

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

RAFAELE REGINA MOREIRA

Bacillus spp. E *Pseudomonas* sp. NO BIOCONTROLE DE *Colletotrichum* DO GRUPO *acutatum*, CAUSADOR DA MANCHA FOLIAR DE GLOMERELLA EM MACIEIRA

CURITIBA

2013

RAFAELE REGINA MOREIRA

Bacillus spp. E *Pseudomonas* sp. NO BIOCONTROLE DE *Colletotrichum* DO GRUPO *acutatum*, CAUSADOR DA MANCHA FOLIAR DE GLOMERELLA EM MACIEIRA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora:
Profa. Dra. Louise Larissa May-De Mio

CURITIBA

2013



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
AGRONOMIA - PRODUÇÃO VEGETAL



PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal, reuniram-se para realizar a arguição da Dissertação de MESTRADO, apresentada pela candidata **RAFAELE REGINA MOREIRA**, sob o título "**Bacillus spp. E Pseudomonas sp. NO BIOCONTROLE DE Colletotrichum DO GRUPO acutatum, CAUSADOR DA MANCHA FOLIAR DE GLOMERELLA EM MACIEIRA**", para obtenção do grau de Mestre em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná.

Após haver analisado o referido trabalho e argüido a candidata são de parecer pela "**APROVAÇÃO**" da Dissertação.

Curitiba, 08 de Agosto de 2013.

Professora Dra. Louise Larissa May De Mio
Coordenadora do Programa

Dr. Marcelo Augusto Boechat Morandi
Primeiro Examinador

Professor Dr. Cristiano Nunes Nesi
Segundo Examinador

Dra. Luciane Cristina Rozwalka
Terceira Examinadora

Professora Dra. Louise Larissa May De Mio
Presidente da Banca e Orientadora

À Deus.

Por estar sempre ao meu lado, guiando meu caminho.

Aos meus pais, João e Enedina, e à minha irmã, Renata.

Pelo amor e apoio em todos os momentos.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus que ilumina meu caminho e conforta meu coração nos momentos difíceis.

À minha mãe, Enedina, que sempre me orientou com amor, e me fez acreditar na educação como o maior dos bens.

Ao meu pai, João, por ser carinhoso, por me apoiar a desenvolver pesquisa e demonstrar orgulho da minha trajetória.

À minha irmã e melhor amiga, Renata, pela confiança e apoio incondicional em todos os momentos da minha vida.

Aos meus avós, pelo carinho imenso e exemplo de dedicação e trabalho.

Às minhas madrinhas, Margarida e Clemir, por estarem sempre presentes na minha vida e por todo o carinho.

Ao meu namorado, Alexandre, pelo carinho, companheirismo e, sobretudo, pelo respeito aos meus sonhos e objetivos.

À minha família, por estar sempre ao meu lado e pelo carinho.

Aos meus queridos amigos Renata Pinho, Camila da Luz, Bruno Socher e Bruno Nagalli, pela grande amizade e pelos momentos de descontração.

Ao amigo Fabiano André Ferreira, por sempre demonstrar interesse pelo trabalho que desenvolvi e por me incentivar a continuar.

À Professora orientadora Louise Larissa May De Mio, pela paciência, atenção e confiança transmitidas na elaboração deste trabalho e pelos ensinamentos que muito contribuíram para minha formação.

Aos professores da Pós-Graduação em Agronomia, Produção Vegetal, pelos ensinamentos.

À secretária do PGAPV, Sra. Lucimara Antunes, pelo auxílio, disposição e dedicação.

Aos atuais e ex-colegas de laboratório, em especial, Vânia Portes Kulka, Marcos Dolinski, Ligia Kowata, Gabriel Ferreira, Natasha Hamada, Cristiano Nesi, Renato Blood, Giselda Alves, Eliane Rogovski, Ana Cláudia Klosowski e Paulo Lichtemberg, pelo entusiasmo e amizade.

Aos estagiários: Fernando, Josiane, Leonardo, João Paulo e Carlos, pela colaboração e companheirismo.

À Dra. Luciane Roswalka, pela amizade, críticas construtivas e sugestões.

Aos funcionários do departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, pela prestação de serviços e amizade, em especial, Maria Emília, Cléia, Caroline e Nathalya.

Aos produtores Paulo Cosmo e Luiz Filipe Cosmo por cederem a área experimental para realização deste trabalho e ao encarregado Fernando pelo importante auxílio na realização das atividades de campo.

À Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Agrárias e ao curso de Pós-graduação em Produção Vegetal, pela oportunidade de realização deste curso.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

E a todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho, acreditaram em mim e torceram pelo meu sucesso.

O valor de praticar com rigor, por algum tempo, uma *ciência rigorosa* não está propriamente em seus resultados: pois eles sempre serão uma gota ínfima, ante o mar das coisas dignas de saber. Mas isso produz um aumento de energia, de capacidade dedutiva, de tenacidade; aprende-se a *alcançar um fim de modo pertinente*. Neste sentido é valioso, em vista de tudo o que se fará depois, ter sido um homem de ciência.

