Guignardia citricarpa*, é uma doença de grande importância econômica, principalmente para o Estado de São Paulo. O interesse no controle biológico de fitopatógenos, como alternativa de controle e como forma de reduzir os problemas ocasionados pelo uso intensivo de fungicidas, tem levado ao desenvolvimento de técnicas alternativas para uma agricultura mais sustentável. O trabalho teve por objetivo avaliar o efeito de agentes de controle biológico (*Bacillus subtilis* e *Trichoderma harzianum*) e produtos alternativos (biofertilizantes e leite) no controle da pinta preta dos frutos cítricos em cultivos convencional e orgânico. Além disso, foi avaliado o efeito de *Bacillus subtilis*, *Paenibacillus lentimorbus* e *Streptomyces* sp. no controle de *G. citricarpa* e *Penicillium digitatum* em pós-colheita. Os experimentos em campo foram realizados em pomar de laranja 'Valência' e 'Pêra', localizadas nos municípios de Conchal e Santa Eudóxia, SP, respectivamente. Em cultivo convencional de 'Valência' foram avaliados dois biofertilizantes (Microgeo® e Bio2), nas safras 2003/2004 e 2004/2005, com 15 repetições por tratamento, sendo uma planta por repetição. As árvores foram pulverizadas em intervalos de 28 dias, sendo o início em 08/12/03, para a safra 2003/2004 e 08/11/2004, para a safra 2004/2005. Na safra 2003/2004 as concentrações utilizadas do biofertilizante Microgeo® foram 0; 10; 20; 30 e 40%. Na safra 2004/2005 foram repetidos os mesmos tratamentos da

safras anteriores e incluído tratamento com o biofertilizante Bio2 nas concentrações de 0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10%. Para as avaliações foram utilizadas uma escala de notas de 1=0,5% a 6=49% da área do fruto atacada. Os biofertilizantes apresentaram comportamento irregular, não reduzindo a severidade da doença em nenhuma das safras em estudo. Em cultivo orgânico num pomar de laranja 'Pera' os ensaios foram conduzidos nas safras 2004/2005 e 2005/2006, com os seguintes tratamentos: *B. subtilis* (10^7 e 10^8 ufc/mL); Milhocina (0,5%) + Melaço (0,5%); *T. harzianum* (10^6 conídios/mL); leite cru (5%) e Microgeo®. O delineamento experimental adotado e as avaliações foram as mesmas utilizadas na área convencional. Nas duas safras o leite e o *B. subtilis* reduziram a severidade e apresentaram um número maior de frutos pertencentes às notas 1 e um número menor pertencentes às notas de 3 a 6. *T. harzianum* não foi eficiente no controle da doença. Os testes em pós-colheita foram realizados com frutos de laranja 'Pera' orgânica, com inoculação artificial de *P. digitatum* e natural de *G. citricarpa*. Todos os tratamentos reduziram a severidade e a incidência da podridão dos frutos causada por *P. digitatum*, sendo que *B. subtilis* e *P. lentimorburs* não diferiram do fungicida thiabendazole (1500µg/mL), quando inoculados de forma conjunta e curativa, exibindo potencial para o seu controle em pós-colheita. Para *G. citricarpa* os agentes de biocontrole não foram eficientes na redução da doença.

Palavras chave: Mancha preta dos frutos cítricos, controle biológico, *Bacillus subtilis*, *Trichoderma harzianum*, *Paenibacillus lentimorburs*, *Streptomyces*, pós-colheita.

BIOCOMPATIBLE PRODUCTS FOR MANAGING CITRUS BLACK SPOT (*Guignardia citricarpa*) AND BLUE MOLD (*Penicillium digitatum*) IN CONVENTIONAL AND ORGANIC SYSTEMS.

Tese (Doutorado em Agronomia/Proteção de Plantas) - Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: EDUARDO ROBERTO DE ALMEIDA BERNARDO

Adviser: WAGNER BETTIOL

SUMMARY

Brazil is the worldwide biggest producer and exporter of orange and orange juice. The citrus black spot (CBS), caused by *Guignardia citricarpa*, is a disease of great economic importance, mainly for the São Paulo State. The interest in biological control of plant pathogens, as mitigation of the problems caused by intensive use of fungicides, has led to development of alternative techniques for a more sustainable agriculture. The objective of this work was to evaluate the effects of biocontrol agents (*Bacillus subtilis* and *Trichoderma* sp.) and other biocompatible products (cow milk and biofertilizers) for managing CBS in organic and conventional systems. Besides, the effect of *B. subtilis*, *Paenibacillus lentimorbus* and *Streptomyces* sp. for control of *G. citricarpa* and *Penicillium digitatum*, in post-harvest was also evaluated. The field experiments were carried through in trees of 'Valencia' and 'Pera', located in Conchal and Santa Eudóxia, SP, respectively. In 'Valencia' conventional system were evaluated two biofertilizers (Microgeo® and Bio2). The experiments were conducted at harvests 2003/2004 and 2004/2005. The trees were sprayed in 28 days intervals, and the first was in 08 December 2003 in 2003/2004 harvest, and 08 November 2004 in 2004/2005 harvest.

In the harvest of 2003/2004 the biofertilizer Microgeo® concentrations used were 0, 10, 20, 30 and 40%. In the harvest 2004/2005, the same treatments of the last harvest were repeated and treatments with biofertilizer Bio2 (0; 2.5; 5.0; 7.5 and 10% concentrations) were included. Each treatment was composed by 15 repetitions, being each plant considered a repetition. The severity of the disease on 50 fruits at harvest stage collected randomly from each replication plant were evaluated by means of a six-category scale, which 1=0.5%, and 6=49% of fruit area with lesions. Biofertilizers presented irregular behavior and a reducing of severity was not observed for any of the harvests in study. In 'Pera' organic cropping systems the assays were carried through 2004/2005 and 2005/2006 harvests. In these experiments, the following treatments were done: *B. subtilis* (10^7 and 10^8 CFU ml⁻¹); autoclaved Milhocina (0.5%) + Molasses (0.5%); *Trichoderma* sp. (10^6 conidia ml⁻¹); cow milk (5%) and Microgeo®. The experimental design adopted and the evaluations were the same ones used in the conventional area. In 2004/2005 and 2005/2006 harvests, milk and *B. subtilis* reduced the severity and increased the number of fruits at notes 1 and reduced the number to notes 3 to 6. *T. harzianum* was not efficient in the control of the disease. All treatments reduced the severity and incidence of *P. digitatum* in post-harvest, and *B. subtilis* and *P. lentimorbus* showed a similar result to the thiabendazole when inoculated at same time and 24h after, demonstrating the potential of these microorganisms for control of *P. digitatum* in post harvest. *B. subtilis* (1×10^8 cfu/mL), *P. lentimorbus* (1×10^8 cfu/mL) and *Streptomyces* sp. (1×10^8 cfu/mL) were not efficient to reduce the incidence of *G. citricarpa* in post-harvest.

Keywords: Citrus black spot, biological control, *Bacillus subtilis*, *Trichoderma harzianum*, *Paenibacillus lentimorbus*, *Streptomyces* sp., post-harvest.

INTRODUÇÃO GERAL

A citricultura é de extrema importância para o Brasil e grande fonte de divisas. Desde a década de 90, é responsável por 80% do comércio internacional de suco concentrado de laranja (AGRIANUAL, 2002). Os Estados Unidos aparecem como segundo maior produtor, seguido pelo México, China e Espanha. Desses, Estados Unidos e Espanha respondem por 18 e 38%, respectivamente, das exportações de frutas frescas (BOTEON, 2006).

A produção brasileira é estimada em aproximadamente 450 milhões de caixas, sendo o Estado de São Paulo o maior produtor (80%). A maior parte dessa produção (80%) é destinada à produção de suco industrializado, gerando uma receita anual de mais de 2 bilhões de dólares (ABECITROS, 2007).

O setor citrícola enfrenta sérios problemas fitossanitários que deprecia a qualidade do produto e diminui a produtividade. Dentre esses problemas, as doenças exercem fundamental papel, destacando-se a pinta preta dos frutos cítricos (PPC), causada pelo fungo *Guignardia citricarpa* Kiely (fase anamórfica: *Plyllosticta citricarpa*).

A pinta preta dos citros, também denominada mancha preta dos citros, é uma doença de grande importância econômica. Ocorre na cultura em diferentes continentes, como África, Ásia e América do Sul (SUTTON; WATERSTON, 1966; KIELY, 1948). No Brasil, encontra-se comprovadamente presente de forma epidêmica, em mais de quarenta municípios produtores do Estado de São Paulo, Santa Catarina, Paraná, Espírito Santo e

Amazonas e ainda nos estados de Minas Gerais, Rio Grande do Sul e Rio de Janeiro (FUNDECITROS, 2000). A doença é de grande importância para o Estado de São Paulo (FEICHTENBERGUER et al., 1997) e foi verificada, de forma mais severa, em pomares de limoeiro 'Siciliano' e laranjeiras doces de maturação tardia, nos municípios de Conchal e Engenheiro Coelho/SP (GOES; FEICHTENBERGER, 1993).

A doença, até o momento, apresenta seis tipos de sintomas em frutos (AGUILLAR-VILDOSO et al., 2002), sendo os mais comuns os do tipo mancha dura e os da falsa melanose (KOTZÉ, 1989). Além da depreciação comercial no mercado de frutas frescas, o patógeno ocasiona queda precoce dos frutos, reduzindo a produção em até 80% (KLOTZ, 1978). Devido ao longo período de susceptibilidade dos frutos, várias pulverizações com fungicidas protetores ou sistêmicos, isolados ou combinados, são necessárias, elevando o custo de produção. O controle realizado no Brasil é baseado em informações geradas por outros países, principalmente África do Sul, onde a doença é relevante (GOES, 2002).

Além da elevação dos custos, problemas eminentes como a seleção de fungos resistentes aos produtos químicos comumente utilizados, impactos negativos ao meio ambiente e problemas de saúde pública têm incentivado a comunidade científica e produtores na busca de novas técnicas de manejo, visando uma maior sustentabilidade agrícola. Além disso, para o cultivo orgânico, cuja procura por produtos pela sociedade é crescente, os problemas com essa doença são altos, havendo necessidade de desenvolvimento de produtos alternativos.

O presente trabalho teve por objetivo avaliar o efeito dos agentes de controle biológico e de produtos biocompatíveis no controle da pinta preta, estabelecer sua relação com os níveis de severidade da doença e avaliar seus efeitos em condições de pós-colheita.

2. REVISÃO DE LITERATURA

O Brasil é o maior produtor mundial de laranja e o maior exportador de suco (CITRUSFEAT, 2001; POLLACK, 2001). A área cultivada brasileira é de 820 mil hectares, dos quais 77% localizam-se na região Sudeste, representando 49% de toda a produção nacional de frutas (ABECITRUS, 2007). Cerca de 80% dessa produção é destinada à produção industrial de suco para a exportação.

São Paulo é o maior produtor do Brasil, possuindo cerca de 760 mil hectares. Grande parte dessa produção é destinada à exportação de suco industrializado, gerando uma receita anual de mais de 2 bilhões de dólares (ABECITROS, 2007).

2.1 *Guignardia citricarpa*

A pinta preta, causada por *Guignardia citricarpa* Kiely (fase anamórfica de *Phyllosticta citricarpa* McAlp. Van Der Aa), é responsável por elevados prejuízos na cultura dos citros, da ordem de vários milhões de dólares em diferentes países da África, Ásia, Oceania e América do Sul (GOES, 2002; REIS et al., 2006). Segundo GOES et al. (2000), sua importância, do ponto de vista econômico, se dá ao fato de atingir variedades mais importantes, depreciar os frutos comercialmente, reduzir a produtividade, devido a queda precoce de frutas, e provocar alterações nos padrões tecnológicos.

A primeira descrição da doença e sua relação com o patógeno se deram na Austrália em 1895 (KIELY, 1948). Em 1937 foi observada no Brasil em frutos coletados em uma feira livre na cidade de Piracicaba, no Estado de São Paulo (AVERNA-

SACCÁ, 1940). Novos relatos foram feitos no Rio de Janeiro em 1980 (ROBBS et al., 1980), no Rio Grande do Sul, na década de 80 (GOES; FEICHTENBERGUER, 1993). No Brasil, encontra-se comprovadamente presente de forma epidêmica, em mais de quarenta municípios produtores do Estado de São Paulo, Santa Catarina, Paraná, Espírito Santo e Amazonas e ainda nos estados de Minas Gerais, Rio Grande do Sul e Rio de Janeiro (FUNDECITROS, 2000). Porém, a doença foi verificada de forma mais severa em pomares de limoeiro 'Siciliano' e laranjeiras doces de maturação tardia, nos municípios de Conchal e Engenheiro Coelho/SP (GOES; FEICHTENBERGER, 1993).

A pinta preta possui duas fontes de inóculo, sendo os conídios e ascósporos. Os picnidiósporos são formados em lesões nos frutos, folhas e folhas caídas ao solo. Segundo Kotzé (1981), os picnidiósporos podem ser formados também em ramos mortos. Os ascósporos são formados exclusivamente em folhas caídas ao solo, não sendo encontrados em frutos ou lesões de folhas aderidas às plantas (McONIE, 1965). O início da sua produção se dá por volta de 50 a 180 dias após a queda das folhas (KOTZÉ, 1981), onde a liberação dos ascósporos acompanha a chuva, de tal forma que 3mm já podem ser suficientes para a liberação dos mesmos, desde que haja umidade prévia.

A queda de folhas de plantas cítricas pode ocorrer durante todo o ano. Entretanto, fatores como estresse hídrico, desequilíbrio nutricional, pragas e doenças podem aumentar essa abscisão (FUNDECITROS, 1998). Diante disso, teoricamente, existe o potencial de que os pseudotécios e ascósporos possam ser formados durante o ano todo. As condições climáticas é que exercem maior ou menor impacto na produção, viabilidade e dispersão. McOnie (1964) demonstrou na África do Sul que o tempo necessário para a formação e maturação dos pseudotécios de folhas caídas no mês de abril, era de 24 semanas, enquanto que as caídas nos meses de dezembro, de apenas seis semanas. Esse fato devia-se, exclusivamente, às diferenças das condições ambientes.

A doença afeta folhas, ramos e frutos. Nos frutos, as lesões restringem-se à casca, impedindo sua comercialização no mercado de frutas frescas (MAUCHMANI; METRAUX, 1998). As perdas são mais severas nos limões e laranjas doces de maturação tardia, ocorrendo quedas prematuras.

Segundo Kotzé (1981), um aspecto importante a ser destacado refere-se ao longo período de incubação do fungo. Na presença de umidade, é emitido um "peg" de

infecção, que penetra na cutícula do hospedeiro e se expande para dentro do tecido na forma de massa de micélio, permanecendo entre a cutícula e a epiderme, denominada de infecção quiescente, originando lesões típicas da doença. Os mecanismos envolvidos nesse processo não são conhecidos. Entretanto, sabe-se que os sintomas em níveis mais severos estão associados a uma elevação de temperatura por ocasião da maturação dos frutos e a uma maior incidência de raios solares nos frutos mais expostos. Feichtenberger et al. (1997) relatam que os sintomas em folhas, ramos e frutos são mais freqüentes nas faces da planta mais expostas aos raios solares, estresse hídrico e debilidade das plantas resultante de vários fatores como doenças e desequilíbrios nutricionais.

2.1.2 Sintomatologia da pinta preta

Segundo Herbert (1989), quatro tipos de lesões podem ser observados:

- mancha dura – sintoma mais comum e típico da doença. Aparece quando os frutos iniciam a maturação. Em frutos ainda verdes podem ser observados halos amarelados ao redor das lesões e em frutos maduros observa-se um halo verde ao redor das lesões, que apresentam o centro deprimido de cor marrom-claro ou cinza-escuro e os bordos salientes de coloração marrom-escuro. No interior dessas lesões aparecem pontuações negras, que são os picnídios do fungo.
- mancha sardenta – aparecem depois da maturação, com a casca apresentando coloração bem amarelada ou laranja. As lesões são avermelhadas e levemente deprimidas, podendo coalescer, formando uma grande lesão, ou permanecer pequenas e individualizadas.
- mancha virulenta – desenvolvem-se normalmente no final da safra, com frutos maduros e temperaturas elevadas. Pode ocorrer depois da colheita, durante o transporte e o armazenamento dos frutos. As lesões aparecem como resultado do desenvolvimento e coalescência de lesões dos dois tipos anteriores, dando origem a grandes lesões deprimidas de centro acinzentado e bordos salientes de coloração marrom-escuro ou vermelho-escuro. No centro dessas lesões aparecem muitas pontuações escuras, que são os picnídios. A casca do fruto fica necrosada na área da lesão, mas a parte interna do fruto não é afetada.

- mancha do tipo falsa melanose – normalmente encontra-se com cerca de 4-5 meses após a queda das pétalas. Caracteriza-se pela presença de manchas irregulares, sem textura áspera ao tato, de tamanho variado, mas predominantemente pequenas. Nas fases subseqüentes, as lesões individualizadas são normalmente circundadas por numerosos pontos escuros, constituindo as lesões satélites. Em tais lesões, não são formados picnídios.

Segundo Goes et al. (2000), o sintoma mancha trincada aparece em frutos ainda verdes e caracterizam-se por manchas superficiais, irregulares, lisas e de tamanho variado, inicialmente com aspecto oleoso, escuro ou levemente castanhas. Nas manchas não são produzidos picnídios e, de forma semelhante aos sintomas do tipo falsa melanose, normalmente não causa queda dos frutos, mesmo quando esses encontram-se severamente atacados. Quando os frutos atingem a maturidade, a casca dos frutos, correspondentes às áreas lesionadas, apresenta trincas ou fissuras. Há suspeita de que a mancha trincada esteja associada à presença e conseqüentes danos causados pelo ácaro da falsa ferrugem (*Phyllocoptruta oleivora*).

Um sexto sintoma encontra-se associado, sendo denominado de mancha rendilhada, cujos sintomas caracterizam-se pela presença de lesões superficiais, sem borda definida e de textura lisa quando os frutos estão verdes.