Nietzsche (1878)

RESUMO

A Mancha Foliar de *Glomerella* (MFG), causada por espécies de *Colletotrichum*, é a principal doença de verão da cultura da macieira, ocasionando sintomas em folhas e frutos e prejudicando a produção do ano subsequente à sua ocorrência devido à intensa desfolha que provoca nas plantas. A pulverização com fungicidas de ação preventiva é o método mais utilizado para o controle da MFG, no entanto, quando a pressão do inóculo é muito alta é necessário aumentar a frequência de aplicação. Este grande número de pulverizações vem apresentando várias desvantagens, como exemplo, a ocorrência de microrganismos resistentes, o desequilíbrio ambiental e o acúmulo de substâncias nocivas no solo, água e alimentos. Uma alternativa seria a introdução de agentes de biocontrole como bactérias que habitam o filoplano da planta. Estes microrganismos possuem um grande potencial pois já estão adaptados as condições ambientais adversas que poderiam afetar seu desenvolvimento e multiplicação na superfície da planta. Diante disso, o objetivo geral deste estudo foi estudar o modo de ação de isolados bacterianos do filoplano da macieira e do produto comercial Serenade® sobre *Colletotrichum* spp. e sua interferência nos componentes do monociclo e controle da MFG em plantas inoculadas e sob pressão de inóculo natural. Para o estudo do modo de ação dos isolados bacterianos sobre *Colletotrichum* do grupo *acutatum* foram realizados ensaios de germinação de conídios, de pareamento de culturas e ensaios para avaliar a ação de metabólitos termoestáveis e de compostos antifúngicos voláteis. A influência dos isolados bacterianos no monociclo da MFG foi estudado em mudas de macieira da cultivar 'Gala' previamente tratadas e posteriormente inoculadas com *Colletotrichum* do grupo *acutatum*. O potencial dos isolados no campo, para controle da MFG, foi testado em pomar experimental inoculado com o patógeno e em pomar comercial sob pressão do inóculo natural. Os isolados bacterianos obtidos do filoplano da macieira foram identificados como: *Pseudomonas putida*, *Bacillus* sp. e *Bacillus alcalophilus*. O modo de ação variou entre os isolados, sendo que os antagonistas do gênero *Bacillus* apresentaram potencial *in vitro* para o controle de *Colletotrichum* do grupo *acutatum*. O efeito dos isolados no monociclo da MFG foi observado através de diferenças significativas nos parâmetros epidemiológicos da doença. Os isolados bacterianos e Serenade® não apresentaram potencial, nas condições estudadas, para controle da MFG quando pulverizados em pomar experimental e comercial.

Palavras-chave: *Malus domestica*. Antagonismo. Microrganismos epifíticos.

ABSTRACT

The Glomerella leaf spot (GLS) is caused by *Colletotrichum* species and is the main disease of summer apple crop, causing symptoms on leaves and fruits and harming the production of the year following its occurrence due to intense defoliation in plants that causes. Spraying with fungicides preventive action is the most common method used to control the GLS, however, when the pressure inoculum is very high is necessary to increase the frequency of application. This large number of sprays has presented several disadvantages, for example, the occurrence of resistant organisms, environmental imbalance and the accumulation of harmful substances in soil, water and food. An alternative would be the introduction of biocontrol agents such as bacteria that inhabit the phylloplane plant. These microorganisms have great potential because they are already adapted to the harsh environmental conditions that could affect their development and multiplication in the plant surface. Therefore, the objectives of this research was to study the mode of action of bacterial isolates from the phylloplane of the apple tree and the commercial product Serenade ® on *Colletotrichum* spp. and interference components in the unicycle and control of MFG in inoculated plants and natural inoculum pressure. To study the mode of action of bacterial isolates on *Colletotrichum acutatum* complex tests were performed conidial germination, pairing of cultures and tests to evaluate the action of thermostable metabolites and antifungal volatile compounds. The influence of bacterial isolates in the monocycle GLS was studied in seedlings of apple cultivar 'Gala' previously treated and subsequently inoculated with *Colletotrichum acutatum* complex. The potential of the isolates in the field to control the GLS, was tested in experimental orchard inoculated with the pathogen and orchard under natural inoculum pressure. The bacterial isolates were identified as *Pseudomonas putida*, *Bacillus* sp. and *Bacillus alcalophilus*. The mode of action varied among isolates, and antagonists of the genus *Bacillus* showed potential *in vitro* control of *Colletotrichum acutatum* complex. The effect of the isolated monocycle of GLS was observed through epidemiological differences in parameters of disease. The bacterial isolates and Serenade ® showed no potential on the conditions studied, to control MFG when sprayed in experimental and commercial orchards.

Keywords: *Malus domestica*. Antagonism. Epiphytic microorganisms.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Sintomas de Mancha Foliar de *Glomerella* em folhas (A) e em frutos (B) de macieira da cv. Gala (*Malus domestica*). Fonte: O autor (2011).....21

CAPÍTULO 1 - MODO DE AÇÃO DE *Bacillus* spp. E *Pseudomonas* sp. COMO INIBIDORES DE *Colletotrichum* DO GRUPO *acutatum* E INTERFERÊNCIA NOS COMPONENTES DO MONOCICLO DA MANCHA FOLIAR DE GLOMERELLA

Figura 1 - Sequência parcial do operon ribossomal 16S do isolado C02 obtido do filoplano da macieira.....56