2.1.3 Medidas de controle da pinta preta

2.1.3.1 Controle químico

O controle baseia-se na aplicação de fungicidas, sejam eles protetores, sistêmicos ou misturas deles, associada aos óleos minerais ou vegetais (GOES et al., 1990, PRATES; NOGUEIRA, 1997). Segundo Goes (1998), melhores resultados são obtidos com pulverizações a cada 50 a 55 dias com misturas de fungicidas sistêmicos e protetores e de 28 dias para somente protetores (SCHUTTE et al., 1997). De acordo com Feichtenberger et al (1997), as medidas de controle para a pinta preta incluem o plantio de mudas sadias produzidas em regiões livres da doença; remoção de frutos temporões infectados, antes do início da florada, visando reduzir a fonte de inóculo representada pelos picnídios em lesões de frutos; redução da fonte de inóculo (ascósporos); eliminação de plantas em estado de depauperamento avançado do pomar; manutenção das plantas em boas condições de nutrição e sanidade; pulverizações visando à proteção dos frutos durante o principal período de

suscetibilidade com fungicidas sistêmicos (benzimidazóis ou estrobirulinas) ou de contato (cobre ou mancozeb), preferencialmente de forma associados e acrescidos de óleos mineral ou vegetal.

Ainda, o controle varia de acordo com o destino da produção. Quando destina-se a produção industrial o controle em campo é realizado com cobre adicionado a óleo emulsionável mineral ou vegetal, usando-se quatro ou cinco aplicações após a queda das pétalas. Para fruta *in natura*, recomenda-se a mistura de cobre misturado a óleos nas primeiras pulverizações, pois esses produtos podem provocar fitotoxidez aos frutos, além de tornar mais evidente as manchas de origem abiótica. Nas demais pulverizações deve-se utilizar benzimidazóis ou estrobirulinas misturadas a óleo, aplicados de forma alternada. Os benzimidazóis podem ser aplicados até três semanas antes da colheita e em pós-colheita. No Brasil, o uso de fungicidas em pós colheita, restringem-se ao thiabendazol e imazalil (FISCHER et al., 2004; AGROFIT, 2006).

2.1.3.2 Controle biológico

Os problemas advindos do uso intensivo de fungicidas, como a seleção de fungos resistentes, impactos negativos ao ambiente, restrições de ordem pública e econômica, tem estimulado a busca de formas alternativas de controle de doenças, principalmente através da introdução massiva de antagonistas.

Comercialmente o controle biológico é conceituado como o controle de um microrganismo por meio de outro microrganismo. Dentre os microrganismos mais estudados, encontram-se espécies do gênero *Trichoderma* (BASTOS, 1988; DUBOS et al., 1982; BETTIOL et al., 2003) e *Bacillus subtilis* (SONODA; GUO, 1996; KALITA et al., 1996; BETTIOL et al., 1994; FERREIRA et al., 1991). Kupper et al. (2006) relatam que na África do Sul, a Universidade de Pretória comercializa um isolado de *B. subtilis* para o controle da mancha preta dos frutos cítricos, sendo esse o único relato de produto biológico para o controle dessa doença.

A literatura apresenta diversos exemplos do potencial do controle biológico de doenças da parte aérea (McKEEN et al., 1986; PUSEY et al., 1986; BAKER et al., 1985; BETTIOL et al., 1994; BETTIOL; VÁRZEA, 1992; MEDEIROS; MENESES, 1994; LORITO et al., 1994; INBAR; CHET, 1995; BENHAMOU et al., 1994; CARISSE et

al.,2000; CULLEN et al., 1984; GULLINO; GARIBALDI, 1983; BASTOS, 1988; DUBOS et al., 1982; PICCININ, 1996; FALK et al., 1996). Entretanto, são poucos os casos de sucesso comercial. Esse fato é devido, principalmente, à paralisação dos trabalhos em condições controladas de cultivo. Kupper et al. (2003) relataram que, em condições naturais, *B. subtilis* equiparou-se estatisticamente ao fungicida benomyl, proporcionando menor porcentagem de flores com sintomas de *Colletotrichum acutatum* e maior número de frutos de citros efetivos.

4.1.3.3. Biofertilizantes

Outra opção econômica e de baixo impacto é o uso de extratos aquosos de matéria orgânica e biofertilizantes. Esses produtos possuem uma complexa e elevada comunidade microbiana, com presença de bactérias, fungos leveduriformes e filamentosos (WELTZIEN, 1989; CASTRO et al., 1992; McQUILKEN et al., 1994; ELAD; SHTIENBERG, 1994; YOHALEM et al., 1996; TRATCH; BETTIOL, 1997; BETTIOL, 1997). Além da comunidade microbiana original, esses extratos podem ser bioativados com reconhecidos agentes de biocontrole (HAYASHIDA et al., 1989). A principal vantagem desta técnica é o custo, onde o agricultor não depende da compra deste material, mas sim apenas do aproveitamento de material disponível na propriedade. Com isso, passaram a ser utilizados para o controle de doenças de parte aérea, que antes seriam controladas basicamente por fungicidas (BETTIOL, 2003).

Weltzien e Ketterer (1986) verificaram o aumento da resistência de folhas de videira contra míldio (*Plasmopara viticola*), quando essas foram mergulhadas ou pulverizadas com extratos aquosos de uma mistura de composto de esterco de cavalo, palha e solo. Weltzien (1989) obteve controle de *P. viticola*, *Uncinula necator* e *Pseudopeziza tracheiphila* em videira; *Phytophthora infestans* em batata e tomate; *Erysiphe graminis* em cevada; *Erysiphe betae* em beterraba açucareira; *Sphaerotheca fuliginea* em pepino e *B. cinerea* em morango e feijão, com aplicações de extratos aquosos da mistura contendo esterco de cavalo, palha e solo compostados por 8-12 meses. A indução de resistência foi um dos mecanismos envolvidos, porém o autor observou inibição direta dos fungos pelo extrato.

McQuilken et al. (1994), utilizando extratos aquosos obtidos da mistura de esterco e palha compostada, obtiveram supressão do desenvolvimento de lesões de *B. cinerea* em folhas de feijão. Também trabalhando com *B. cinerea*, Elad e Shtienberg (1994)

obtiveram controle em tomate, pimentão e uva, pulverizando-os com extratos aquosos de compostos produzidos a partir da mistura de esterco de vaca e de galinha, e a partir de bagaço de uva. Esses extratos controlaram parcialmente o oídio (*Leveillula taurica*) de folhas de tomate. Yohalem et al. (1996), pulverizando semanalmente extratos aquosos de substrato exaurido da produção de cogumelo (*Agaricus bisporus*), observaram redução na incidência de sarna da macieira (*Venturia inaequalis*), embora os extratos não tenham sido tão eficientes quanto o captan.

O biofertilizante, produzido pela digestão anaeróbia de esterco bovino, vem sendo recomendado para o controle de diversas doenças (SANTOS, 1992). Castro et al. (1991) verificaram inibição de *Colletotrichum gloeosporioides*, *Thielaviopsis paradoxa*, *Penicillium digitatum*, *Fusarium* e *Cladosporium* pelo biofertilizante. Tratch & Bettiol (1997) também observaram inibição do crescimento micelial de *Alternaria solani*, *Stemphylium solani*, *Septoria lycopersici* e *B. cinerea* e inibição da germinação de esporos de *B. cinerea*, *A. solani*, *Hemileia vastatrix* e *Coleosporium plumierae*. Zhang et al. (1996) induziram o controle de antracnose (*Colletotrichum orbiculare*) em folhas de pepino com substrato supressivo a *Pythium*. Entretanto, o mecanismo de aquisição de resistência sistêmica é desconhecido. O uso de substrato capaz de induzir a resistência sistêmica tem como vantagens a facilidade de aplicação e a não necessidade de preparo do extrato.

Além do controle de patógenos, existe referência dos biofertilizantes no efeito nutricional nas plantas (SANTOS, 1992; McQUILKEN et al., 1994). Contudo, como se trata de uma técnica que vem sendo expandida, há necessidade de realização de estudos para a determinação dos impactos no ambiente e na saúde pública. Para minimizar os possíveis problemas sugere-se o uso de matéria orgânica livre de metais pesados e de agentes nocivos à saúde pública.

Os biofertilizantes apresentam, também, em sua composição macro e micronutrientes, microrganismos e seus metabólitos e compostos orgânicos e inorgânicos com efeitos sobre a planta e sobre a comunidade microbiana da folha e do solo (BETTIOL, 2003). O controle de doenças com biofertilizante pode ser devido à presença de metabólitos produzidos pelos microrganismos presentes no biofertilizante, como pela ação direta dos organismos sobre o patógeno ou sobre o hospedeiro. Ainda, pode ser considerada a ação direta dos nutrientes presentes no biofertilizante sobre os patógenos, além do efeito nutricional na

planta (BETTIOL, 2003; McQUILKEN et al., 1994; SANTOS, 1992). O Bokashi, desenvolvido no Japão é muito utilizado na agricultura natural e orgânica (PENTEADO, 2000), por exemplo, é um adubo orgânico concentrado, rico em nitrogênio, fósforo e potássio, utilizado em substituição aos fertilizantes químicos tradicionais e rico em microrganismos.

Não existe fórmula única para o preparo do biofertilizante. De acordo com Bettiol et al. (1998), um grupo de produtores, além de realizar a digestão do esterco pelo processo de fermentação, enriquece a suspensão com leite, açúcar ou melão, micronutrientes na forma de sais, resíduos de peixe, farinha de ossos, sangue e fígado, aumentando, assim, o poder nutricional do produto final. Este biofertilizante é conhecido como “Supermagro”.

O biofertilizante líquido, quando aplicado em pulverizações foliares, diluído em água em proporções que variam de 10% a 30% apresenta efeitos nutricionais consideráveis, favorecendo a fixação de flores e de frutos e aumentando a área foliar em diversas culturas, além do efeito hormonal (SANTOS, 1992).

Também existe a produção de biofertilizante por meio de digestão aeróbica a partir de farelos de arroz e de trigo, farinha de trigo e de ossos, fubá, rapadura e vísceras de peixe, sendo que, durante o processo, existe a necessidade de bomba de aeração para oxigenar o produto em fermentação. Os produtos finais, denominados biofertilizantes, são usados para fins nutricionais, além de transformarem-se numa complexa mistura de vitaminas, hormônios e antibióticos, sem conhecimento do efeito ou do modo de ação no controle de doenças e de pragas (FERNANDES et al., 2000). Quando aplicado no solo, o biofertilizante propicia a melhoria de características físicas como densidade aparente, porosidade, aeração e fertilidade e estimulando suas atividades biológicas (SANTOS, 1992). Apesar dos benefícios creditados ao produto, há poucos relatos quantificando ou explicando seus efeitos.

1 Controle da pinta preta dos frutos cítricos em cultivo orgânico com agentes 2 de biocontrole e produtos biocompatíveis

3 Eduardo R. A. Bernardo¹ & Wagner Bettiol, W.²

4 ¹Faculdade de Ciências Agronômicas, UNESP, Departamento de Proteção de Plantas, Rua
5 José Barbosa de Barros, nº 1780, CEP 18610-307, Botucatu, SP, Brasil, email:
6 erabernardo@hotmail.com; ²Embrapa Meio Ambiente, CP. 69, CEP 13820-000, Jaguariúna,
7 SP, Brasil, email: bettiol@cnpma.embrapa.br

8
9 Autor para correspondência: Eduardo Roberto de Almeida Bernardo

10
11 BERNARDO, E. R. A. & BETTIOL, W. Controle da pinta preta dos frutos cítricos em cultivo
12 orgânico com agentes de biocontrole e produtos biocompatíveis. *Tropical Plant Pathology*,

13 14 RESUMO

15 O presente trabalho teve por objetivo avaliar o efeito de pulverizações de agentes de
16 controle biológico (*Bacillus subtilis* e *Trichoderma harzianum*) e produtos biocompatíveis
17 (biofertilizante Microgeo® e leite) no controle da pinta preta dos frutos cítricos. Os
18 experimentos foram realizados em pomar de laranja 'Pêra' conduzido no sistema orgânico, nas
19 safras 2004/2005 e 2005/2006. Os tratamentos estudados foram: *B. subtilis* (10^7 e 10^8 ufc/mL);
20 Milhocina (0,5%) + Melaço (0,5%); *T. harzianum* (10^6 conídios/mL); leite cru (5%) e
21 biofertilizante Microgeo®. Os produtos, com exceção de Microgeo®, foram pulverizados a
22 partir de 08/12/2004 e 09/12/05, respectivamente, nos intervalos de 28, 56, 84, 112, 140 e 168
23 dias após a primeira pulverização. O tratamento Microgeo® foi pulverizado durante todo o

24 ano, em intervalos mensais. O delineamento experimental adotado foi o de blocos
25 casualizados com 15 repetições. Para a determinação da severidade da doença empregou-se
26 escala de notas que variou de 1 a 6 em 50 frutos coletados ao acaso, de cada repetição, por
27 ocasião da colheita. A porcentagem de frutos classificados nas classes 1, 2 e de 3 a 6 foram
28 calculados. Na safra 2004/2005, os tratamentos leite cru e *B. subtilis* (10^8 ufc/ml) apresentaram
29 maior número de frutos pertencentes à nota 1 (26,29 e 19,39%, respectivamente) e menor
30 número pertencentes às notas de 3 a 6 (29,85 e 35,58%, respectivamente). Na safra 2005/2006,
31 o tratamento com leite a 5% e *B. subtilis* (10^7 ufc/ml) exibiram maior número de frutos
32 pertencentes às notas 1 (7,41 e 3,74%, respectivamente) e menor número de frutos
33 pertencentes à faixa de 3 a 6 (64,44 e 71,03%, respectivamente). O tratamento *T. harzianum*
34 não reduziu a severidade da doença.

35 **Palavras-chave adicionais:** *Guignardia citricarpa*, mancha preta dos frutos cítricos,
36 controle alternativo, controle biológico.

37 **ABSTRACT**

38 **Biocontrol and biocompatible products for managing citrus back spot (*Guignardia***
39 ***citricarpa*) in organic cropping systems.**

40 The objective of this study was to evaluate the effects of biocontrol agents (*Bacillus*
41 *subtilis* and *Trichoderma harzianum*) and biocompatible products (milk and biofertilizer) to
42 control of citrus black spot in organic cropping systems. To that effect, the following
43 treatments were: *B. subtilis* (10^7 and 10^8 cfu/ml); autoclaved Milhocina (0.5%) + Molasses
44 (0.5%); *T. harzianum* (10^6 conidia/mL); milk (5%) and Microgeo® (commercial biofertilizer
45 currently used by citrus organic farmers) were studying in 2004/2005 and 2005/2006. The
46 products, except Microgeo®, were sprayed at scheduled intervals (0, 28, 56, 84, 112, 140, and
47 168 days) from December 8th, 2004 and 09/12/05, respectively. The Microgeo® treatment was
48 sprayed along all year at a monthly interval. The experiment was conducted in a completely
49 randomized blocks design with 15 replication trees of 'Pera', located in Santa Eudóxia, SP.
50 The severity of the disease on 50 fruits at harvest stage collected randomly from each plant
51 were evaluated by means of a six-category scale, where 1=0.5%, and 6=49% of fruit area with
52 lesions. The percentage of fruits classified at class 1, 2 and 3 to 6 were calculated. In
53 2004/2005, milk and *B. subtilis* (10^8 cfu/ml) treatments did not differed significantly from
54 each other and presented the higher percentage of fruits classified at class 1 (26.3% and
55 19.4%, respectively) and the lower percentage of fruits at class 3 to 6 (29.9% and 35.6%,
56 respectively). In 2005/2006 harvest, the milk and *B. subtilis* (10^7 cfu/ml) treatments presented
57 the higher percentage of fruits classified at class 1 (7.41 and 3.74%, respectively) and the
58 lower percentage of fruits at class 3 to 6 (64.44 and 71.03%, respectively). *T. harzianum*
59 treatment did not reduce the severity of disease.

60 **Additional keywords:** *Guignardia citricarpa*, citrus black spot, alternative control,
61 biological control.

64 INTRODUÇÃO

65 A pinta preta dos citros, causada por *Guignardia citricarpa* (fase anamorfa:
66 *Phyllosticta citricarpa*), é responsável por consideráveis perdas em citros cultivados no estado
67 de São Paulo. Causa a queda prematura dos frutos com severas reduções de produtividade
68 (Timmer, 1999). Os sintomas restringem-se ao flavedo dos frutos (Cardoso Filho, 2003), não
69 alterando a qualidade, sendo possível sua utilização na produção de suco concentrado
70 (Aguilar-Vildoso *et al.*, 2002).

71 O controle da doença baseia-se na aplicação de fungicidas protetores ou sistêmicos ou
72 misturas deles, associados a óleos minerais ou vegetais (Goes, 2002). Segundo Goes (1998),
73 os melhores resultados são obtidos com intervalos de pulverizações de 50 ou 55 dias através
74 da mistura de fungicidas sistêmicos e protetores, e de 28 dias para somente os fungicidas
75 protetores. Entretanto, problemas relacionados ao uso de fungicidas, como o surgimento de
76 fungos resistentes, impactos negativos ao ambiente e restrições de ordem pública e econômica,
77 estimulam a busca de novas alternativas de controle de doenças, principalmente pela
78 introdução de agentes de biocontrole e de produtos alternativos. Além disso, para o cultivo
79 orgânico, cuja procura por produtos é crescente, os problemas com essa doença são altos,
80 havendo necessidade de desenvolvimento de produtos alternativos.

81 Dentre os microrganismos mais estudados encontram-se espécies do gênero
82 *Trichoderma* (Stefanova *et al.*, 1999; Prasad *et al.*, 2002) e *Bacillus subtilis* (Bettioli *et al.*,
83 1994; Kalita *et al.*, 1996; Kupper *et al.*, 2002/2003). Outra opção econômica e de baixo

84 impacto é o uso de extratos aquosos de matéria orgânica e biofertilizantes. Esses produtos
85 possuem uma complexa e elevada comunidade microbiana, com presença de bactérias e
86 fungos leveduriformes e filamentosos (McQuilken *et al.*, 1994; Elad & Shtienberg, 1994;
87 Yohalem *et al.*, 1996; Tratch & Bettiol, 1997; Bettiol, 2003; Kupper *et al.*, 2006). A principal
88 vantagem desta técnica é o custo, onde o agricultor não depende da compra deste material,
89 mas sim apenas do aproveitamento de material disponível na propriedade.

90 O presente trabalho teve por objetivo avaliar o efeito dos agentes de controle biológico
91 e produtos biocompatíveis no controle da pinta preta dos citrus e estabelecer sua relação com
92 os níveis de severidade da doença.