Figura 2 - Árvore filogenética demonstrando as relações evolutivas entre a sequência parcial do gene RNA ribossomal 16S do isolado C02 obtido do filoplano da macieira e sequências de linhagens de microrganismos relacionados presentes nas bases de dados RDP e GenBank.....56

Figura 3 - Fragmentos amplificados por PCR utilizando os oligonucleotídeos CaInt2 e ITS4 observados em gel de agarose 1,5%. Amostras 1 e 2 referentes ao isolado Col165, BR - controle negativo sem DNA, M - marcador molecular 100 pb.....57

Figura 4 - Árvore filogenética, usando o algoritmo neighbor-joining de espécies do Complexo *C. acutatum* e o isolado Col01 obtido de macieira, baseada nas sequências da região ITS1–5.8S–ITS2 do rDNA. Valores de bootstrap são mostrados nos baseados em 10.000 repetições.....58

Figura 5 - Relações filogenéticas entre o isolado Col01 obtido de macieira e demais espécies do Complexo *C. acutatum* estudadas com base na máxima parcimônia. Valores acima do ramos representam os valores de suporte de bootstrap.....59

Figura 6 - Número de lesões de mancha foliar de *Glomerella* (MFG) observadas em mudas de macieira 'Gala' pulverizadas com antagonistas biológicos semanalmente durante cinco semanas e inoculadas com dois isolados de *Colletotrichum* do grupo *acutatum* (Col01 e Col156). Mudas mantidas em câmara de crescimento conviron a 25 °C. Avaliações realizados diariamente durante 12 dias. (A) dados do experimnto 1, (B) dados do experimento 2. Curitiba/PR.....61

Figura 7 - Período de incubação (PI) médio da MFG em mudas de macieira 'Gala' tratadas com antagonistas biológicos semanalmente durante cinco semanas e inoculadas com isolado de *Colletotrichum* do grupo *acutatum* (Col01). Mudas mantidas em câmara de crescimento conviron a 25 °C.....63

Figura 8 - Período de incubação (PI) médio da MFG em mudas de macieira 'Gala' tratadas com antagonistas biológicos semanalmente durante cinco semanas e inoculadas com isolado de *Colletotrichum* do grupo *acutatum* (Col156). Mudas mantidas em câmara de crescimento conviron a 25 °C.....63

Figura 9 - Curvas de progresso da incidência (% de folhas com sintomas) da MFG em mudas de macieira 'Gala' pulverizadas com antagonistas biológicos semanalmente durante cinco semanas e inoculadas com dois isolados de *Colletotrichum* do grupo *acutatum* (Col01 e Col156). Valor 1 no eixo y do gráfico refere-se a 100% de folhas da muda com sintomas. Pontos representam incidência média em 4 mudas, obtidos por avaliação a partir da inoculação do patógeno, e linhas representam o ajuste ao modelo monomolecular. (A) dados do experimnto 1, (B) dados do experimento 2. Curitiba/PR.....64

Figura 10 - Curvas de progresso da severidade da MFG em mudas de macieira 'Gala' pulverizadas com antagonistas biológicos semanalmente durante cinco semanas e inoculadas com dois isolados de *Colletotrichum* do grupo *acutatum* (Col01 e Col156). Severidade representada pelo número de lesões. Pontos representam severidade média em 4 mudas, obtidos por avaliação a partir da inoculação do patógeno, e linhas representam o ajuste ao modelo logístico. (A) dados do experimnto 1, (B) dados do experimento 2. Curitiba/PR.....65

CAPÍTULO 2 - *Bacillus* spp. E *Pseudomonas* sp. NO CONTROLE BIOLÓGICO DA MANCHA FOLIAR DE GLOMERELLA EM MACIEIRA

Figura 1 - Escala diagramática para avaliação da severidade (porcentagem total de área lesionada na folha) da mancha foliar de Glomerella (*Colletotrichum* spp.) em maçã (*Malus domestica*), composta por seis níveis de severidade (KOWATA *et al.*, 2010).....74

Figura 2 - Incidência da mancha foliar de Glomerella (MFG) (A), Severidade da MFG (B), número de folhas em plantas de macieira (C) e precipitação (mm), umidade relativa média (UR%) e temperaturas (T) máxima, média e mínima (D), observadas em pomar experimental pulverizado com antagonistas biológicos. Primeira avaliação (tempo 0) realizada em 19/02/2009 (safra 2008/09) e 22/01/2010 (safra 2009/10). Inoculação das plantas realizada em 10/01/2009 (safra 2008/09) e 10/01/2010 (safra 2009/10). Curitiba/PR.....86

Figura 3 - Incidência da mancha foliar de Glomerella (MFG) (A), Severidade da MFG (B), número de folhas em ramos marcados de macieira (C) e precipitação (mm), umidade relativa do ar média (UR%) e temperaturas (T) máxima, média e mínima (D), observadas em pomar experimental pulverizado com antagonistas biológicos durante a safra 2010/11. Primeira avaliação (tempo 0) realizada em 22/02/2011. Inoculação das plantas realizada em 22/01/2011. Curitiba/PR.....87

Figura 4 - Incidência da mancha foliar de Glomerella (MFG) (A), Severidade da MFG (B) e número de folhas em plantas de macieira (C), observadas em pomar comercial pulverizado com antagonistas biológicos em duas áreas. Primeira avaliação (tempo 0) realizada em 06/01/2012 (área 1 e 2).....90

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1 - MODO DE AÇÃO DE *Bacillus* spp. E *Pseudomonas* sp. COMO INIBIDORES DE *Colletotrichum* DO GRUPO *acutatum* E INTERFERÊNCIA NOS COMPONENTES DO MONOCICLO DA MANCHA FOLIAR DE *GLOMERELLA*

Tabela 1 - Isolado, espécie, índice de similaridade (IS) por cromatografia gasosa, órgão de origem e município de origem de isolados bacterianos obtidos de macieiras da cultivar 'Gala' (*Malus domestica*) para testes de controle biológico da mancha foliar de *Glomerella* em macieira.....56

Tabela 2 - Inibição da germinação de conídios de *Colletotrichum* do grupo *acutatum* (Col01) (%) após 24 horas em contato com antagonistas biológicos em diferentes concentrações.....60

Tabela 3 - Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) de *Colletotrichum* do grupo *acutatum* e crescimento máximo da colônia em cultivo pareado com isolados bacterianos.....60

Tabela 4 - Crescimento máximo da colônia de *Colletotrichum* do grupo *acutatum* cultivado em meio de cultura contendo metabólitos termoestáveis de isolados bacterianos.....60

Tabela 5 - Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) de *Colletotrichum* do grupo *acutatum* e crescimento máximo de colônias sob a influência de compostos voláteis produzidos por isolados bacterianos.....61

Tabela 6 - Incidência final (I_f) e área abaixo da curva do progresso da incidência (AACPinc) em mudas de macieira 'Gala' pulverizadas com antagonistas biológicos semanalmente durante cinco semanas e inoculadas com isolados de *Colletotrichum* pertencentes ao grupo *acutatum* (Col01 e Col 156). Mudas mantidas em câmara de crescimento conviron a 25 °C.....62

Tabela 7 - Severidade final (S_f) e àrea abaixo da curva do progresso da severidade (AACPsev) em mudas de macieira 'Gala' pulverizadas com antagonistas biológicos semanalmente durante cinco semanas e inoculadas com isolados de *Colletotrichum* pertencentes ao grupo *acutatum* (Col01 e Col 156). Mudas mantidas em câmara de crescimento conviron a 25 °C.....62

Tabela 8 - Comparação dos parâmetros epidemiológicos do modelo monomolecular ajustados aos dados de incidência e parâmetros do modelo logístico ajustados aos dados de severidade da MFG em mudas de macieira 'Gala' tratadas com antagonistas biológicos semanalmente durante cinco semanas e inoculadas com isolado de *Colletotrichum* do grupo *acutatum* (Col01). Curitiba/PR.....66

Tabela 9 - Diferenças entre parâmetros epidemiológicos do modelo monomolecular ajustados aos dados de incidência e parâmetros do modelo logístico ajustados aos dados de severidade da MFG em mudas de macieira 'Gala' tratadas com antagonistas biológicos semanalmente durante cinco semanas e inoculadas com isolado de *Colletotrichum* do grupo *acutatum* (Col156). Curitiba/PR.....67

CAPÍTULO 2 - *Bacillus* spp. E *Pseudomonas* sp. NO CONTROLE BIOLÓGICO DA MANCHA FOLIAR DE GLOMERELLA EM MACIEIRA

Tabela 1 - Temperaturas média (T méd), máxima (T máx) e mínima (T mín), umidade relativa do ar média (UR%), volume de precipitação pluviométrica (PP) (mm), número de dias consecutivos com chuva (DCC)¹ e número de dias favoráveis (DF)² para a ocorrência da mancha foliar de Glomerella. Dados relativos a média dos 10 dias anteriores a cada data de avaliação da incidência, severidade e número de folhas em pomar experimental. Curitiba/PR.....88

Tabela 2 - Área abaixo da curva do progresso (AACP) relativa da incidência, da severidade e da desfolha e médias de severidade e incidência máximas da mancha foliar de Glomerella (*Colletotrichum* spp.) em mudas de macieira (*Malus domestica*) de pomar experimental pulverizadas com antagonistas biológicos durante três safras consecutivas. Curitiba/PR...89

Tabela 3 - Temperaturas média (T méd), máxima (T máx) e mínima (T mín), umidade relativa do ar média (UR%), volume de precipitação pluviométrica (PP) (mm), número de dias consecutivos com chuva (DCC)¹, número de dias favoráveis (DF)² a ocorrência da mancha foliar de glomerella (MFG) e número de pulverizações (NP)³ para o controle da MFG. Dados relativos a média entre as datas de avaliação da incidência, severidade e número de folhas em pomar comercial (A1 e A2). Campo Largo/PR.....91

Tabela 4 - Área abaixo da curva do progresso da severidade (AACP sev), da incidência (AACP inc) e do número de folhas (AACP nº de folhas) da mancha foliar de Glomerella (*Colletotrichum* spp.) em plantas de macieira (*Malus domestica*) de pomar comercial pulverizadas com antagonistas biológicos em duas áreas (A1 e A2). Campo Largo/PR.....91

Tabela 5 - Severidade da mancha foliar de Glomerella (*Colletotrichum* spp.) imediatamente anterior a queda da folha (SAQ) em plantas de macieira (*Malus domestica*) de pomar comercial pulverizadas com antagonistas biológicos em duas áreas (A1 e A2). Campo Largo/PR.....92