93

94

MATERIAL E MÉTODOS

95 **Multiplicação dos agentes de biocontrole**

96 Os agentes de biocontrole foram obtidos da coleção de culturas da Embrapa Meio
97 Ambiente. Para multiplicação de *Bacillus subtilis* (AP3), a partir de cultura pura mantidas em
98 placas contendo Nutriente-Ágar (NA), colônias foram raspadas com alça e a suspensão obtida
99 foi transferida para erlenmeyer contendo 500 mL de BD (batata-dextrose). O Erlenmeyer foi
100 mantido em agitação a 180 rpm/min e temperatura ambiente por 72 horas. Decorrido esse
101 período, 100 mL do caldo fermentado foi transferido para outros Erlenmeyers contendo 400
102 mL de BD, que foram submetidos às mesmas condições descritas. Para a fermentação em
103 maior escala, foi utilizado um fermentador com capacidade de 50 L com injeção de ar,
104 contendo meio constituído de água, melaço de cana-de-açúcar (0,5% v/v), milhocina (0,5%
105 v/v) e fosfato monobásico (0,3% p/v), autoclavados por 40 minutos a 1,5 atm. Ao meio foi

106 transferida a suspensão da bactéria, anteriormente preparada, na proporção de 10% do volume
107 e mantido sob aeração por 72 horas para a fermentação.

108 *Trichoderma harzianum* foi multiplicado em meio sólido composto de grãos de arroz,
109 contidos em sacos de polipropileno (25cm x 35cm), acrescidos de uma alíquota de água,
110 lacrados e autoclavados por 20 minutos a 1,5 atm. Após o resfriamento, ao meio foi transferida
111 uma suspensão do isolado T01BA de *Trichoderma* (1×10^4 conídios/mL) com auxílio de uma
112 seringa bovina. Após 7 a 10 dias, período necessário para a colonização e esporulação, os
113 sacos de polipropileno contendo o fungo foram acondicionados em câmara fria (3° C).

115 **Biofertilizante**

116 O biofertilizante Microgeo® foi fornecido pela empresa Microbiol Indústria e
117 Comércio Ltda, Limeira, SP. Amostras de Microgeo® foram analisadas quanto à população
118 microbiana por ocasião das pulverizações. Para tanto, amostras foram coletadas em garrafas
119 PET esterilizadas, acondicionadas em refrigerador e mantidas a temperatura de $8^{\circ} \text{C} \pm 2$ por 24
120 horas. Dessas amostras foram retiradas alíquotas de 10 mL e realizada diluição em série em
121 água destilada esterilizada. As suspensões foram transferidas para placas contendo os meios
122 NA, meio King (KB) (King, 1954), Meio de Martin (Liu & Baker, 1980), e meio amido-
123 caseína-ágar (ACA) (Williams & Davies, 1965), para a quantificação de bactérias totais e *B.*
124 *subtilis*, *Pseudomonas* spp., actinobactérias e fungos. No caso específico de *Bacillus*, as
125 amostras foram submetidas a um choque térmico de 80°C por 20 minutos em banho-maria,
126 antes do plaqueamento. Dezoito horas, em média, após o plaqueamento, foi realizada a
127 contagem do número de colônias, com exceção das actinobactérias, onde o período de
128 avaliação estendeu-se até 15 dias.

129

130 **Controle da doença em cultivo orgânico**

131 O experimento foi conduzido durante as safras 2004/2005 e 2005/2006 em pomar de
132 laranja 'Pêra' enxertada em limão cravo com 20 anos, localizado em Santa Eudóxia, SP, com
133 histórico da doença e cultivado desde o seu início no sistema orgânico. Para as avaliações,
134 foram utilizadas as mesmas plantas em ambas as safras. Os produtos foram aplicados com
135 pulverizador tratorizado, sendo o volume de calda calibrado para atingir o início do ponto de
136 escorrimento (aproximadamente 12 L/planta). As árvores foram pulverizadas em intervalos de
137 28 dias, sendo o início em 08/12/04, para a safra 2004/2005 e 09/12/05, para a safra
138 2005/2006, exceto para o tratamento com Microgeo®, que foi mensal, pois é prática rotineira
139 na propriedade. As concentrações de *B. subtilis* foram 10^7 e 10^8 ufc/mL, obtidas com o caldo
140 fermentado pela bactéria; a de *T. harzianum* foi de 10^6 conídios/mL, e a de leite cru foi de 5%.
141 Além desses, foi incluído um tratamento contendo o meio de cultivo utilizado para a
142 fermentação de *Bacillus* (0,5% de milho-cina, 0,5% de melaço e 0,3% de fosfato monobásico).
143 Cada tratamento foi composto por 15 repetições, sendo cada planta considerada uma repetição.

144 As avaliações foram realizadas em 50 frutos coletados ao acaso em cada planta. Esses
145 frutos foram pesados e submetidos à avaliação da severidade, utilizando-se a escala
146 diagramática de Spósito et al. (2004) para mancha dura: 1 - 0,5%; 2- 1,7%; 3 - 5,0%; 4 -
147 11,5%; 5 - 22,5%; 6 - 49,0% de área lesionada. Com esses dados foram calculados os índices
148 de doença (ID) utilizando a fórmula $ID = Fv/nX$, onde F = número de frutos; v = nota; n =
149 número total de frutos avaliados; X = número de classes de notas). Além disso, foi calculada a
150 porcentagem de frutos classificados nas classes 1, 2 e de 3 a 6.

151 Para o ano agrícola 2005/2006 também foi avaliada a decomposição de folhas cítricas,
152 que são a principal fonte de inóculo de *G. citricarpa* (McOnie, 1965/1964). A avaliação da
153 taxa de decomposição foi feita pela análise de perda de massa utilizando-se “litter bags”. Os
154 “litter bags” e a metodologia adotada foi a de Fernandes et al. (2006), modificando-se o
155 diâmetro de malha para 0,5x0,5 cm e dimensões de 60 x 40 cm. Em cada “litter bag” foram
156 adicionadas 100 gramas de folhas cítricas verdes e maduras. Os “litter bags” foram
157 distribuídos sob a projeção das copas de plantas adultas, simulando a queda natural do
158 material formador da serapilheira. Os “litter bags” foram fixados ao solo, com auxílio de
159 grampos metálicos, instalados no início do verão (08/12/05) e coletados aos 60, 120 e 180
160 dias. Após a coleta, o conteúdo dos “litter bags” foi seco em estufa de circulação de ar forçada
161 ($65^{\circ}\text{C} \pm 5$) até atingir peso constante. Em seguida, levados ao laboratório onde o seu conteúdo
162 foi examinado para retirada de partículas de solo e, posteriormente, sua massa foi determinada.
163 A taxa de decomposição da serapilheira foi quantificada mediante avaliação de medida da
164 perda de massa (Fernandes et al., 2006), com a seguinte fórmula: Massa remanescente (%) =
165 $(\text{massa final/massa inicial}) \times 100$.

166 Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas foram
167 comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa SAS (2002).

168

169

RESULTADOS E DISCUSSÃO

170

171

172

173

Os valores de ID calculados indicam que *B. subtilis* 10^7 (0,40 e 0,53); *B. subtilis* 10^8 (0,36 e 0,57); *T. harzianum* (0,47 e 0,62); meio de cultura (0,43 e 0,57); biofertilizante (0,43 e 0,57) e o leite (0,36 e 0,51), respectivamente para as safras 2004/2005 e 2005/2006 (Figura 1AB), não foram eficientes no controle da doença, quando considerado que Kupper et al.

174 (2006) verificaram ID=0,217 para o controle da pinta preta nas árvores pulverizadas com
175 oxicloreto de cobre + carbendazim + mancozeb. Entretanto, há a necessidade de ser
176 considerado que não existe tratamento padrão para o controle da doença em cultivo orgânico.
177 Para a safra 2004/2005, os tratamentos com *Bacillus* (10^8 ufc/mL) e leite (5%), apesar de não
178 diferirem estatisticamente do tratamento controle, que foi o biofertilizante Microgeo®, diferiu
179 do tratamento com *T. harzianum* (Figura 1). Por outro lado, na safra 2005/2006 apenas o leite
180 diferiu do *Trichoderma*.

181 Leite e *Bacillus* (10^8 ufc/mL) apresentaram, na safra 2004/2005, as maiores
182 porcentagens de frutos pertencentes à nota 1 (26,3 e 19,4%, respectivamente) e a menor
183 porcentagem pertencentes às notas de 3 a 6 (29,85 e 35,58%, respectivamente) (Figura 2A),
184 sendo mais eficientes que o biofertilizante, que apresentou 10,9 e 50,8%, respectivamente
185 (Figura 2A). *Trichoderma* não foi eficiente no controle da doença apresentando 6,6% de frutos
186 com nota 1 e 64,3% com notas entre 3 a 6 (Figura 2A). Na safra 2005/2006, os tratamentos
187 leite e *Bacillus* (10^7 ufc/mL) apresentaram as maiores porcentagens de frutos pertencente à
188 nota 1 (7,41 e 3,74%, respectivamente) e as menores porcentagem pertencentes às notas de 3 a
189 6 (64,44 e 71,03%, respectivamente) (Figura 2B). Esses tratamentos foram mais eficientes que
190 o biofertilizante, que apresentou 2,33 e 76,74% de frutos com notas 1 e de 3 a 6,
191 respectivamente. Assim como na safra 2004/2005, *Trichoderma* apresentou a maior
192 porcentagem de frutos com notas nas classes de 3 a 6 (87,68%) (Figura 2B).

193 O efeito protetor do leite obtido no trabalho é a primeira observação, pois esse produto
194 é apenas recomendado para o controle de oídio (Bettiol *et al.*, 1999). Assim, haveria a
195 necessidade da realização de mais estudos com esse produto biocompatível, inclusive para
196 entender o seu modo de ação. Se for confirmada a eficiência do leite, esse produto apresenta

197 amplas possibilidades de uso, pois a região citrícola do estado, também é produtora de grandes
198 quantidades de leite. Aliado a isso, poderiam ser testados os subprodutos da indústria láctea.

199 O fato de *T. harzianum* não ter sido eficiente no controle da doença indica que o
200 organismo, originado do solo (Bernardo *et al.*, 2003), não se adaptou ao ambiente da parte
201 aérea das frutas ou que o mesmo não é eficiente para esse patossistema.

202 *B. subtilis* tem se mostrado eficiente no controle de vários patógenos que ocorrem no
203 filoplano, inclusive com diversos produtos comerciais disponíveis no mercado mundial
204 (Fravel, 2005). Segundo Knudsen e Spurr Jr. (1986), a habilidade de bactérias formadoras de
205 esporos permanecerem metabolicamente dormentes por longos períodos, aumenta sua
206 sobrevivência na superfície foliar, possibilitando sua permanência em períodos secos, em
207 temperaturas extremas e nas deficiências temporárias de nutrientes. Tal fato, provavelmente,
208 tenha colaborado para a eficiência de *B. subtilis* no controle da pinta preta na safra 2004/2005.
209 Kupper *et al.* (2006) relatam que na África do Sul, a Universidade de Pretória comercializa um
210 isolado de *B. subtilis* para o controle da mancha preta dos frutos cítricos, sendo esse o único
211 relato de produto biológico para o controle dessa doença. Além disso, Kupper *et al.* (2003)
212 relataram que, em condições naturais, *B. subtilis* equiparou-se estatisticamente ao fungicida
213 benomyl, proporcionando menor porcentagem de flores com sintomas de *Colletotrichum*
214 *acutatum*, agente causal da queda prematura de frutos cítricos, e maior número de frutos de
215 citros efetivos.

216 A comunidade microbiana encontrada nos biofertilizantes é variável e depende da
217 forma de produção (aeróbio ou anaeróbio) e do substrato utilizado na sua produção e
218 composição (Fernandes, 2000; Kaffure *et al.*, 2004). O biofertilizante Microgeo® apresentou a
219 carga microbiana, composta principalmente por bactérias (3×10^6 ufc/mL), sendo na sua

220 maioria *Bacillus* spp. ($3,2 \times 10^5$ ufc/mL), *Pseudomonas* spp. ($1,5 \times 10^4$ ufc/mL) e, em menor
221 escala, actinobactérias ($1,1 \times 10^2$ ufc/mL), que são organismos interessantes no controle
222 biológico de diversas doenças de plantas (Janisiewicz e Jeffers, 1997; Rui Júnior *et al.*, 2007).
223 Os dados populacionais encontrados no Microgeo® diferem dos encontrados por Kupper *et al.*
224 (2006), que comparando dois biofertilizantes, encontraram populações de bactérias totais da
225 ordem de $1,29 \times 10^5$ ufc/mL e *Bacillus* spp. de $3,6 \times 10^4$ ufc/mL. A comunidade de fungos do
226 biofertilizante Microgeo® utilizado foi de $5,5 \times 10^5$ ufc/mL.

227 A decomposição das folhas cítricas caídas ao solo, em áreas de ocorrência da pinta
228 preta, é de extrema importância, visto que dependendo da umidade, época do ano e do estado
229 de decomposição das folhas, são suficientes para a liberação dos ascósporos, sua principal
230 fonte de inóculo (Kotzé, 1981). Segundo Swift *et al.* (1979) e Aerts (1997), os três principais
231 fatores que influenciam a decomposição, em ordem de importância, são as condições
232 climáticas, composição química das folhas e os organismos presentes no solo, que são
233 determinados pelo microclima. Neste trabalho, a taxa de decomposição manteve-se estável
234 durante o período de avaliação, não sendo observadas diferenças estatísticas entre os
235 tratamentos. Nos primeiros 60 dias a perda de massa foi rápida, mantendo-se contínua até o
236 final das avaliações (Figura 3).

237 Leite e *B. subtilis*, apesar de uma eficiência de controle inferior às apresentadas para os
238 fungicidas (Kupper *et al.*, 2006), podem ser úteis para o controle da pinta preta dos citros em
239 sistema de produção orgânico. Para tanto, há necessidade de adequar principalmente a época
240 de início, bem como a frequência pulverizações, pois são produtos de contato e de baixa
241 persistência no ambiente. Entretanto, existem evidências na literatura de potencial de uso de *B.*
242 *subtilis* para plantas de ciclo longo e com doença que ocorre ao longo do período, como por

243 exemplo, o controle da sigatoka-negra da bananeira e da antracnose em manga com o produto
244 Serenade à base de *B. subtilis* (Edgecomb & Manker, 2008).

245

246

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

247 AERTS, R. Climate, leaf litter chemistry and leaf litter decomposition in terrestrial
248 ecosystems: a triangular relationship. *Oikos* 79:439-449. 1997.

249 AGUILAR-VILDOSO, C.I., RIBEIRO, J.G.B., FEICHTENBERGER, E., GOES, A. &
250 SPÓSITO, M. B. Manual Técnico de Procedimentos da Mancha Preta dos Citros. Brasília.
251 MAPA/SDA/DDIV. 2002.

252 BERNARDO, E. R. A.; OLIVEIRA, J. C.; COITÉ, K. M. & NEMOTO, F. M. Aplicação de
253 *Trichoderma* sp. no controle de *Sclerotinia sclerotiorum* e *Rhizoctonia solani* em cultivo de
254 feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) sob pivô central no Oeste da Bahia. Resumos, 8º Simpósio de
255 controle biológico, São Pedro, SP. 2003. p.69.

256 BETTIOL, W. Controle de doenças de plantas com agentes de controle biológico e outras
257 tecnologias. In: Campanhola, C. & Bettiol, W. Métodos alternativos de controle fitossanitário.
258 Jaguariúna: Embrapa, 2003. pp.191-215.

259 BETTIOL, W.; ASTIARRAGA, B. D. & LUIZ, A. J. B. Effectiveness of cow's milk against
260 zucchini squash powdery mildew (*Sphaerotheca fuliginea*) in greenhouse conditions. *Crop*
261 *Protection* 18:489-492. 1999.

262 BETTIOL, W.; SAITO, M. L. & BRANDÃO, M.S.B. Controle da ferrugem do cafeeiro com
263 produtos à base de *Bacillus subtilis*. *Summa Phytopathologica* 20:119-122. 1994.

264 CARDOSO FILHO, J.A. Efeito de extratos de albedo de laranja (*Citrus sinensis*) e dos
265 indutores de resistência ácido salicílico, acilbenzolar-s-metil e *Saccharomyces cerevisiae* no

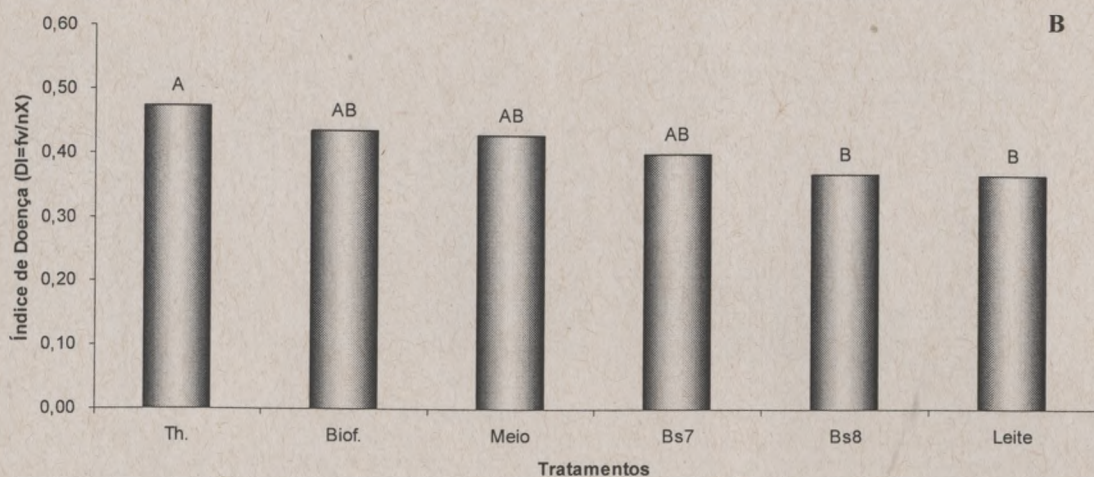
- 266 controle de *Phyllosticta citricarpa* (teleomorfo: *Guignardia citricarpa*). Tese de doutorado.
267 Piracicaba SP. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". 2003.
- 268 EDGECOMB, D.W. & MANKER, D.C. Serenade (*Bacillus subtilis* strain QST713) and
269 Sonata (*Bacillus pumilus* strain QST2808), new biological tools for integrated and organic
270 disease control programs. *Summa Phytopathologica* 34S:196-199. 2008.
- 271 ELAD, Y. & SHTINBERG, D. Effect of compost water extracts on grey mould (*Botrytis*
272 *cinerea*). *Crop Protection* 13:109-114. 1994.
- 273 FERNANDES, M. C. A. *O biofertilizante Agrobio*. Informativo do Centro Nacional de
274 Pesquisa de Agrobiologia, n. 13. EMBRAPA-Agrobiologia, Seropédica, Ano 4, setembro de
275 2000. In: **A Lavoura**, v.103, n.634, p.42-43, 2000.
- 276 FERNANDES, M. M; PEREIRA, M. G.; MAGALHÃES, L. M. S.; CRUZ, A. R. &
277 GIÁCOMO, R. G. Aporte e decomposição de serapilheira em áreas de floresta secundária,
278 plantio de sabiá (*Mimosa caesalpiniaefolia* Benth.) e andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) na
279 Flona Mário Xavier, RJ. *Ciência Florestal* 16:163-175. 2006.
- 280 FRAVEL, D.R. Commercialization and implementation of biocontrol. *Annual Review of*
281 *Phytopathology* 43:337-359, 2005.
- 282 GOES, A. de. Controle da mancha-preta dos frutos cítricos. *Laranja* 19:305-20. 1998.
- 283 GOES, A. Efeito da combinação de fungicidas sistêmicos e protetores no controle da mancha
284 preta dos frutos cítricos causados por *Guignardia citricarpa*. *Summa Phytopatologica* 28:9-13.
285 2002.
- 286 JANISIEWICZ, W. J. & JEFFERS, S. N. Efficacy of commercial formulation of two
287 biofungicidas for control of blue mold and gray mold of apples in cold storage. *Crop*
288 *Protection* 16:629-633. 1997.

- 289 KAFFURE, O. U., CÓRDOBA, C. A., NIEVES, J. S. & CASTELLANOS, D. Efecto de dos
290 tipos de compost y un biofertilizante sobre algunas poblaciones microbianas edáficas y su
291 posible relación con el desarrollo de un cultivo de zanahoria y cebolla en el municipio de
292 Pueblo Rico (Risaralda, Colombia). *Acta Biológica Colombiana* 9, n.2, 2004.
- 293 KALITA, P., BORA, L.C. & BHAGABATI, K.N. Phylloplane microflora of citrus and their
294 role in management of citrus canker. *Indian Phytopathology* 49:234-237. 1996.
- 295 KNUDSEN, G. R. & SPURR Jr., H. W. Management of bacterial populations for foliar
296 disease biocontrol. In: Mukerji, K.G. & Garg, K.L. *Biocontrol of Plant Diseases*, CRC Press,
297 Inc., Boca Raton, Flórida (Ed.). 1986. pp.83-92.
- 298 KOTZÉ, J. M. Epidemiology and control of citrus black spot in South Africa. *Plant Disease*
299 65:945-50. 1981.
- 300 KUPPER, K. C. & FERNANDES, N.G. Isolamento e seleção de *Bacillus* spp. para o controle
301 de *Colletotrichum acutatum* em flores destacadas de lima ácida 'Tahiti'. *Summa*
302 *Phytopathologica* 28: 292-295. 2002.
- 303 KUPPER, K C ; BETTIOL, W ; GOES, A. ; SOUZA, P. S de & BELLOTTE, J A M .
304 Biofertilizer for control of *Guignardia citricarpa*, the causal agent of citrus black spot. *Crop*
305 *Protection* 25:569-573. 2006.
- 306 LIU, S. D., BAKER, R.. Mechanism of biological control in soil suppressive to *Rhizoctonia*
307 *solani*. *Phytopathology* 70:404-412. 1980.
- 308 McONIE, K. C. Source of infection for black spot of citrus. *The South African Citrus Journal*
309 5:9. 1965.
- 310 McONIE, K.C. The latent occurrence in citrus and other hosts of a *Guignardia* easily confused
311 wit *G. citricarpa*, the citrus black spot pathogen. *Phytopathology* 54:40-43. 1964.

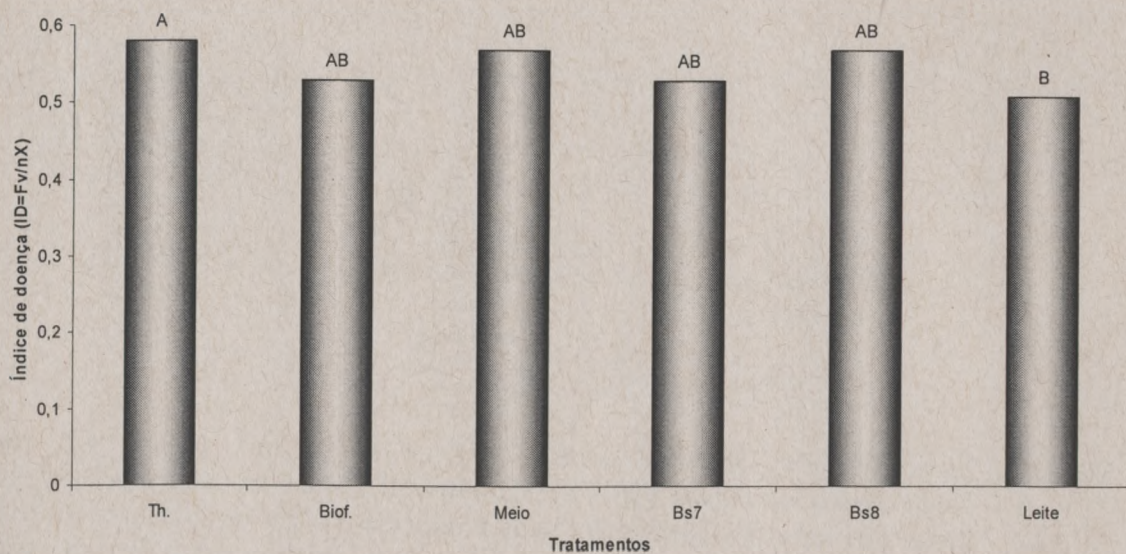
- 312 McQUILKEN, M. P.; WHIPPS, J. M. & LYNCH, J. M. Effects of water extracts of a
313 composted manure-straw mixture on the plant pathogen *Botrytis cinerea*. World Journal
314 Microbiology Biotechnology 10:20-66. 1994.
- 315 MORETTO, K. C. K.; FERNANDES, N. G. & GOES, A. Controle biológico de
316 *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. Fitopatologia
317 Brasileira, 28:251-257. 2003.
- 318 PRASAD, R. D.; RANGESHWARAN, R.; HEGDE, S. V. & ANUROOP, C. P. Effect of soil
319 and seed application of *Trichoderma harzianum* on pigeonpea wilt caused by *Fusarium udum*
320 under field conditions. Crop Protection 21:293-297. 2002.
- 321 RUI JÚNIOR, S.; BELTRAN, R.; VICENT, A. ARMENGOL, J.; GARCÍA-JIMÉNEZ, J. &
322 MEDEIROS, E. V. Biological control of *Monosporascus cannonballus* by *Chaetomium*.
323 Fitopatologia Brasileira 3:70-74. 2007.
- 324 SAS. Statistical Analysis System-Getting Started with the SAS Learning Edition. Carry, NC:
325 SAS Institute Inc. 2002.
- 326 SPÓSITO, M.B., AMORIM, L., BELASQUE JUNIOR, J., BASSANEZI, R.B. & AQUINO,
327 R. Elaboração e validação de escala diagramática para avaliação da severidade da mancha
328 preta em frutos cítricos. Fitopatologia Brasileira 1:81-85. 2004.
- 329 STEFANOVA, M.; LEIVA, A.; LARRINAGA L. & CORONADO, M. F. Actividad
330 metabólica de cepas de *Trichoderma* spp. para el control de hongos fitopatógenos del suelo.
331 Rev. Fac. Agron. (LUZ) 16:509-516. 1999.
- 332 SWIFT, M.; HEAL, O. W. & ANDERSON, J. M. Decomposition in terrestrial ecosystems.
333 Studies in ecology. Blackwell Scientific, Oxford, UK. vol. 5. 1979.

- 334 TIMMER, L. W. Diseases of fruit and foliage. In: Timmer, L.W. & Duncan, L.W. (Eds.)
335 Citrus Health Management. Saint Paul. APS Press. 1999. pp.107-115.
- 336 TRATCH, R. & BETTIOL, W. Efeito de biofertilizante sobre o crescimento micelial e a
337 germinação de esporos de alguns fungos fitopatogênicos. Pesquisa Agropecuária Brasileira
338 32:1131-1139. 1997.
- 339 WILLIAMS, S.T. & DAVIES F.L. Use of antibiotics for selective isolation and enumeration
340 of actinomycetes in soil, Journal of Genetic and Microbioly 38:251-261. 1965.
- 341 YOHALEM, D.S.; NORDHEIM, E.V. & ANDREWS, J.H. The effect of water extracts of
342 spent mushroom compost on apple scab in the field. Phytopathology 86:914-922. 1996.

343



344



345

346

347

348

349

350

351

352

Figura 1. Efeito do leite, *Bacillus subtilis* (Bs7 = 10^7 ufc/mL; Bs8 = 10^8 ufc/mL), *Trichoderma harzianum* (Th = 10^6 conídios/mL), meio de cultura (Meio= 0,5% de melado de cana-de-açúcar + 0,5% de milhocina e 0,3% de fosfato monobásico) e biofertilizante (Biof.) no índice de doença da pinta preta de frutos cítricos (*Guignardia citricarpa*), em laranja 'Pera' orgânica. Safra 2004-2005. B) Safra 2005/2006. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem entre si (Tukey 5%).

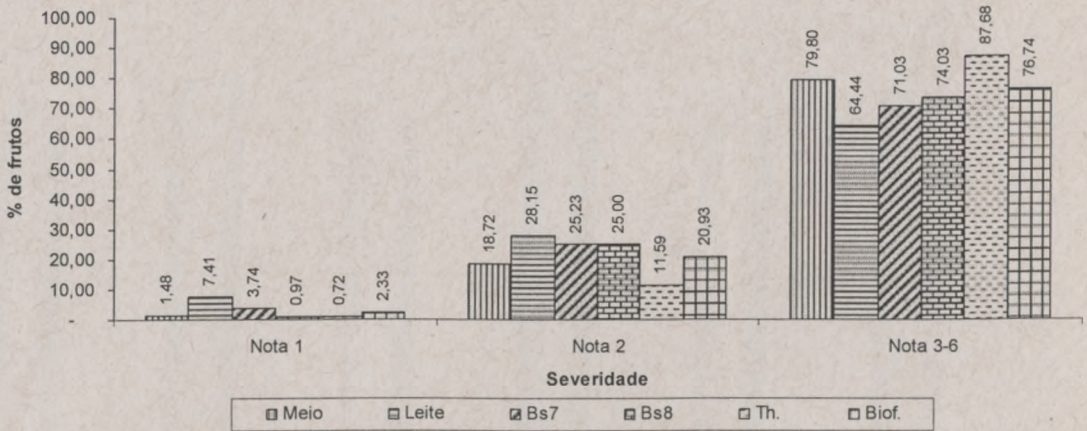
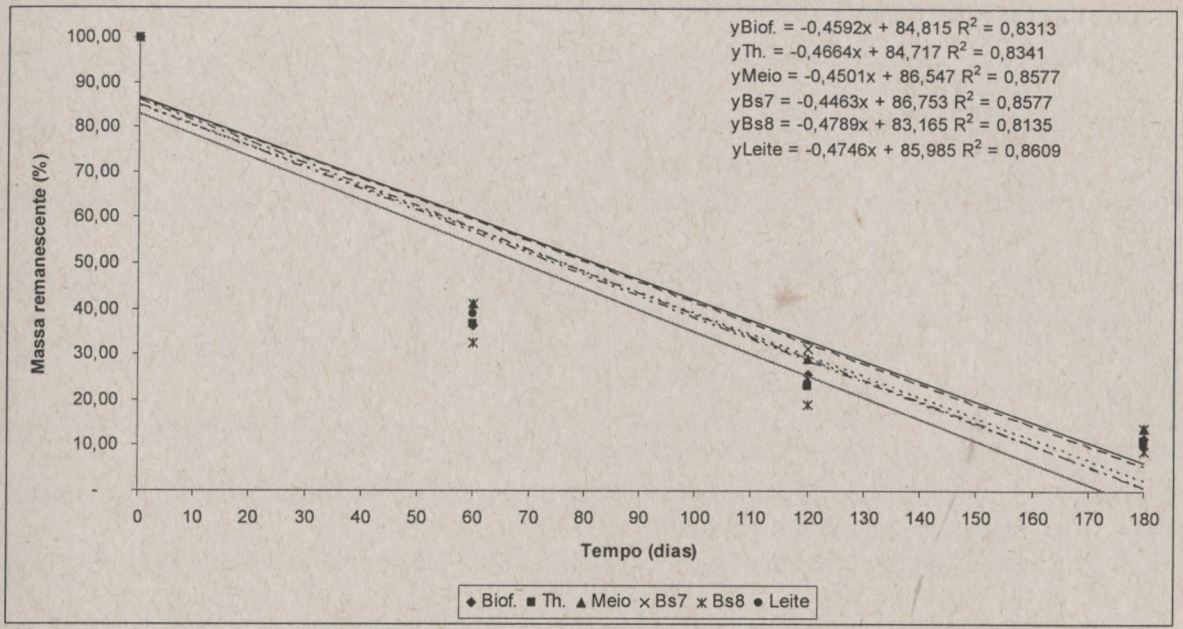


Figura 2. Efeito do leite, *Bacillus subtilis* (Bs7 = 10^7 ufc/mL; Bs8 = 10^8 ufc/mL), *Trichoderma harzianum* (Th = 10^6 conídios/mL), meio de cultura (Meio= 0,5% de melaço de cana-de-açúcar + 0,5% de milhocina e 0,3% de fosfato monobásico) e biofertilizante (Biof.) na porcentagem de frutas com notas 1, 2 e de 3 a 6 de severidade da pinta preta de frutos cítricos (*Guignardia citricarpa*), em laranja 'Pera' orgânica. Safra 2004-2005. B) Safra 2005/2006. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem entre si (Tukey 5%).

364



365
366
367
368
369
370
371

Figura 3. Efeito do leite, *Bacillus subtilis* (Bs7 = 10⁷ ufc/mL; Bs8 = 10⁸ ufc/mL), *Trichoderma harzianum* (Th = 10⁶ conídios/mL), meio de cultura (Meio= 0,5% de melaço de cana-de-açúcar + 0,5% de milhocina e 0,3% de fosfato monobásico) e biofertilizante (Biof.) na velocidade de decomposição de folhas cítricas.

1 **Controle da pinta preta dos frutos cítricos em cultivo convencional com** 2 **biofertilizantes**

3 **Bernardo E. R. A.¹ & Bettiol W.²**
4

5 ¹Faculdade de Ciências Agrônômicas, UNESP, Departamento de Proteção de Plantas, Rua
6 José Barbosa de Barros, nº 1780, CEP 18610-307, Botucatu, SP, Brasil, e-mail:
7 erabernardo@hotmail.com; ²Embrapa Meio Ambiente, CP. 69, CEP 13820-000, Jaguariúna,
8 SP, e-mail: bettiol@cnpma.embrapa.br
9

10 Autor para correspondência: Eduardo Roberto de Almeida Bernardo
11

12 Bernardo E. R. A. & Bettiol, W. Controle da pinta preta dos frutos cítricos em cultivo
13 convencional com biofertilizantes. *Tropical Plant Pathology*
14

15 **RESUMO**

16 O presente trabalho teve por objetivo avaliar o efeito de dois biofertilizantes
17 (Microgeo® e Bio2) no controle da pinta preta dos frutos cítricos. Os experimentos foram
18 realizados em pomar de 'Valência', nas safras 2003/2004 e 2004/2005. As árvores foram
19 pulverizadas em intervalos de 28 dias, sendo o início em 08/12/03, para a safra 2003/2004 e
20 08/11/2004, para a safra 2004/2005. No ensaio da safra 2003/2004 as concentrações utilizadas
21 do biofertilizante Microgeo® foram de 0, 10, 20, 30 e 40%, além do tratamento químico
22 utilizado na propriedade. Os mesmos tratamentos foram repetidos na safra 2004/2005 nas
23 mesmas plantas. Na safra 2004/2005 foi instalado outro ensaio com o biofertilizante Bio2 nas

24 concentrações de 0, 2,5, 5,0, 7,5 e 10%, no mesmo pomar. Cada tratamento foi composto por
25 15 repetições, sendo uma planta por repetição. O delineamento experimental adotado foi o de
26 blocos casualizados com 15 repetições. Para a determinação da severidade da doença
27 empregou-se escala de notas que variou de 1 a 6 em 50 frutos coletados ao acaso, de cada
28 repetição, por ocasião da colheita. A porcentagem de frutos classificados nas classes 1, 2 e de
29 3 a 6 foram calculados. Também foi determinado o peso dos frutos. Na safra 2003/2004, os
30 tratamentos com o biofertilizante Microgeo® nas doses 30 e 40% e o químico diferiram
31 estatisticamente do tratamento controle, sendo os demais semelhantes entre si em relação aos
32 níveis de severidade. Na safra 2004/2005 não foram observadas diferenças entre nenhum dos
33 tratamentos. Ainda na mesma safra, dentre as plantas tratadas com o Bio2, apenas o
34 tratamento químico diferiu estatisticamente da testemunha, sendo os demais semelhantes entre
35 si. Quando considerada a porcentagem de frutos por classe de severidade de doença, na safra
36 2003/2004, o tratamento químico apresentou a maior porcentagem de frutos pertencentes às
37 notas 1 e 2 (6,27 e 44,40%, respectivamente) e a menor porcentagem de frutos pertencentes às
38 notas de 3 a 6 (49,33). Na safra seguinte (2004/2005), para a mesma área, todos os tratamentos
39 apresentaram porcentagens semelhantes ao tratamento controle que foram de 2,56, 11,88 e
40 85,56% para as notas 1, 2 e de 3 a 6, respectivamente. No experimento com Bio2 (safra
41 2004/2005), apenas o controle químico apresentou uma discreta proporção superior de frutos
42 pertencentes à nota 2 (10,82%) e a menor proporção de frutos pertencentes às de 3 a 6
43 (87,20%), enquanto o tratamento controle apresentou 5,05 e 94,42% nas notas 2 e de 3 a 6,
44 respectivamente.

45 **Palavras-chave adicionais:** *Guignardia citricarpa*, biofertilizantes, controle
46 alternativo.