Tabela 6 - Média do número de lesões, após 17 dias de incubação, causadas por *Colletotrichum* spp. em frutos de maçã 'Gala' desinfestados e não desinfestados, coletados em pomar comercial pulverizado com antagonistas biológicos. Curitiba/PR.....92

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 CULTURA DA MACIEIRA	18
2.1.1 Origem e classificação botânica	18
2.1.2 A cultura no Brasil	18
2.2 MANCHA FOLIAR DE GLOMERELLA	19
2.2.1 Distribuição	19
2.2.2 Etiologia	20
2.2.3 Sintomatologia	20
2.2.4 Ciclo biológico e epidemiologia da doença	21
2.2.5 Controle	22
2.3 CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS EM PLANTAS	23
2.4 BIOCONTROLE DE DOENÇAS DE PLANTAS POR RESIDENTES DO FILOPLANO	24
3 CAPÍTULO I - MODO DE AÇÃO DE <i>Bacillus</i> spp. E <i>Pseudomonas</i> sp. COMO INIBIDORES DE <i>Colletotrichum</i> DO GRUPO <i>acutatum</i> E INTERFERÊNCIA NOS COMPONENTES DO MONOCICLO DA MANCHA FOLIAR DE GLOMERELLA	28
3.1 INTRODUÇÃO	30
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	31
3.2.1 Obtenção e identificação dos isolados bacterianos	31
3.2.2 Obtenção e identificação dos isolados de <i>Colletotrichum</i> spp.	33
3.2.3 Modo de ação de <i>Bacillus</i> sp., <i>Bacillus alcalophilus</i> e <i>Pseudomonas putida</i> contra <i>Colletotrichum</i> spp.	35
3.2.4 Influência de isolados bacterianos no monociclo da mancha foliar de Glomerella	38
3.2.5 Análise dos dados	39
3.3 RESULTADOS	40

3.3.1 Obtenção e identificação dos isolados bacterianos.....	40
3.3.2 Obtenção e identificação dos isolados de <i>Colletotrichum</i> spp.	41
3.3.3 Modo de ação de <i>Bacillus</i> sp., <i>Bacillus alcalophilus</i> e <i>Pseudomonas putida</i>	42
3.3.4 Influência de isolados bacterianos no monociclo da mancha foliar de Glomerella	43
3.4 DISCUSSÃO	44
3.5 CONCLUSÕES.....	49
REFERÊNCIAS.....	50

4 CAPÍTULO II - *Bacillus* spp. E *Pseudomonas* sp. NO CONTROLE BIOLÓGICO DA MANCHA FOLIAR DE GLOMERELLA EM MACIEIRA 69

4.1 INTRODUÇÃO	71
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	72
4.2.1 Biocontrole da mancha foliar de Glomerella em pomar experimental com inoculação	72
4.2.2 Biocontrole da mancha foliar de Glomerella sob condições de pomar comercial e inóculo natural.....	74
4.2.3 Análise dos dados	76
4.3 RESULTADOS	77
4.3.1 Biocontrole da mancha foliar de Glomerella em pomar experimental com inoculação	77
4.3.2 Biocontrole da mancha foliar de Glomerella sob condições de pomar comercial e inóculo natural.....	78
4.4 DISCUSSÃO	79
4.5 CONCLUSÕES	82
REFERÊNCIAS.....	83

5 CONCLUSÕES GERAIS.....	93
REFERÊNCIAS.....	94
APÊNDICE.....	104

1 INTRODUÇÃO GERAL

O cultivo da macieira (*Malus domestica* Borkh) é atualmente uma atividade consolidada no Brasil e de grande importância sócio-econômica, principalmente na região Sul que concentra mais de 99% da área plantada e da produção nacional. No ano de 2011, o município de Vacaria, no Rio Grande do Sul, com 6.500 ha produziu 260.000 t de maçã e as regiões de São Joaquim e Fraiburgo com 7.725 e 2.727 ha em produção, respectivamente, foram as maiores áreas produtoras do país. Nesse mesmo ano, no Estado do Paraná, o município de Palmas se destacou com 15.824 t em 520 ha (IBGE, 2013).

Uma das maiores limitações da cultura, desde o início de sua implantação no país, é a ocorrência de problemas fitossanitários. Entre eles destaca-se a mancha foliar de *Glomerella* (MFG), uma doença que foi observada pela primeira vez em 1983 em pomares de macieira no Brasil (LEITE, TSUNETTA e KISHINO, 1988) e, desde então, sua frequência vem aumentando, e ocorre em praticamente todas as regiões produtoras de maçã no Brasil (BONETI, BECKER e KATSURAYAMA, 2004; HAMADA *et al.*, 2012). A MFG manifesta-se principalmente no verão, quando pode provocar desfolha superior a 75% e como consequência, reduzir drasticamente a produção das plantas no ano seguinte (BECKER, KATSURAYAMA e BONETI, 2000).

A doença em pomares de macieira é muito severa e causa sintomas e danos na 'Gala', a principal cultivar plantada no país (BLEICHER, 2002). Os sintomas iniciais da doença são manchas vermelho-arroxeadas, já visíveis 48 horas após o início da infecção e que evoluem para manchas necróticas. As folhas lesionadas amarelecem e caem precocemente, entre oito a dez dias após o aparecimento dos primeiros sintomas (CRUSIUS *et al.*, 2002).

A MFG é causada por espécies do gênero *Colletotrichum*. Este gênero é responsável por inúmeras doenças em diferentes espécies de plantas cultivadas. Recentemente, Damm *et al.* (2012) e Weir, Johnston e Damm (2012) publicaram uma nova classificação para o gênero *Colletotrichum* por meio de metodologias morfológicas e moleculares, e separaram os isolados em dois grupos: Complexo *acutatum* e Complexo *gloeosporioides*. Bragança (2013), estudando este gênero em isolados obtidos de macieira relatou várias espécies causadoras da MFG, coletadas nas diferentes regiões produtoras dos estados de SP, PR, SC e RS. Este mesmo autor descreveu uma espécie nova, nominada *C. paranaense*.

A pulverização com fungicidas de ação preventiva a cada cinco ou dez dias, ou ainda, quando houver acúmulo de 30 mm de chuvas nos intervalos, é o método mais utilizado para o controle da MFG. Contudo, mesmo com proteção química permanente pode haver perda de controle quando a pressão de inóculo é muito alta (BONETI, BECKER e KATSURAYAMA, 2004).

Este grande número de pulverizações vem apresentando várias desvantagens, como por exemplo, a ocorrência de microrganismos resistentes, o desequilíbrio ambiental e o acúmulo de substâncias nocivas no solo, água e alimentos (TALAMINI e STADNIK, 2004). Uma estratégia para minimizar estas desvantagens é a introdução de agentes de biocontrole ou a utilização de técnicas que estimulem a população de microrganismos presentes no ambiente que controlam o fungo patogênico (SUTTON e PENG, 1993). O controle biológico visa manter um equilíbrio no agrossistema, de modo que o hospedeiro, na presença do patógeno, não sofra danos significativos em função da ação controladora dos organismos não-patogênicos do sistema (TAVARES, 1996).

Nos estudos de biocontrole de fitopatógenos em todo o mundo, os gêneros de bactérias antagonistas de maior prevalência são as *Pseudomonas* do grupo fluorescentes (*P. putida* e *P. fluorescens*), *Bacillus* spp., *Streptomyces* spp. e representantes da família Enterobacteriaceae (CAMPOS SILVA *et al.*, 2008). Existem diversas investigações relatadas na literatura utilizando bactérias do filoplano como agentes de biocontrole de patógenos da parte aérea, nos mais diversos patossistemas, seja para o controle de fungos (GARITA, BUSTAMANTE e SHATTOCK, 1998; ZHANG e YUEN, 2000; KUPPER, GIMENES-FERNANDES e GOES, 2003; FILIPPI *et al.*, 2011) ou bactérias fitopatogênicas (STOCKWELL, JOHNSON e LOPER, 1998; BRAUN-KIEWNICK, JACOBSEN e SANDS, 2000), além de formulações comerciais como Serenade® (Bayer Crop Science) a base de *Bacillus subtilis* para o controle de diversas doenças, inclusive da macieira, como a Podridão Olho-de-boi (*Cryptosporiopsis perennans*) e o Mofo-cinzento (*Botrytis cinerea*).

Microrganismos do filoplano são aqueles que vivem na superfície das plantas e, por dividirem o mesmo espaço com patógenos de parte aérea, tornam-se potenciais agentes de biocontrole (AZEVEDO, SERAFINE e BARROS, 2002). Entretanto, as relações neste microambiente são pouco estudadas e conhecidas (HALLMAN *et al.*, 1997), havendo a necessidade de se realizar estudos relacionados à diversidade destes microrganismos e a sua relação com os patógenos (TROTEL-AZIZ *et al.*, 2008).

Rolleberg (2008), em trabalho pioneiro na cultura da macieira, isolou microrganismos do filoplano de plantas saudáveis, alguns dos quais, capazes de produzir compostos com efeito inibitório ao crescimento do micélio e a germinação de conídios de *Colletotrichum*. Deste trabalho o autor selecionou sete isolados promissores, no entanto, estes não foram identificados e o potencial de controle da MFG no campo não foi estudado com profundidade.

As chances de obtenção de microrganismos efetivamente antagonistas são maiores quando se faz o isolamento do ambiente onde serão usados pois já estão adaptados a sobreviver e crescer nesse local. Para um organismo ser bem sucedido no controle biológico, deve ter a capacidade de se multiplicar e colonizar o filoplano da planta (BLAKEMAN e FOKKEMA, 1982; ANDREWS, 1992). Vários autores isolaram microrganismos da parte aérea de plantas para o biocontrole de doenças da própria planta, como por exemplo, Jiménez *et al.* (1988) e Sandoval, Ambrecht e Granada (1988) do cacaueteiro, Sudo (1989) do coqueiro, Micheref, Silveira e Mariano (1994) do sorgo, Korsten *et al.* (1995) do abacateiro, Mizubuti *et al.* (1995) do feijoeiro, Pabitra *et al.* (1996) do citros, Kong, Kochman e Brown (1997) do girassol; Carrer Filho *et al.* (1999), Halfeld-Vieira, Romeiro e Carrer Filho (2000) e Romeiro *et al.* (2000a) do tomateiro. Entretanto, este tipo de controle ainda é pouco estudado na cultura da macieira.