47

48 **ABSTRACT**49 **Control of citrus black spot in conventional cropping systems by biofertilizer.**

50 The present work evaluates the effect of two biofertilizers (Microgeo® and Bio2) in
51 the control of the citrus black spot. The experiments were carried through in orange trees
52 'Valencia', located in Conchal, SP, in harvests 2003/2004 and 2004/2005. The trees were
53 sprayed in intervals of 28 days, the first application was in 08/12/03, for 2003/2004 harvest,
54 and 08/11/2004, for 2004/2005 harvest. In the assay of the harvest 2003/2004, the biofertilizer
55 Microgeo® concentrations used were: 0, 10, 20, 30 and 40%, beyond the used chemical
56 treatment similar used by grower. The same treatments had been repeated in 2004/2005
57 harvest in the same plants. In 2004/2005 another assay with the Bio2 was installed
58 (concentrations 0, 2.5, 5.0, 7.5 and 10%). Each treatment was composed of 15 repetitions,
59 being each plant considered a repetition. The severity of the disease on 50 fruits at harvest
60 stage collected randomly from each plant were evaluated by means of a six-category scale,
61 where 1=0.5%, and 6=49% of fruit area with lesions. The percentage of fruits classified at
62 class 1, 2 and 3 to 6 were calculated. These fruits had been weighed. In 2003/2004,
63 Microgeo® in concentration of 30 and 40% and fungicides differed to the control, while the
64 others treatments were similar between themselves in severity levels of disease. In 2004/2005,
65 the severities were similar for all treatments. Still in the same harvest, amongst the plants
66 sprayed with the Bio2, only the fungicide differed from the control, while the others were
67 similar. When considered the percentage of fruits for class of disease severity, in harvest
68 2003/2004, it was observed that in the area sprayed with Microgeo® the chemical treatment
69 presented 6.27 and 44.40%, respectively, fruits to notes 1 and 2, and 49.33% notes of 3 to 6.

70 In the following harvest (2004/2005), for the same area, all the treatments had respectively
71 presented similar percentages to control with 2.56, 11.88 and 85.56% for notes 1, 2 and of 3 to
72 6, respectively. In the area sprayed with Bio2 (2004/2005 harvest), only the fungicide
73 presented superior ratio of pertaining fruits to note 2 (10.82%) and the lesser ratio of
74 pertaining fruits to the ones of 3 to 6 (87.20%), while the control presented 5.05 and 94.42%
75 in notes 2 and of 3 to 6, respectively.

76 **Key Words:** *Guignardia citricarpa*, citrus black spot, alternative control.

77

78 INTRODUÇÃO

79

80 A pinta preta dos citros, causada por *Guignardia citricarpa* (fase anamorfa:
81 *Phyllosticta citricarpa*) é responsável por consideráveis perdas em citros cultivados no estado
82 de São Paulo. Causa a queda prematura dos frutos, com severas reduções de produtividade
83 (Timmer, 1999). A doença apresenta seis tipos de sintomas em frutos (Aguillar-Vildoso *et al.*,
84 2002), sendo os mais comuns os do tipo mancha dura e os da falsa melanose (Kotzé, 1988). Os
85 sintomas restringem-se ao flavedo dos frutos (Cardoso Filho, 2003), não alterando a
86 qualidade, sendo possível sua utilização na produção de suco concentrado (Aguilar-Vildoso *et*
87 *al.*, 2002).

88 O controle da doença baseia-se na aplicação de fungicidas, sejam eles protetores,
89 sistêmicos ou misturas deles, associadas aos óleos minerais ou não (Goes, 2002). Segundo
90 Goes (1998), os melhores resultados são obtidos com intervalos de pulverizações de 50 ou 55
91 dias com misturas de fungicidas sistêmicos e protetores e de 28 dias para somente protetores.
92 Entretanto, problemas relacionados ao uso de fungicidas, como o surgimento de fungos
93 resistentes, impactos negativos ao ambiente, restrições de ordem pública e econômica e o

94 crescente aumento da procura de produtos orgânicos, estimula a busca de novas alternativas de
95 controle de doenças, principalmente quanto à introdução de agentes de biocontrole e de
96 produtos alternativos.

97 Uma alternativa econômica e de baixo impacto baseia-se no uso de extratos aquosos
98 de matéria orgânica e biofertilizantes. Esses produtos possuem uma complexa e elevada
99 comunidade microbiana, com presença de bactérias e fungos (Mcquilken *et al.*, 1994; Elad &
100 Shtienberg, 1994; Yohalem *et al.*, 1996; Tratch & Bettiol, 1997; Bettiol, 2003; Kupper *et al.*,
101 2006) sendo recomendados para o controle de várias doenças (Zhang *et al.*; 1996; Tratch e
102 Bettiol, 1997). Com isso, passaram a ser utilizados para o controle de doenças de parte aérea,
103 comumente controladas basicamente por fungicidas (Bettiol, 2003).

104 Os biofertilizantes apresentam também em sua composição macro e micronutrientes,
105 microrganismos e seus metabólitos e compostos orgânicos e inorgânicos com efeito sobre a
106 planta e sobre a comunidade microbiana da folha e do solo (Bettiol, 2003). O controle de
107 doenças com biofertilizantes pode ser devido à presença de metabólitos produzidos pelos
108 microrganismos, como pela ação direta dos organismos sobre o patógeno ou sobre o
109 hospedeiro. Ainda, pode ser considerada a ação direta dos nutrientes presentes no
110 biofertilizante sobre os patógenos, além do efeito nutricional na planta (Bettiol, 2003;
111 Mcquilken *et al.*, 1994; Santos, 1992). Apesar dos benefícios creditados aos biofertilizantes,
112 há poucos relatos quantificando ou explicando seus efeitos.

113 O presente trabalho teve por objetivo avaliar o efeito de dois biofertilizantes no
114 controle da mancha preta.

115

116

117 MATERIAL E MÉTODOS

118 Biofertilizante

119 O biofertilizante Microgeo®, produzido por fermentação aeróbia foi fornecido pela
120 empresa Microbiol Indústria e Comércio Ltda, Limeira, SP. O biofertilizante Bio2 foi
121 produzido a partir de fermentação aeróbia utilizando húmus, farinha de osso, micronutrientes,
122 solo, levedo de cerveja e melaço. O processo de fermentação foi realizado em fermentador de
123 recirculação aerada (modelo Vortex®) por 24 horas. Amostras dos biofertilizantes foram
124 analisadas quanto à comunidade microbiana presente por ocasião das pulverizações. Para
125 tanto, amostras foram coletadas em garrafas PET esterilizadas, acondicionadas em refrigerador
126 e mantidas a temperatura de $8^{\circ}\text{C} \pm 2$ por 24 horas. Dessas amostras foram retiradas alíquotas
127 de 10 mL e realizada diluição em série em água destilada esterilizada. As suspensões foram
128 transferidas para placas contendo os meios NA, meio King (KB) (King, 1954), Meio de
129 Martin (Liu e Baker, 1980), e meio amido-caseína-ágar (ACA) (Williams e Davis, 1965), para
130 a quantificação de bactérias totais e *B. subtilis*, *Pseudomonas* spp. e actinobactérias,
131 respectivamente. No caso específico de *Bacillus*, as amostras foram submetidas a um choque
132 térmico de 80°C por 20 minutos em banho-maria, antes do plaqueamento. Dezoito horas, em
133 média, após o plaqueamento foi realizada a contagem do número de colônias, com exceção
134 das actinobactérias, onde o período de avaliação estendeu-se até 15 dias.

135

136 Controle da doença em cultivo convencional

137 O experimento foi conduzido durante as safras 2003/2004 e 2004/2005 em pomar
138 comercial de laranja 'Valência' enxertada em limoeiro cravo com 20 anos, localizado em
139 Conchal, SP, com histórico da doença, conduzido no sistema convencional.

140 Os biofertilizantes foram aplicados com pulverizador tratorizado, sendo o volume de
141 calda calibrado para atingir o início do ponto de escorrimento (aproximadamente 12 L/planta).
142 As árvores foram pulverizadas em intervalos de 28 dias, sendo o início em 08/12/03, para a
143 safra 2003/2004 e 08/11/2004, para a safra 2004/2005. Na safra 2003/2004 as concentrações
144 utilizadas do biofertilizante Microgeo® foram 0, 10, 20, 30 e 40%. Na safra 2004/2005 foram
145 repetidos os mesmos tratamentos da safra anterior nas mesmas plantas. Além disso, foi
146 instalado nessa safra um ensaio com o biofertilizante Bio2 aplicado nas concentrações de 0,
147 2,5, 5,0, 7,5 e 10%. Cada tratamento foi composto por 15 repetições, sendo uma planta por
148 repetição. O tratamento químico padrão da propriedade foi considerada como testemunha
149 relativa (oxiclureto de cobre e carbendazim + mancozeb aos 84 e 140 dias após a primeira
150 pulverização).

151 As avaliações foram realizadas em 50 frutos coletados ao acaso em cada planta. Esses
152 frutos submetidos à avaliação da severidade, utilizando-se a escala diagramática de Spósito *et*
153 *al.* (2004) para mancha dura: 1 - 0,5%; 2- 1,7%; 3 - 5,0%; 4 - 11,5%; 5 - 22,5%; 6 -49,0% de
154 área lesionada. Com esses dados foram calculados os índices de doença (ID) utilizando a
155 fórmula ($ID = Fv/nX$, onde F = número de frutos; v = nota; n = número total de frutos
156 avaliados; X = número de classes de notas).

157 No ano agrícola 2005/2006 foi instalado um ensaio em pomar de laranja 'Bahia', no
158 município de Holambra (SP), onde foi avaliado o efeito do biofertilizante Bio2 (0, 2,5, 5, 7,5 e
159 10%), leite cru (5 e 10%), FishFértil® (1%) e químico na decomposição de folhas cítricas, a
160 principal fonte de inóculo de *G. citricarpa* (McOnie, 1965). A avaliação da taxa de
161 decomposição foi feita pela análise de perda de massa utilizando-se "litter bags". Os "litter
162 bags" e a metodologia adotada foi a de Fernandes *et al.* (2006), modificando-se o diâmetro de

163 malha para 0,5x0,5 cm e dimensões de 60 x 40 cm. Em cada “litter bag” foram adicionadas
164 100 gramas de folhas cítricas verdes e maduras. Os “litter bags” foram distribuídos sob a
165 projeção das copas de plantas adultas, simulando a queda natural do material formador da
166 serapilheira. Os “litter bags” foram fixados ao solo, com auxílio de grampos metálicos,
167 instalados no início do verão (09/12/05) e coletados aos 60, 120 e 180 dias. Após a coleta, os
168 “litter bags” foram secos em estufa de circulação de ar forçada ($65^{\circ}\text{C} \pm 5$) até atingir peso
169 constante, sendo posteriormente retirada as partículas de solo e determinadas as massas. A
170 taxa de decomposição da serapilheira foi quantificada mediante avaliação de medida da perda
171 de massa (Fernandes *et al.*, 2006), com a seguinte fórmula: Massa remanescente (%) = (massa
172 final/massa inicial) x 100.

173

174 RESULTADOS E DISCUSSÃO

175 Para a safra 2003/2004, os tratamentos com o biofertilizante Microgeo® nas doses 30 e
176 40% e o químico diferiram estatisticamente do tratamento controle, sendo os demais
177 semelhantes entre si (Figura 1A). Entretanto, na safra 2004/2005 não foram observadas
178 diferenças entre os tratamentos, sendo ainda observada uma elevação do ID, quando
179 comparado ao ano agrícola 2003/2004 (Figura 1B).

180 Quando considerada a porcentagem de frutos por classe de severidade de doença, na
181 safra 2003/2004, observa-se que o tratamento químico apresentou a maior porcentagem de
182 frutos pertencentes às notas 1 e 2 (6,27 e 44,40%, respectivamente) e a menor porcentagem de
183 frutos pertencentes às notas de 3 a 6 (49,33) (Figura 2A). Nos demais tratamentos as
184 porcentagens de frutos nas classes avaliadas foram semelhantes ao tratamento controle, que foi
185 de 0,13, 9,73 e 90,13% pertencentes às notas 1, 2 e de 3 a 6, respectivamente (Figura 2A). Na

186 safra seguinte (2004/2005), para a mesma área, todos os tratamentos apresentaram
187 porcentagens semelhantes ao tratamento controle, que foram de 2,56, 11,88 e 85,56% para as
188 notas 1, 2 e de 3 a 6, respectivamente (Figura 2B).

189 Na safra 2004/2005, no ensaio com o biofertilizante Bio2, apenas o tratamento químico
190 (convencional) diferiu estatisticamente da testemunha, sendo os demais semelhantes entre si
191 (Figura 3A). Na mesma safra (2004/2005), apenas o controle químico apresentou um discreto
192 incremento de frutos pertencentes à nota 2 (10,82%) e a menor proporção de frutos
193 pertencentes às de 3 a 6 (87,20%), enquanto o tratamento testemunha apresentou 5,05 e
194 94,42% nas notas 2 e de 3 a 6, respectivamente (Figura 2B).

195 O fato da irregularidade de eficiência dos biofertilizantes testados, nas épocas de
196 avaliação, não os desclassificam como uma possibilidade de manejo da doença, fato também
197 observado no controle químico, cuja eficiência variou no mesmo período. Os microrganismos
198 presentes nos biofertilizantes, uma vez adicionados à superfície foliar e de frutos podem
199 encontrar um ambiente hostil, principalmente devido às variações de temperatura, umidade,
200 ação de raios ultravioletas e competição com outros organismos pré-existentes.
201 Provavelmente, pulverizações mais concentradas ou em intervalos menores de aplicação e
202 adição de substâncias protetoras, como óleos adesivos, poderiam favorecer o estabelecimento
203 dos agentes e seus compostos, aumentando sua eficiência. Os agentes de controle biológico
204 necessitam se estabelecer, até um determinado nível crítico no interior das copas das árvores,
205 antes que o efetivo controle possa ocorrer. Com isso, o estabelecimento do antagonista pode
206 ser monitorado no campo em vários intervalos, começando com o início de aplicação. Essa
207 informação, associada com os dados de variações climáticas, seria importante para o
208 estabelecimento de critérios práticos para a racionalização da utilização do controle biológico.

209 A comunidade microbiana encontrada nos biofertilizantes é variável e depende da
210 forma de produção (aeróbio ou anaeróbio) e do substrato utilizado na sua produção e
211 composição (Fernandes, 2000; Kaffure *et al.*, 2004). O biofertilizante Microgeo® apresentou a
212 carga microbiana, composta principalmente por bactérias (3×10^6 ufc/mL), sendo na sua
213 maioria *Bacillus* spp. ($3,2 \times 10^5$ ufc/mL), *Pseudomonas* spp. ($1,5 \times 10^4$ ufc/mL) e, em menor
214 escala, actinobactérias ($1,1 \times 10^2$ ufc/mL). O biofertilizante Bio2 apresentou uma comunidade
215 composta por bactérias ($3,2 \times 10^8$ ufc /mL), sendo na sua maioria *Bacillus* spp. ($3,7 \times 10^5$ ufc
216 /mL), *Pseudomonas* spp. ($3,4 \times 10^4$ ufc/mL) e actinobactérias ($3,8 \times 10^2$ ufc/mL) que são
217 comprovadamente agentes de controle biológico das mais variadas doenças de plantas (Júnior
218 *et al.*, 2007; Janisiewicz & Jeffers, 1997). Os dados populacionais encontrados nos dois
219 biofertilizantes diferem dos encontrados por Kupper *et al.* (2006), que comparando dois
220 biofertilizantes produzidos de forma aeróbia e anaeróbia, encontrou populações de bactérias
221 totais da ordem de $1,29 \times 10^5$ ufc/mL e *Bacillus* spp. de $3,6 \times 10^4$ ufc/mL.

222 A taxa de decomposição manteve-se estável durante o período de avaliação, não sendo
223 observadas diferenças estatísticas entre os tratamentos em nenhuma das épocas (Figura 4).
224 Nos primeiros 60 dias a perda de massa foi rápida, mantendo-se contínua até o final das
225 avaliações (Figura 4). A decomposição das folhas cítricas caídas ao solo, em áreas de
226 ocorrência da pinta preta, é de extrema importância, visto que dependendo da umidade, época
227 do ano e do estado de decomposição das folhas, são suficientes para a liberação dos
228 ascósporos, sua principal fonte de inóculo (Kotzé, 1981). Segundo Swift *et al.* (1979) e Aerts
229 (1997), os três principais fatores que influenciam a decomposição, em ordem de importância,
230 são as condições climáticas, a composição química das folhas e os organismos presentes no
231 solo, que são determinados pelo microclima.

232

233 **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

234 AERTS, R. Climate, leaf litter chemistry and leaf litter decomposition in terrestrial
235 ecosystems: a triangular relationship. *Oikos* 79:439-449. 1997.

236 AGUILAR-VILDOSO, C.I., RIBEIRO, J.G.B., FEICHTENBERGER, E., GOES, A. &
237 SPÓSITO, M.B. Manual Técnico de Procedimentos da Mancha Preta dos Citros. Brasília.
238 MAPA/SDA/DDIV. 2002.

239 BETTIOL, W. Controle de doenças de plantas com agentes de controle biológico e outras
240 tecnologias. In: Campanhola, C. & Bettiol, W. Métodos alternativos de controle fitossanitário.
241 Jaguariúna: Embrapa, 2003. pp.191-215, 2003.

242 CARDOSO FILHO, J.A. Efeito de extratos de albedo de laranja (*Citrus sinensis*) e dos
243 indutores de resistência ácido salicílico, acilbenzolar-s-metil e *Saccharomyces cerevisiae* no
244 controle de *Phyllosticta citricarpa* (teleomorfo: *Guignardia citricarpa*). Tese de Doutorado.
245 Piracicaba SP. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". 2003.

246 ELAD, Y. & SHTINBERG, D. Effect of compost water extracts on grey mould (*Botrytis*
247 *cinerea*). *Crop Protection* 13:109-114. 1994.

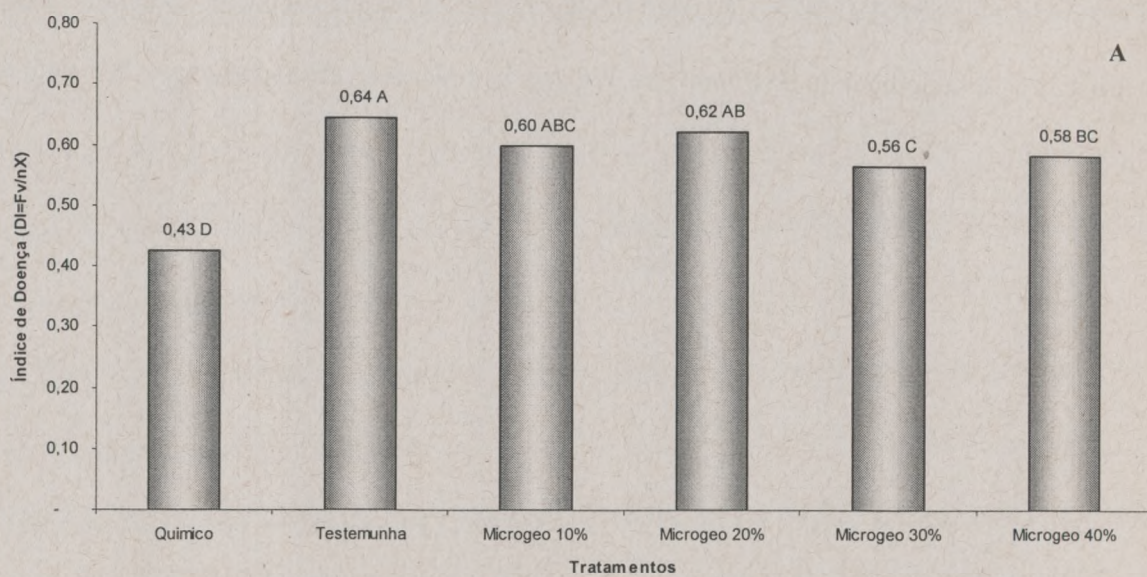
248 FERNANDES, M. M.; PEREIRA, M. G.; MAGALHÃES, L. M. S.; CRUZ, A. R. &
249 GIÁCOMO, R. G. Aporte e decomposição de serrapilheira em áreas de floresta secundária,
250 plantio de sabiá (*Mimosa caesalpiniaefolia* Benth.) e andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) na
251 Flora Mário Xavier, RJ. *Ciência Florestal* 16:163-175. 2006.