Na literatura, para biocontrole de doenças em maçã, foram encontrados relatos de controle da sarna da macieira (*Venturia inaequalis* (Cke.) Wint.) por *Athelia bombaciana* (HEYE e ANDREWS, 1983) e por *Microsphaeropsis* spp. e *Trichoderma* sp. (CARISSE *et al.*, 2000) que foram capazes de reduzir em aproximadamente 80% a produção de ascósporos. No entanto, muitos dos estudos refere-se a controle de doenças em pós colheita. Blum (2004) testou a levedura *Cryptococcus laurentii* em frutos de macieira e constatou que este antagonista foi capaz de reduzir podridões causadas por *Penicillium expansum*, *Glomerella cingulata* e *Pezizula malicorticis* tanto quanto os fungicidas testados. Janisiewicz, Tworowski e Kurtzman (2001) testaram oito cepas de *Metschnikowia pulcherrima* contra o mofo azul (*Penicillium expansum* Link) e todas foram capazes de controlar a doença durante o armazenamento.

Com base no contexto descrito, o objetivo geral deste estudo foi estudar o modo de ação de isolados bacterianos do filoplano da macieira e do produto comercial Serenade® sobre *Colletotrichum* spp. e sua interferência nos componentes do monociclo e controle da MFG em plantas inoculadas e sob pressão de inóculo natural.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CULTURA DA MACIEIRA

2.1.1 Origem e classificação botânica

A maçã (*Malus domestica* Borkh) tem suas origens nas montanhas do Cáucaso, Oriente Médio e Leste Asiático. Existem indícios de que a espécie *M. domestica* seja derivada da espécie *M. pumila* Mill., que ocorre naturalmente no leste europeu e oeste asiático ou da espécie *M. sieversii* (Ledeb.) M. Roem, encontrada nas montanhas da Ásia Central (NACHTIGALL, 2004).

A macieira é uma espécie frutífera lenhosa, decídua, temperada, muito adaptável a diferentes climas, crescendo desde os trópicos até altas altitudes. Pertence à família das Rosaceae e subfamília Pomoideae. As flores são brancas ou rosas dispostas em inflorescência denominada umbela. O fruto é um pomo, constituído por grande receptáculo carnudo que envolve os ovários, cujo endocarpo é coriáceo ou pétreo. É uma espécie alógama, ou seja, necessita da transferência do pólen de uma planta para o estigma de outra para que haja fertilização do óvulo e a consequente produção de sementes e frutos (IUCHI, 2002).

2.1.2 A cultura no Brasil

Os estados do Sul do Brasil possuem as melhores condições para o cultivo de macieira devido à quantidade de horas-frio que é considerada suficiente para atender às necessidades exigidas pela planta, proporcionando condições para se alcançar uma produtividade competitiva e melhor qualidade do fruto (ICEPA, 2004).

A área plantada com a espécie aumentou entre os anos de 1987 e 2011, de 22.073 ha para 38.500 ha, e os Estados da região Sul são responsáveis por mais de 99% desta área e produção (IBGE, 2013). Na atividade estão envolvidos mais de 3 mil produtores, gerando

em torno de 150 mil empregos diretos e indiretos (PETRI *et al.*, 2011).

Entre os fatores que afetam a produtividade da macieira, destacam-se o baixo número de horas de frio (PETRI, PALLADINI e POLA, 2002), além da alta precipitação e umidade relativa do ar na primavera/verão que favorecem a ocorrência de doenças (BONETI, BECKER e KATSURAYAMA, 2004). O controle de doenças tem sido o principal fator limitante da cultura na atualidade, respondendo por cerca de 20% do custo de produção (KATSURAYAMA e BONETI, 2009).

As cultivares 'Gala' e 'Fuji' e seus respectivos clones (ex: Royal Gala, Fuji Suprema), apresentam as características agrônômicas desejáveis para as exigências de mercado, tais como coloração, tamanho, exigência em frio (BONETI *et al.*, 2002) e atualmente representam 14,89% e 7,20% da produção mundial, respectivamente. No Brasil, os grupos Gala e Fuji (e seus clones como Royal Gala, Imperial Gala, Maxi Gala, Brookfield, Fuji Suprema) representam em torno de 60% e 30% da produção, respectivamente. Para as regiões com pouco frio, destaca-se a cv. Eva, que é comercializada nos meses de dezembro e janeiro (PETRI *et al.*, 2011).

2.2 MANCHA FOLIAR DE GLOMERELLA

2.2.1 Distribuição

Considerada a principal doença de verão da cultura da macieira no Brasil, a Mancha Foliar de Glomerella (MFG), também conhecida como Mancha da Gala ou Mancha Foliar da Gala, foi constatada pela primeira vez em 1983 no município de Porto Amazonas/PR (LEITE, TSUNETTA e KISHINO, 1988), ficando restrita ao estado do Paraná durante aproximadamente seis anos, disseminando-se mais tarde pelos pomares de Fraiburgo (1988/89), Caxias do Sul e Vacaria (1992/93) até chegar, no ciclo de 1997/98, às regiões mais altas de Santa Catarina (KATSURAYAMA, TSUCHIYA e BONETI, 2001).