252 FERNANDES, M. C. A. *O biofertilizante Agrobio*. Informativo do Centro Nacional de
253 Pesquisa de Agrobiologia, n. 13. EMBRAPA-Agrobiologia, Seropédica, Ano 4, setembro de
254 2000. In: *A Lavoura* 103:42-43. 2000.

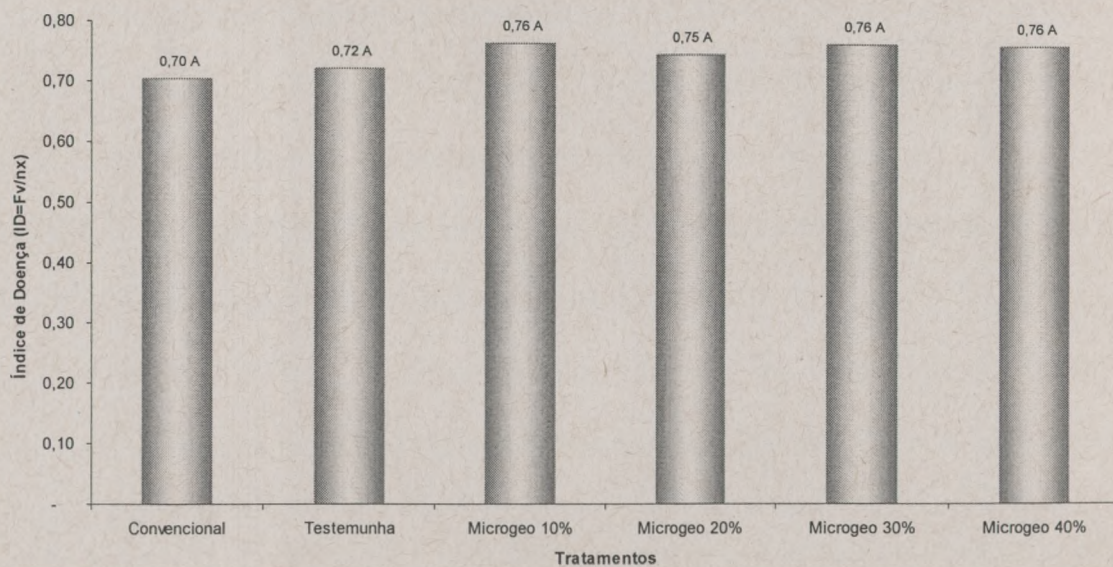
- 255 GOES, A. de. Controle da mancha-preta dos frutos cítricos. *Laranja* 19:305-20. 1998.
- 256 GOES, A. Efeito da combinação de fungicidas sistêmicos e protetores no controle da mancha
257 preta dos frutos cítricos causados por *Guignardia citricarpa*. *Summa Phythopatologica* 28:9-
258 13. 2002.
- 259 JANISIEWICZ, W. J. & JEFFERS, S. N. Efficacy of commercial formulation of two
260 biofungicides for control of blue mold and gray mold of apples in cold storage. *Crop*
261 *Protection* 16:629-633. 1997.
- 262 JUNIOR, R. S.; BELTRAN, R. & VICENT, A. Controle biológico de *Monosporascus*
263 *cannonballus* com *Chaetomium*. *Fitopatologia Brasileira* 32:70-74. 2007,
- 264 KAFFURE, O. U.; CÓRDOBA, C. A.; NIEVES, J. S. & CASTELLANOS, D. Efecto de dos
265 tipos de compost y un biofertilizante sobre algunas poblaciones microbianas edáficas y su
266 possible relación con el desarrollo de un cultivo de zanahoria y cebolla en el municipio de
267 Pueblo Rico (Risaralda, Colombia). *Acta Biológica Colombiana*, v.9, n.2. 2004.
- 268 KING, E. O.; WARD, M. K. & RANEY, D. E. J. *Lab. Clin. Med.* 44:301-307. 1954.
- 269 KOTZÉ, J. M. Black spot. In: WHITESIDE, J.O., GARNSEY, S.M. & TIMMER, L.W. (Eds).
270 *Compendium of citrus disease*. St. Paul: APS Press, 1988. pp.10-12.
- 271 KOTZÉ, J. M. Epidemiology and control of citrus black spot in South Africa. *Plant Disease*
272 65:945-50. 1981.
- 273 KUPPER, K. C.; BETTIOL, W. ; GOES, A. ; SOUZA, P. S. de & BELLOTTE, J. A. M. .
274 Biofertilizer for control of *Guignardia citricarpa*, the causal agent of citrus black spot. *Crop*
275 *Protection* 25:569-573. 2006.
- 276 LIU, S. D. & BAKER, R. Mechanism of biological control in soil suppressive to *Rhizoctonia*
277 *solani*. *Phytopathology* 70:404-412. 1980.

- 278 McONIE, K. C. Source of infection for black spot of citrus. The South African Citrus Journal
279 5:9. 1965.
- 280 McQUILKEN, M.P.; WHIPPS, J.M. & LYNCH, J.M. Effects of water extracts of a
281 composted manure-straw mixture on the plant pathogen *Botrytis cinerea*. World Journal
282 Microbiology Biotechnology 10:20-66. 1994.
- 283 SANTOS, L. A. C. V. Biofertilizante líquido, o defensivo da natureza. Niterói: EMATER.
284 1992. (Agropecuária Fluminense, 8).
- 285 SPÓSITO, M.B., AMORIM, L., BELASQUE JUNIOR, J., BASSANEZI, R.B. & AQUINO,
286 R. Elaboração e validação de escala diagramática para avaliação da severidade da mancha
287 preta em frutos cítricos. Fitopatologia Brasileira 1:81-85. 2004.
- 288 SWIFT, M.; HEAL, O. W. & ANDERSON, J. M. Decomposition in terrestrial exosystems.
289 Studies in ecology. Blackwell Scientific, Oxford, UK, vol. 5. 1979.
- 290 TIMMER, L. W. Diseases of fruit and foliage. In: Timmer, L.W. & Duncan, L.W. (Eds.)
291 Citrus Health Management. Saint Paul. APS Press. 1999. pp.107-115.
- 292 TRATCH, R. & BETTIOL, W. Efeito de biofertilizante sobre o crescimento micelial e a
293 germinação de esporos de alguns fungos fitopatogênicos. Pesquisa Agropecuária Brasileira
294 32:1131-1139. 1997.
- 295 WILLIAMS, S.T. & DAVIES F.L. Use of antibiotics for selective isolation and enumeration
296 of actinomycetes in soil. Journal of Genetic and Microbioly 38:251-261. 1965.
- 297 YOHALEM, D.S.; NORDHEIM, E.V. & ANDREWS, J.H. The effect of water extracts of
298 spent mushroom compost on apple scab in the field. Phytopathology 86:914-922. 1996.

299 ZHANG, W., DICK, W.A. & HOITINK, H.A.J. Compost-induced systemic acquired
300 resistance in cucumber to *Pythium* root rot and anthracnose. *Phytopathology* 86:1066-1070.
301 1996.

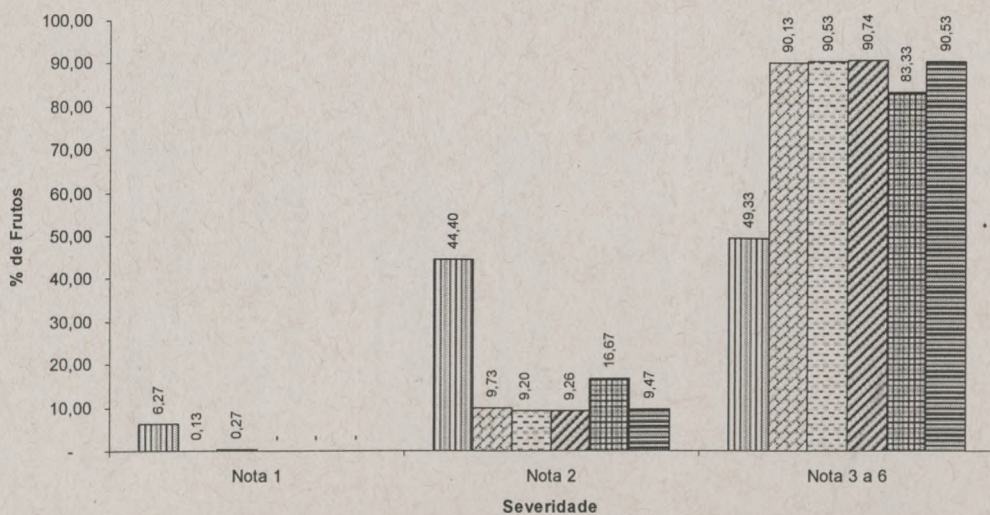


B



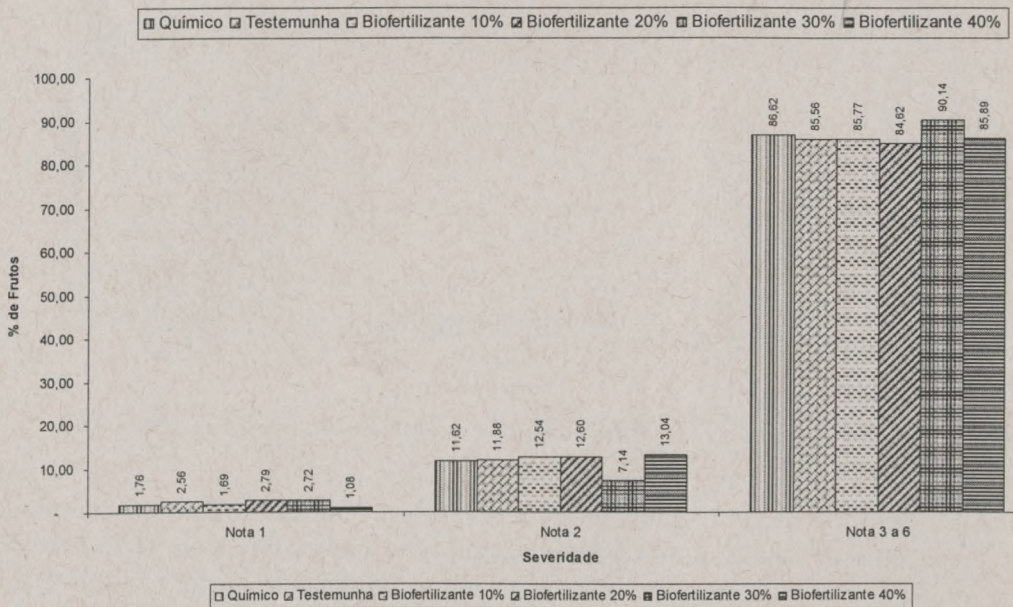
303
304 **Figura 1.** Efeito do biofertilizante Microgeo na severidade (Índice de Doença) da pinta preta
305 dos frutos cítricos, causada por *Guignardia citricarpa*, em frutos de laranja
306 'Valência' nas safras A) 2003/2004 e B) 2004/2005. Médias seguidas pela mesma
307 letra não diferem estatisticamente entre si (Tukey 5%).
308

309



A

310

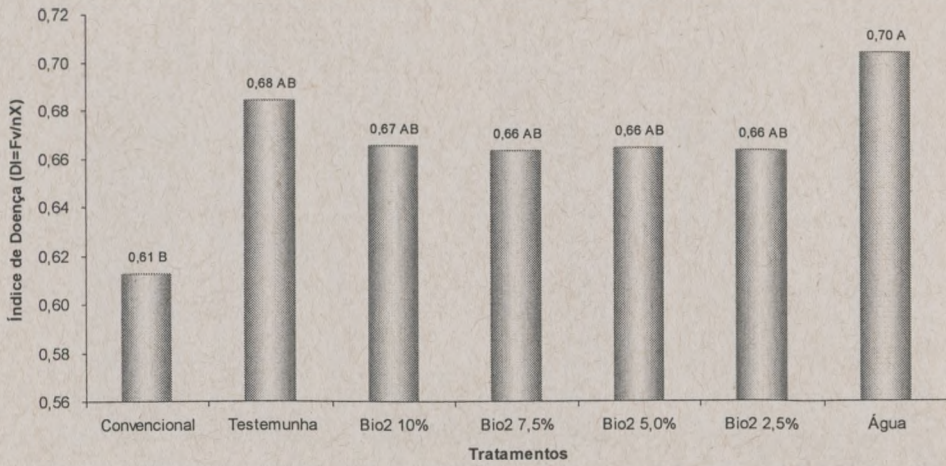


B

311

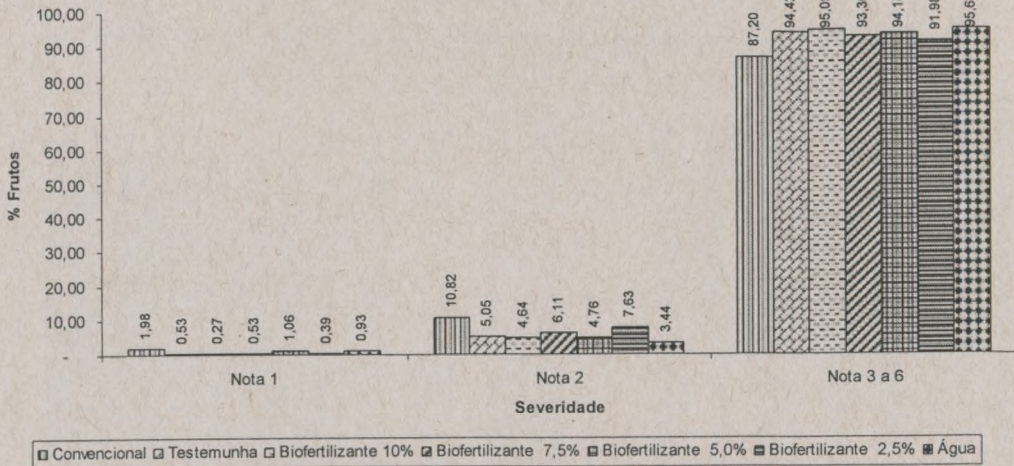
312 **Figura 2.** Efeito do biofertilizante Microgeo® na severidade da pinta preta (% de frutos com
 313 notas 1, 2 e 3 a 6) causada por *Guignardia citricarpa* em frutos de laranja
 314 'Valência' nas safras A) 2003/2004 e B) 2004/2005.

315



A

316



B

317

318

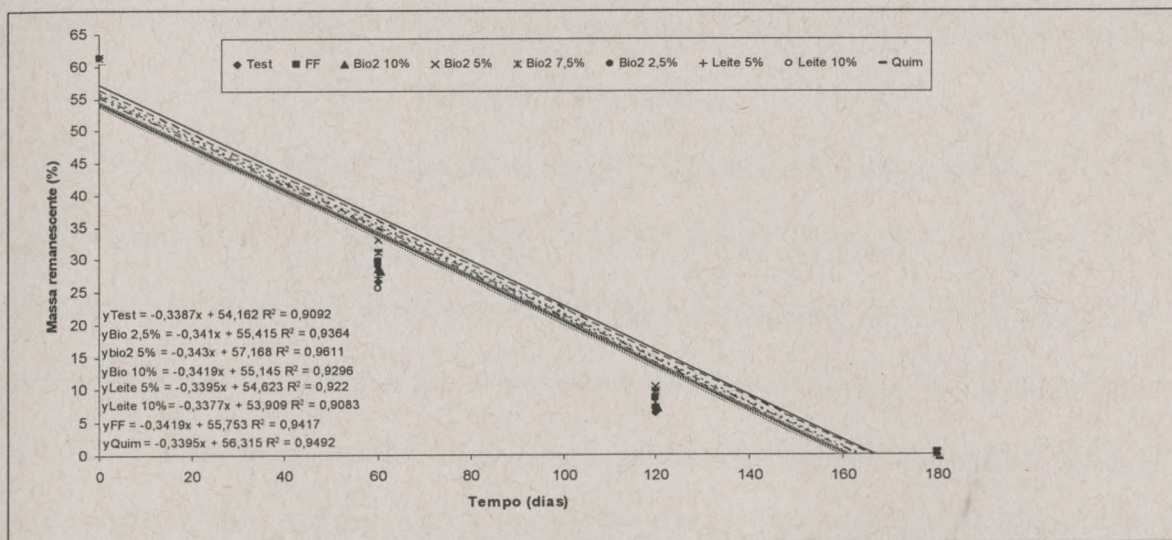
319

320

321

322

Figura 3. Efeito do biofertilizante Bio2 na severidade (Índice de Doença) da pinta preta dos frutos cítricos, causada por *Guignardia citricarpa*, (A) e na % de frutos com notas 1, 2 e 3 a 6 (B) em frutos de laranja 'Valência' na safra 2004/2005. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si (Tukey 5%)



323

324 **Figura 4.** Efeito do biofertilizante Bio2, leite e FishFértil® na velocidade de decomposição
 325 de folhas cítricas.

326

1 **Controle biológico de *Guignardia citricarpa* e *Penicillium digitatum* em pós-colheita de**
2 **laranja 'Pêra' orgânica**

3 **Eduardo R. A. Bernardo¹; Tiago D. Zucchi²; Wagner Bettiol³**
4

5 ¹Faculdade de Ciências Agronômicas, UNESP, Departamento de Proteção de Plantas, Rua
6 José Barbosa de Barros, nº 1780, CEP 18610-307, Botucatu, SP, Brasil, e-mail:
7 erabernardo@hotmail.com; ²Centro de Pesquisas Biotecnológicas, Universidade de São Paulo,
8 Av. Prof. Lineu Prestes, 1374, 05508-900, São Paulo, SP, Brasil. e-mail:
9 tdzucchi@terra.com.br; ³Embrapa Meio Ambiente, CP 69; 13820-000 Jaguariúna, SP, Brasil.
10 e-mail: bettiol@cnpma.embrapa.br
11

12 Autor para correspondência: Eduardo Roberto de Almeida Bernardo
13

14 Bernardo, E. R. A.; Zucchi, T.D. & Bettiol, W. Controle biológico de *Guignardia citricarpa* e
15 *Penicillium digitatum* e em pós-colheita de laranja 'Pêra' orgânica.
16

17 **RESUMO**

18 O presente trabalho avaliou o efeito de *Bacillus subtilis*, *Paenibacillus lentimorbus* e
19 *Streptomyces* sp. na redução da incidência de *Guignardia citricarpa* e no controle de
20 *Penicillium digitatum* em pós-colheita de frutos de laranja 'Pêra' orgânica. No estudo com
21 *Guignardia citricarpa*, foram utilizados frutos naturalmente infestados com o patógeno no
22 campo que apresentavam sintomas da doença. Os frutos foram mergulhados, separadamente,
23 por 5 minutos, na suspensão contendo 1×10^8 ufc/mL, de *P. lentimorbus*, *B. subtilis* e

24 *Streptomyces* sp. e incubados à $25^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$. Os frutos foram avaliados contando-se as lesões
25 antes e após o tratamento. Para *P. digitatum* foram realizados três ferimentos nos frutos (0,5
26 mm de diâmetro x 10 mm de profundidade) e depositados 50 μL da suspensão de *P. digitatum*
27 (1×10^5 conídios/mL). Os tratamentos foram feitos aplicando-se os agentes de controle (1×10^8
28 cfu/mL) 24h antes, após e simultaneamente à inoculação do patógeno. Foram avaliadas a
29 incidência e a severidade da doença em cada ponto de inoculação. Os tratamentos foram
30 comparados com as testemunhas, com e sem inoculação do patógeno, e com o fungicida
31 thiabendazole (1500 $\mu\text{g/mL}$). Para *G. citricarpa* não foram verificadas diferenças significativas
32 entre os tratamentos quando comparados com a testemunha. Por outro lado, todos os
33 tratamentos reduziram severidade e a incidência de *P. digitatum*, com destaque para *B. subtilis*
34 e *Paenibacillus* sp. que não permitiram o estabelecimento do patógeno quando aplicados 24h
35 antes ou simultaneamente ao patógeno.

36 **Palavras chave:** *Citrus sinensis*, *Phylosticta citricarpa*, controle alternativo, bolor
37 verde, pinta preta dos citrus, controle biológico.

38 ABSTRACT

39 Biological control of *Guignardia citricarpa* and *Penicillium digitatum* in post-harvest of
40 organic orange fruits 'Pêra'.

41 This work evaluated the effect of *Bacillus subtilis*, *Paenibacillus lentimorbus* and
42 *Streptomyces* sp. in control of *Guignardia citricarpa* and *Penicillium digitatum* in post-harvest
43 of organic orange fruits. In the study with *Guignardia citricarpa*, were used fruits with natural
44 occurrence of disease in field. The fruits were dived, separately, per 5 minutes, in a suspension
45 (1×10^8 cfu/mL) of *P. lentimorbus*, *B. subtilis* and *Streptomyces* sp. The fruits were evaluated
46 counting the injuries before and after the treatment. The *P. digitatum* experiments were carried
47 through three wounds on the fruits (0,5 mm of diameter x 10 mm of depth) and deposited
48 50 μ L of the suspension of *P. digitatum* (1×10^5 conidia/mL). The treatments were made
49 applying the agents of control (1×10^8 cfu/mL) 24h before, after and simultaneously
50 inoculation of the *P. digitatum*. The incidence and the severity of the disease in each point of
51 inoculation were evaluated. The treatments were compared with the control, with and without
52 inoculation of the *P. digitatum*, and with the fungicide thiabendazole (1500 μ g/mL). For *G.*
53 *citricarpa* were not verified significant differences between the treatments when compared
54 with the control. On the other hand, all the treatments reduced severity and the incidence of *P.*
55 *digitatum*, with prominence for *B. subtilis* and *P. lentimorbus*, which had not allowed the
56 establishment of the *P. digitatum* when applied 24h before or simultaneously.

57 **Key Words:** *Citrus sinensis*, *Phylosticta citricarpa*, Citrus black spot, green mold,
58 alternative control, biological control.

59
60

61

62 INTRODUÇÃO

63 O Brasil é o maior produtor de laranja e o maior exportador de suco (Citrusfeat, 2001;
64 Pollack, 2001). Dentre as variedades plantadas, a laranja 'Pêra' representa 41% do total, sendo
65 comercializada principalmente *in natura* (Amaro & Maia, 1997). Dentre as doenças mais
66 importantes em pós-colheita, destacam-se a pinta preta, causada por *Guignardia citricarpa*, e
67 os bolores, causados pelo fungo *Penicillium* spp. (Franco & Bettioli, 2002).

68 A pinta preta dos citros é responsável por consideráveis perdas em pomares cultivados
69 no estado de São Paulo, provocando a queda prematura dos frutos, com severas reduções na
70 produtividade (Timmer, 1999). Os sintomas restringem-se ao flavedo dos frutos (Cardoso
71 Filho, 2003), não alterando a qualidade, sendo possível sua utilização na produção de suco
72 concentrado (Aguilar-Vildoso *et al.*, 2002). Entretanto, mesmo após tratamento e rigorosa
73 seleção dos frutos, os sintomas ocorrem no transporte, no armazenamento e no destino final.
74 No caso da pinta preta, além da importância na redução da produção, a doença apresenta
75 barreiras quarentenárias o que limita o setor (Noronha, 2002).

76 No caso dos bolores, os mais comuns são o bolor verde e azul, sendo o verde o mais
77 freqüente nas regiões produtoras do Brasil (Feichtenberguer *et al.*, 1997). Para essa doença,
78 em pós-colheita recomenda-se aplicações de thiabendazole e imazalil (Fischer *et al.*, 2004).

79 Como métodos gerais para o controle de doenças em pós-colheita, incluem-se os
80 físicos (temperatura, modificação de atmosfera, radiação), químicos (sanificantes e fungicidas
81 de contato/sistêmicos), biológicos (antagonistas) e alternativos (produtos naturais, indutores de
82 resistência, etc.) (Benato, 1999). Os problemas relacionados ao uso de fungicidas, como
83 contaminação alimentar, impactos negativos ao ambiente e restrições de ordem pública e
84 econômica, tem estimulado a busca de novas formas de controle de doenças de plantas, e

85 dentre essas encontra-se a utilização de agentes de biocontrole e de produtos alternativos.
86 Além disso, no cultivo orgânico, cuja procura por produtos é crescente, os problemas com
87 essas doenças são altos, havendo necessidade de desenvolvimento de produtos e técnicas
88 alternativas para a otimização da produção.

89 Nos últimos anos, o uso indiscriminado de agrotóxicos tem levado a um aumento da
90 percepção pública com relação aos danos que essas moléculas podem causar aos seres
91 humanos e ao ambiente (Bechor *et al.*, 2002; Zucchi *et al.*, 2005). Neste contexto, o controle
92 biológico de fitopatógenos mostra-se como uma alternativa viável para diminuir os riscos
93 relacionados aos fungicidas (Cook, 2000).

94 O presente trabalho teve por objetivo avaliar o potencial de agentes de controle
95 biológico na redução *G. citricarpa* e *Penicillium digitatum* em pós-colheita em frutos de
96 laranja 'Pêra' orgânica.

98 MATERIAL E MÉTODOS

99 Os agentes de controle utilizados são provenientes do banco de organismos da
100 Embrapa Meio Ambiente. Para multiplicação de *Bacillus subtilis* (AP3), *Paenibacillus*
101 *lentimorbus* (Cont-1) e *Streptomyces* sp. (ASBV-1), a partir de cultura pura mantidas em
102 placas contendo BDA, colônias foram raspadas com alça e a suspensão obtida foi transferida
103 para erlenmeyer contendo 500 mL de meio de cultura LB (Sambrook *et al.*, 1989). Os
104 erlenmeyers foram mantidos em agitação a 180 rpm/min e temperatura ambiente por 72 horas.
105 Decorrido esse período, 100 mL do caldo fermentado foi transferido para outros Erlenmeyers
106 contendo 400 mL de LB, que foram submetidos às mesmas condições anteriores. As
107 concentrações de todos os agentes de biocontrole foram ajustadas para 1×10^8 ufc/mL.

108 Para o ensaio com *G. citricarpa*, frutos de laranja 'Pêra' orgânica foram selecionados
109 de acordo com a quantidade de doença presente, sendo escolhidos os que apresentavam
110 poucos sintomas. *P. digitatum* foi isolado de laranja 'Pêra' com sintomas de bolor verde. O
111 isolamento foi feito direto das lesões transferindo-se os conídios para meio de cultura BDA.
112 Em seguida, foram incubadas até o aparecimento das colônias. Para os ensaios, a concentração
113 do patógeno foi ajustada para 1×10^5 conídios/mL.

114 No ensaio com *G. citricarpa*, não foi realizada inoculação artificial, mas foram
115 utilizados frutos naturalmente infestados no campo e apresentando sintomas da doença. Após
116 a desinfestação superficial, os frutos foram mergulhados, separadamente, por 5 minutos em
117 suspensão contendo 1×10^8 cfu/mL de *P. lentimorbus*, *B. subtilis* e *Streptomyces* sp. Em
118 seguida, os frutos foram dispostos sobre papel absorvente ao ar livre para a secagem. Depois
119 de secos, foram acondicionados em bandejas de papelão e incubados à $25^\circ\text{C} \pm 2$ e umidade
120 relativa média de 78%. Foi realizada uma avaliação inicial e a cada 4 dias fez-se a contagem
121 de novas lesões que surgiam nos frutos. Para cada tratamento foram utilizados 10 frutos,
122 considerados uma repetição. Ao final de 16 dias foram realizadas avaliações da evolução da
123 doença em relação à avaliação inicial.

124 No ensaio com *P. digitatum*, frutos maduros de laranja 'Pêra' orgânico, foram
125 desinfestados superficialmente pela imersão em solução de hipoclorito de sódio (0,5%)
126 durante três minutos, em seguida, lavados duas vezes em água destilada e dispostos sobre
127 papel absorvente ao ar livre para a secagem. Para a inoculação de *P. digitatum* foram
128 realizados ferimentos (0,5mm de diâmetro x 0,3mm de profundidade), onde foi removido o
129 flavedo, em três pontos equidistantes na região equatorial dos frutos. Após essa etapa, em cada
130 ferimento, foram depositados 50µL da suspensão de conídios (1×10^5 conídios/mL) com

131 auxílio de uma micropipeta. Os tratamentos foram os mesmos utilizados no ensaio de *G.*
132 *citricarpa* e adicionalmente foi incluído o fungicida thiabendazole (1500µg/mL). Os agentes
133 de biocontrole foram aplicados preventivamente (24h antes da inoculação do patógeno),
134 simultaneamente à inoculação do patógeno e de forma curativa (24h após a inoculação do
135 patógeno). Foram avaliadas a incidência e a severidade (%Severidade = Diâmetro médio das
136 lesões/altura média dos frutos x 100) em cada ponto de inoculação (Franco & Bettiol, 2002).
137 Todos os produtos foram comparados com as testemunhas, com e sem inoculação do
138 patógeno, e com o fungicida.

140 RESULTADOS E DISCUSSÃO

141 Apesar de reduções no número de lesões de *G. citricarpa* em até 30% em relação à
142 testemunha, essas diferenças não foram significativas (Tabela 1). Mesmo com esses
143 resultados, esse fato não descarta esses agentes como potenciais para o controle biológico em
144 pós-colheitas, visto que *Bacillus* tem mostrado eficiência no controle de várias doenças em
145 pós-colheita (Florjanowicz, 2001; Janisiewicz & Jeffers, 1997).

146 *Penicillium digitatum* foi controlado totalmente quando *P. lentimorbus* e *B. subtilis*
147 foram aplicados simultaneamente à inoculação do patógeno, o mesmo ocorrendo com a
148 aplicação do fungicida. Entretanto, para *Streptomyces* observou-se uma severidade de 59,34%
149 e uma incidência de 8,33% (Tabelas 2 e 3). Aplicando-se os agentes de controle 24h após a
150 inoculação de *P. digitatum*, os resultados foram semelhantes aos obtidos com a aplicação
151 simultânea. Dessa maneira, thiabendazole, *P. lentimorbus* e *B. subtilis* não permitiram o
152 estabelecimento do patógeno, enquanto que para *Streptomyces* sp. houve aumento de

153 eficiência quando aplicado de forma curativa. Esse resultado pode ser atribuído a um
154 desenvolvimento mais lento desse organismo em relação às demais.

155 Os agentes de biocontrole, quando foram aplicados antes da inoculação de *P.*
156 *digitatum*, reduziram a severidade da doença. Entretanto, thiabendazole não permitiu o
157 estabelecimento do patógeno e não foi observada incidência do patógeno nos frutos (Tabelas 2
158 e 3). Dentre os agentes de controle, a menor severidade da doença foi constatada para *P.*
159 *lentimorbus* (50%), seguido por *B. subtilis* (61,09%) e *Streptomyces* sp. (72,96%), com
160 incidência do patógeno de 25, 25 e 100%, respectivamente (Tabelas 2 e 3).

161 Assim, em todos os momentos de inoculação, os agentes de controle biológico
162 reduziram em maior ou menor grau a severidade e a incidência da doença nos frutos. Franco &
163 Bettioli (2000), utilizando *B. subtilis* em inoculação conjunta com o patógeno, observaram uma
164 severidade de 52,5% e uma incidência de 70%. Neste trabalho, somente de forma preventiva
165 *B. subtilis* permitiu o estabelecimento da doença (severidade de 69,0% e incidência de 25%)
166 (Tabelas 2 e 3).

167 Provavelmente, para todos os organismos avaliados não esteja ocorrendo um só
168 mecanismo de ação por parte dos antagonistas na redução da doença. Produção de enzimas
169 líticas e/ou antibióticos, competição por nutrientes e espaço e parasitismo podem estar
170 associados, havendo necessidade de maiores estudos em condições de armazenamento e
171 transporte, pois estudos mostram que o controle biológico de *P. digitatum* em pós-colheita de
172 citrus é viável (Droby *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 1992; Wilson & Chalutz, 1989).

173

174

175

176

177 **Tabela 1.** Efeito de *Paenibacillus lentimorbus*, *Bacillus subtilis* e *Streptomyces* sp. na
 178 evolução do número lesões de *Guignardia citricarpa* em laranja 'Pera' orgânica
 179 em condição de pós-colheita.

Tratamento	% de aumento no número de lesões
<i>P. lentimorbus</i> (10 ⁸ ufc/mL)	84,8 a
<i>B. subtilis</i> (10 ⁸ ufc/mL)	87,7 a
<i>Streptomyces</i> sp.(10 ⁸ ufc/mL)	93,8 a
Testemunha	125,9 a
F	0,65 NS
DMS (Tukey)	28,28
C.V.	35,00

180

Para as análises os dados foram transformados para arc sen raiz x/100. Médias seguidas pela mesma

181

letra, maiúscula na coluna, não diferem estatisticamente entre (Tukey 5%). NS Não significativo.

182 **Tabela 2.** Efeito de *Paenibacillus lentimorbus*, *Bacillus subtilis* e *Streptomyces* sp. na
 183 severidade do bolor verde causado por *Penicillium digitatum* em frutos de laranja
 184 'Pêra' orgânicos.

Tratamento	Severidade		
	Preventivo	Conjunto	Curativo
<i>Paenibacillus lentimorbus</i> (10 ⁸ ufc/mL)	50,0 b	0,0 c	0,0 c
<i>Bacillus subtilis</i> (10 ⁸ ufc/mL)	61,1 ab	0,0 c	0,0 c
<i>Streptomyces</i> sp.(10 ⁸ ufc/mL)	72,9 ab	59,3 b	18,79 b
Testemunha inoculada	100,0 a	100,0 a	100,0 a
Testemunha não inoculada	0,0 c	0,0 c	0,0 c
Thiabendazole (1500 µg/mL)	0,0 c	0,0 c	0,0 c
F	35,96**	160,33 **	105,35 **
DMS (Tukey)	26,0555	12,6935	13,7253
C.V.	41,81	34,89	48,70

186 Para as análises os dados foram transformados para arc sen raiz x/100. Médias seguidas pela mesma letra,
 187 maiúscula na coluna, não diferem estatisticamente entre si (Tukey 1%). (%Severidade = Diâmetro médio das
 188 lesões/altura média dos frutos x 100).

189

190 **Tabela 3.** Efeito de *Paenibacillus lentimorbus*, *Bacillus subtilis* e *Streptomyces* sp na
 191 incidência do bolor verde em frutos de laranja 'Pêra' orgânicos.

192

Tratamento	Incidência (%)		
	Preventivo	Conjunto	Curativo
<i>Paenibacillus lentimorbus</i> (10 ⁸ ufc/mL)	25	0	0
<i>Bacillus subtilis</i> (10 ⁸ ufc/mL)	25	0	0
<i>Streptomyces</i> sp.(10 ⁸ ufc/mL)	100	8,3	50
Testemunha inoculada	100	100	100
Testemunha não inoculada	0	0	0
Thiabendazole 1500 ug/mL	0	0	0

193

194

195

196

REFERÊNCIAS

197

198 AGUILAR-VILDOSO; C. I., RIBEIRO, J. G. B.; FEICHTENBERGER, E.; GOES, A. &

199 SPÓSITO, M.B. **Manual Técnico de Procedimentos da Mancha Preta dos Citros.** Brasília.

200 MAPA/SDA/DDIV. 2002.

201 AMARO, A. A. & MAIA, M. L. Produção e comércio de laranja e de suco no Brasil. Laranja

202 18:1-26. 1997.

- 203 BECHOR, O.; SMULSKI, D. R.; VAN DYK, T. K.; LAROSSA, R. A. & BELKIN, S.
204 Recombinant microorganisms as environmental biosensors: pollutants detection by
205 *Escherichia coli* bearing *fabA'*::lux. J. Biotechnol. 94:125-132. 2002.
- 206 BENATO, E. A. Controle de doenças pós-colheita em frutas tropicais. Summa
207 Phytopathologica 25:90-93. 1999.
- 208 CARDOSO FILHO, J.A. Efeito de extratos de albedo de laranja (*Citrus sinensis*) e dos
209 indutores de resistência ácido salicílico, acilbenzolar-s-metil e *Saccharomyces cerevisiae* no
210 controle de *Phyllosticta citricarpa* (teleomorfo: *Guignardia citricarpa*). Tese de Doutorado.
211 Piracicaba SP. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". 2003.
- 212 CITRUSFEAT. Fresh citrus situation. FASonline. Horticultural & Tropical Products Division.
213 2001(www.faz.usda.gov/htp/circular/2001/10/08/citrusfeat.htm). (16 set. 2002).
- 214 COOK, R. J. Advances in plant health management in the Twentieth century. Annu. Rev.
215 Phytopathol. 38:95-116. 2000.
- 216 DROBY, S.; COHEN, L.; DAUS, A.; WEISS, B.; HOREV, B.; CHALUTZ, E.; KATZ, H.;
217 KEREN-TZUR, M. & SHACHNAI, A. Commercial testing of aspire: a yeast preparation for
218 the biological control of postharvest decay of citrus. Biological Control 12:97-101. 1998.
- 219 FEICHTENBERGER, E.; MULLER, G.W. & GUIRADO, N. Doenças dos citros. In: Kimati,
220 H., Amorim, L., Bergamin Filho, A., Camargo, L.E.A. & Rezende, J.A.M. (Ed.). Manual de
221 Fitopatologia v.2. São Paulo. Editora Ceres. 1997. pp.261-296.
- 222 FISCHER, I.H. & SPÓSITO, M.B.; LOURENÇO, S.A.; AMORIM, L. Eficiência dos
223 fungicidas thiabendazole + imazalil, aplicados previamente ou em mistura à cera, no controle
224 do bolor verde em citros. Brazilian Journal of Plant Physiology 16:22. 2004. (Resumo)

- 225 FLORIANOWICZ, T. Antifungal activity of some microorganisms against *Penicillium*
226 *expansum*. European Food Research Technology, Berlin, v.212, n.3, p.282-286, 2001.
- 227 FRANCO, D. A. S. & BETTIOL, W. Controle do bolor verde em pós-colheita de citros com
228 produtos alternativos. Embrapa Meio Ambiente. 2000. (Comunicado Técnico n.10).
- 229 FRANCO, D. A. S. & BETTIOL, W. Efeito de produtos alternativos para o controle do bolor
230 verde (*Penicillium digitatum*) em pós-colheita de citros. Revista Brasileira de Fruticultura 24.
231 2002.
- 232 HUANG, Y.; WILD, B. L. & MORRIS, S. C. Postharvest biological control of *Penicillium*
233 *digitatum* decay on citrus fruit with *Bacillus pumilus*. Ann. Appl. Biol. 120:367-372. 1992.
- 234 JANISIEWICZ, W. J. & JEFFERS, S. N. Efficacy of commercial formulation of two
235 biofungicides for control of blue mold and gray mold of apples in cold storage. Crop
236 Protection 16:629-633. 1997.
- 237 KAVANAGH, J. A. & WOOD, R. K. S. Green mould of oranges caused by *Penicillium*
238 *digitatum* Sacc.; effect of additives on spore germination and infection. Annals of Applied
239 BiOlogy 67:35-44. 1971.
- 240 MORETTO, K. C. K.; FERNANDES, N. G. & GOES, A. Controle biológico de
241 *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. Fitopatologia
242 Brasileira, 28:251-257. 2003.
- 243 NORONHA, M. A. Escala diagramática para avaliação da mancha preta em folhas de citros e
244 efeito da temperatura e duração do molhamento na pré-penetração dos conídios de *Guignardia*
245 *citricarpa*. 2002. Não paginado.
- 246 POLLACK, S. Forecast for citrus: a mixed bag growers. Agricultural Outlook 287:2-4. 2001.
- 247 SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F. & MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual.
248 2 Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. 1989.

- 249 TIMMER, L. W. Diseases of fruit and foliage. In: Timmer, L. W. & Duncan, L. W. (Ed.).
250 Citrus Health Management. Florida: APS Press, 1999. pp. 107-123.
- 251 WILSON, C. L. & CHALUTZ, E. Postharvest biological control of *Penicillium* rots of citrus
252 with antagonistic yeasts and bacteria. *Sci. hortic.* 40:105-112. 1989.
- 253 ZUCCHI, T. D.; ZUCCHI, F. D.; POLI, P.; MELO, I.T.; ZUCCHI, T. M. A. D. A short-term
254 test adapted to detect the genotoxic effects of environmental volatile pollutants (benzene
255 fumes) using the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *J. Environ. Monit.* 7:598-602.
256 2005.

5 CONCLUSÕES

- Para as condições de cultivo comercial em Conchal, SP, os biofertilizantes testados não foram eficientes no controle de *G. citricarpa*.
- Leite a 5% e *B. subtilis* apresentam potencial para o controle da pinta preta dos frutos cítricos em condições de cultivo orgânico da laranja 'Pêra'.
- *T. harzianum* não foi eficiente no controle da pinta preta em cultivo orgânico.
- *P. lentimorbus*, *B. subtilis* e *Streptomyces* sp. não foram eficientes na redução de *G. citricarpa* em condições de pós-colheita.
- *P. lentimorbus*, *B. subtilis* e *Streptomyces* sp. foram eficientes no controle de *P. digitatum* em pós-colheita.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABECITRUS. Disponível em: http://www.abecitrus.com.br/informativo/nota_receita_jul07.html. Acesso em 17/02/2008.

ABECITRUS. Disponível em: <http://www.abecitrus.com/exporano.html#expofcooj2>. Acesso em 20/05/2007.

AGRIANUAL 2002: **Anuário da agricultura brasileira**. São Paulo: FNP Consultoria e Comércio, 2002. p.285-332.

AGRIANUAL 2003: **Anuário da agricultura brasileira**. São Paulo: FNP Consultoria e Comércio, 2003. 213p.

AGROFIT. Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br>> Acesso em: 22 set. 2007.

AGUILAR-VILDOSO, C.I.; RIBEIRO, J.G.B.; FICHTENBERGER, E.; GOES, A.; SPÓSITO, M.B. **Manual técnico de procedimentos da mancha preta dos citros**. Brasília: MAPA/DAS/DDIV, 2002.

AMARO, A.A., MAIA, M.L. Produção e comércio de laranja e de suco no Brasil. **Laranja**, v.18, n.1, p. 1-26, 1997.

AVERNA-SACCÁ; R. Pústulas pretas sobre laranjas doces produzidas por *Phoma citricarpa*. **Revista de Agricultura**, v.15, p.468-475, 1940.

BAKER, C. J., et al. Inhibitory effect of *Bacillus subtilis* on *Uromyces phaseoli* and on development of rust pustules on bean leaves. **Phytopathology**, v.73, p.1148-1152, 1983.

BASTOS, C. N. Resultados preliminares sobre a eficácia de *Trichoderma viride* no controle da vassoura-de-bruxa (*Crinipellis pernicioso*) do cacauzeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.13, p.340-342, 1988.

BENHAMOU, N., LAFONTAINE, P.J., NICOLE, M. Induction of systemic resistance to fusarium crown and root rot in tomato plants by seed treatment with chitosan. **Phytopathology**, v.84, p.1432-1444, 1994.

BETTIOL, W. Controle de doenças de plantas com agentes de controle biológico e outras tecnologias. In: Campanhola, C; Bettiol, W. **Métodos alternativos de controle fitossanitário**. Jaguariúna: Embrapa, 2003. p.191-215.

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

BETTIOL, W., TRATCH, R.; GALVÃO J.A.H. **Controle de doenças de plantas com biofertilizantes**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, 1998, 22p. 1998.

BETTIOL, W., VARZEA, V.M.P. Controle biológico da ferrugem (*Hemileia vastatrix*) do cafeeiro com *Bacillus subtilis* em condições controladas. **Fitopatologia Brasileira**, v.17, p.91-95, 1992.

BOTEON, M. Cadeia agroindustrial de citros. Centro de estudos avançados em economia aplicada (CEPEA/ESALQ/USP) <http://cepea.esalq.usp.br>, 14p. Acessado em: 21 jan. 2006.

CARISSE, O., et al. Effect of fall application of fungal antagonists on spring ascospore production of the apple scab pathogen, *Venturia inaequalis*. **Phytopathology**, n.90, p.31-37, 2000.

CASTRO, C.M., SANTOS, A.C.V., AKIBA, F. *Bacillus subtilis* isolado do biofertilizante "Vairo" com ação fungistática e bacteriostática a alguns fitopatógenos. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 3, 1992, Jaguariúna, **Anais...** p.291.

CASTRO, C.M., SANTOS, A.C.V., AKIBA, F. Comprovação *in vitro* da ação inibidora do biofertilizante "Vairo" produzido a partir da fermentação anaeróbica do esterco bovino, sobre a germinação de conídios de diversos gêneros de fungos fitopatogênicos. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS DE PLANTAS, 4. 1991, Jaguariúna, **Anais...** p.18.

CITRUSFEAT. **Fresh citrus situation**. **FASonline**. Horticultural & Tropical Products Division. 2001(www.faz.usda.gov/htp/circular/2001/10/08/citrusfeat.htm). (16 set. 2002).

CULLEN, D., BERBEE, F. M., ANDREWS, J.H. *Chaetomium globosum* antagonizes the apple scab pathogens, *Venturia inaequalis*, under field conditions. **Canadian Journal of Botany**, n.62, p.1814-8, 1984.

DUBOS, B., JAILLOUX, F., BULIT, J. Protection du vignoble contre la pourriture grise: les propriétés antagonistes du *Trichoderma* a l'égard du *Botrytis cinerea*. **Les Colloques de L'INRA**, v.11, p.205-219, 1982.

ELAD, Y., SHTINBERG, D. Effect of compost water extracts on grey mould (*Botrytis cinerea*). **Crop Protection**, n.13, p.109-114, 1994.

FALK, S.P., et al. *Fusarium proliferatum* as a biocontrol agent against grape downy mildew. **Phytopathology**, n.86, p.1010-1017, 1996.

FEICHTENBERGER, E., MULLER, G.W., GUIRADO, N. Doenças dos citros. In: KIMATI, H., et al. (Ed.). **Manual de fitopatologia - doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997, v.2, p.261-96.

FEICHTENBERGUER, E.; BASSANEZI, R. B.; SPOSITO, M. B.; BELASQUE Jr. J. Doenças dos citros (*Citrus* spp.) In: KIMATI, H.; AMORIN, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L. E.A. (Ed.) **Manual de Fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v.2, p. 239-270.

FERNANDES, M.C.A. *O biofertilizante Agrobio*. Informativo do Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia, n. 13. EMBRAPA-Agrobiologia, Seropédica, Ano 4, setembro de 2000. In: **A Lavoura**, v.103, n.634, p.42-43, 2000.

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

FISCHER, I. H.; SPÓSITO, M. B.; LOURENÇO, S. A.; AMORIM, L. Eficiência dos fungicidas thiabendazole+imazalil, aplicados previamente ou em mistura à cera no controle do bolor verde em citros. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.16, p.22, 2004 (Suplemento).

FRAVEL, D. Comercial biocontrol products for use against soilborne crop diseases. (<http://www.barc.usda.gov/psi/bdpl/bdplprod/bioproduct.html>). (13 out 1998).

FUNDECITRUS. **Manual de pinta preta**. Araraquara: Fundo Paulista de Defesa da Citricultura, 2000. 7p. (Manual).

FUNDECITRUS. **Manual técnico sobre pinta preta**. Araraquara: Fundo Paulista de Defesa da Citricultura, 1998. 10p. (Boletim Técnico).

GOES, A. de, 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**, n.18, p.138, 1993. (Resumo).

GOES, A. de. Controle da mancha-preta dos frutos cítricos. **Laranja**, v.19, p.305-20. 1998.

GOES, A. de; ANDRADE, A.G.; MORETTO, K.C.K. Efeito de diferentes tipos de óleos na mistura de benomyl + mancozeb no controle de *Guignardia citricarpa*, agente causal da mancha preta dos frutos cítricos. **Summa Phytopathologica**, v.26, p.233-236, 2000.

GOES, A. de; FEICHTENBERGUER, E. Ocorrência da mancha preta causada por *Phyllosticta citricarpa* (McAlp) Van der Aa (*Guignardia citricarpa* Kiely) em pomares cítricos do Estado de São Paulo. In: Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 10, 1993, Aracaju. **Anais...** p.318.

GOES, A. Efeito da combinação de fungicidas sistêmicos e protetores no controle da mancha preta dos frutos cítricos causados por *Guignardia citricarpa*. **Summa Phytopathologica**, v.28, p.9-13, 2002.

GOES, A. Efeito da combinação de fungicidas sistêmicos e protetores no controle da mancha preta dos frutos cítricos causados por *Guignardia citricarpa*. **Summa Phytopathologica**, v.28, p.9-13, 2002.

GOES, A. Mancha preta dos citros: situação atual e perspectivas futuras. **Ciência & Prática**, p.5-7, 2001.

GOES, A.; GRAÇA, J.; 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**, v.15, p.73-75, 1990.

GULLINO, M.L., GARIBALDI, A. Situation actuelle et perspectives d'avenir de la lutte biologique et intégrée contre la pourriture grise de la vigne en Italie. **Colloques de L'INRA**, v.18, p.91-97, 1983.

HAYASHIDA, S.H., et al. Control of potato common scab with an antibiotic biofertilizer produced from swine feces containing *Streptomyces albidoflavus* CH-33. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.53, p.349-354, 1989.

HERBERT, J. A. **Citrus black spot**. Citrus and subtropical fruit research institute, Nelspruit. Citrus, h. 30, 1989.

INBAR, J., CHET, I. The role of recognition in the induction of specific chitinases during mycoparasitism by *Trichoderma harzianum*. **Microbiology**, n.141, p.2823-2829, 1995.

KALITA, P., BORA, L.C., BHAGABATI, K.N. Phylloplane microflora of citrus and their role in management of citrus canker. **Indian Phytopathology**, n.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, 1948, 88p.

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**, n.73, p.249-292, 1948.

KLOTZ, L.J. Fungal, bacterial, and nonparasitic diseases and injuries originating in the seedbed, nursery, and orchard. In: REUTHER, W., CALAVAN, E.C., CARMAN, G.E. (Ed.) **The Citrus Industry**. Riverside: University of California, 1978. p.1-66.

KOTZÉ, J. M. Black spot. In: WHITESIDE, J.O., GARNSEY, S.M., TIMMER, L.W. (Eds). **Compendium of citrus disease**. St Paul: APS Press, 1989. p.10-12.

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

KUPPER, K. C.; GIMENES-FERNANES, N.; GOES, A. Controle biológico de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. 3, 2003

LORITO, M., et al. Synergistic interaction between fungal cell wall degrading enzymes and different antifungal compounds enhances inhibition of spore germination. **Microbiology**, v.140, p.623-629, 1994.

MAUCH-MANI, B.; METRAUX, J. P. Salicylic acid and systemic acquired resistance to plant pathogen attack. **Annals of Botany**, v.82, p. 535-540, 1998.

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

McONIE, K.C. The latent occurrence in citrus and other hosts of a *Guignardia* easily confused with *G. citricarpa*, the citrus black spot pathogen. **Phytopathology**, v.54, p.40-43, 1964a.

McQUILKEN, M.P., WHIPPS, J.M., LYNCH, J.M. Effects of water extracts of a composted manure-straw mixture on the plant pathogen *Botrytis cinerea*. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v.10, p.20-66, 1994.

MEDEIROS, S.A.F., MENEZES, M. Potencial antagonico de alguns fungos a *Colletotrichum gloeosporioides*, agente causal da antracnose do cajueiro, *Anacardium occidentale*. **Fitopatologia Brasileira**, v.19, p.84-91, 1994.

PENTEADO, S.R. 2000. **Controle alternativo de pragas e doenças com as caldas bordalesa, sulfocálcica e Viçosa**. Campinas: Buena Mendes Gráfica e Editora. 95p.

PICCININ, E. Proteção de plantas de sorgo (*Sorghum bicolor*), maracujá azedo amarelo (*Passiflorae edulis*) e eucalipto (*Eucalyptus* spp.) contra fitopatógenos fúngicos e bacterianos por *Saccharomyces cerevisiae*. (Tese). Piracicaba. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo. 1996.

POLLACK, S. Forecast for citrus: a mixed bag growers. **Agricultural Outlook**, n. 287, p.2-4, 2001.

PRATES, H.S.; NOGUEIRA, N.L. Controle químico da pinta preta (*Phyllosticta citricarpa*) em laranjeiras Pêra. **Summa Phytopathologica**, v.23, p.53. 1997 (resumo).

PUSEY, P.L. et al. Compatibility of *Bacillus subtilis* for postharvest control of peach brown rot with comercial fruit waxes, dicloran, and cold-storage conditions. **Plant Disease**, v.70, p.587-590, 1986.

REIS, R. F.; GOES, A.; TIMMER, L.W. Effect of temperature, leaf wetness, and rainfall on the production of the *Guignardia citricarpa* ascospores and on black spot severity on sweet orange. **Fitopatologia Brasileira**, v.31, p. 29-34, 2006.

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

SANTOS, L A.C.V. **Biofertilizante líquido, o defensivo da natureza**. Niterói: EMATER, 1992, 16p. (Agropecuária Fluminense, 8).

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 of spray applications of *Bacillus subtilis* on postbloom drop of citrus. **Phytopathology**, v.86, p.S52, 1996. (Abstract).

SUTTON, B.C., WATERSTON, J.M. *Guignardia citricarpa*, Kew: C.M.I., 1966. 2p. (Descriptions of Pathogenic fungi and bacteria, 85).

TRATCH, R.; BETTIOL, W. Efeito de biofertilizante sobre o crescimento micelial e a germinação de esporos de alguns fungos fitopatogênicos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.32, p.1131-1139, 1997.

TRONSMO, A., DENNIS, C. The use of *Trichoderma* species to control strawberry fruit rots. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, v.83, p.449-455, 1977.

WELTZIEN, H.C.; KETTERER, N. Control of downy mildew, *Plasmopara viticola* (de Bary) Berlese et de Toni, on grapevine leaves through water extracts from composted organic wastes. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.116, p.186-188, 1986.

WELTZIEN, H.C. Some effects of composted organic materials on plant health. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v.27, p.439-446, 1989.

YOHALEM, D.S., NORDHEIM, E.V., ANDREWS, J.H. The effect of water extracts of spent mushroom compost on apple scab in the field. **Phytopathology**, v.86, p.914-922, 1996.

ZHANG, W., DICK, W.A., HOITINK, H.A.J. Compost-induced systemic acquired resistance in cucumber to *Pythium* root rot and anthracnose. **Phytopathology**, v.86, p.1066-1070, 1996.