Esta doença pode ser considerada tipicamente brasileira, apesar de haver relatos também nos EUA (GONZÁLES e SUTTON, 1999; BOST e HALE, 2004) e na China (WANG, ZHANG e LI, 2012).

2.2.2 Etiologia

O primeiro agente causal identificado foi *Glomerella cingulata* (*C. gloeosporioides* (Penz.) Penz & Sacc.). Posteriormente, *C. acutatum* e uma espécie, até então, não identificada de *Colletotrichum* também foram associadas a essa doença (VALDEBENITO-SANHUEZA *et al.*, 2002). Entretanto, recentemente, Bragança (2013) estudando este gênero em isolados obtidos de macieira relatou a existência de várias espécies causadoras da MFG, coletadas nas diferentes regiões produtoras dos estados de SP, PR, SC e RS. Entre as espécies identificadas estão: *C. nympheae* e *C. melonis* pertencentes ao complexo de espécies *C. acutatum*; e *C. fructicola* e *C. siamense* pertencentes ao complexo de espécies *C. gloeosporioides*. No Paraná, este autor descreveu uma espécie nova nominada *C. paranaense* pertencente ao complexo *C. acutatum*.

2.2.3 Sintomatologia

Nas folhas as manchas surgem cerca de 45 horas após a inoculação, o tecido é colonizado formando necroses avermelhadas, em círculos concêntricos na forma de manchas difusas e de cor marrom (KATSURAYAMA, BONETI e BECKER, 2000). Estas lesões evoluem até tornarem-se amarelo-acinzentadas e às vezes com margens marrom-avermelhadas (Figura 1A). No centro das lesões antigas desenvolvem-se pontos escuros, acérvulos e peritécios, que são os corpos de frutificação do fungo. As primeiras infecções ocorrem, geralmente, nas folhas novas e na parte baixa e interna das plantas. Logo após a generalização da doença nas plantas, inicia-se a queda das folhas e, na ausência de controle, o produtor pode sofrer com a redução da produção no ano seguinte (VALDEBENITO-SANHUEZA *et al.*, 2002).

Nos frutos surgem numerosas pontuações deprimidas, de aproximadamente 1mm de diâmetro e de cor marrom-clara a marrom-escura (Figura 1B), que não evoluem para lesões de podridão amarga. Nos ramos verdes, também são visíveis sintomas da MFG que surgem como lesões longitudinais, de cor marrom clara, que se tornam corticentas e com borda saliente (KATSURAYAMA e BONETI, 2009).

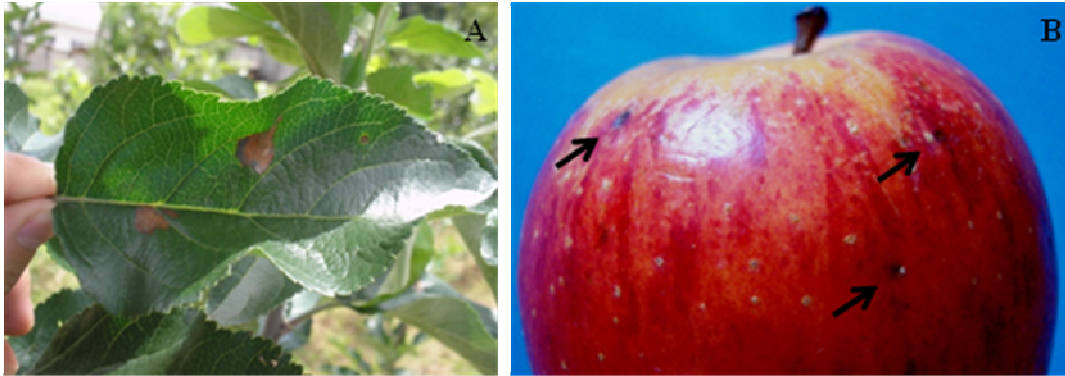


Figura 1 - Sintomas de Mancha Foliar de *Glomerella* em folhas (A) e em frutos (B) de macieira da cv. Gala (*Malus domestica*).

Fonte: O autor (2011)

2.2.4 Ciclo biológico e epidemiologia da doença

Este fungo pode sobreviver por meio da produção de peritécios em folhas infectadas caídas no chão (CRUSIUS, 2000), saprofiticamente em cancrs causados por outros patógenos (JONES e SUTTON, 1996) e, podem ainda ser encontrados em isolamentos feitos a partir de gemas e ramos sem sintomas visíveis coletados de plantas severamente infectadas no ciclo anterior (KATSURAYAMA e BONETI, 1999; CRUSIUS, 2000). O clima afeta a sobrevivência do inóculo, tanto entre estações de cultivo quanto dentro das estações de cultivo. A sobrevivência do inóculo entre as estações de cultivo é menor em regiões temperadas ou semi-áridas com verão seco, onde condições climáticas extremas podem destruir as estruturas de sobrevivência e infecção do patógeno (VALE *et al.*, 2004).

Uma vez o patógeno estabelecido na planta, os conídios são liberados da massa mucilaginosa, na qual estão envoltos, e disseminados por respingos ou escorrimento da água da chuva alcançando órgãos suscetíveis (KATSURAYAMA e BONETI, 2009).

A MFG se manifesta tipicamente no verão, sendo favorecida por temperaturas superiores a 20 °C. Estudos epidemiológicos determinam como dia favorável (DF) para ocorrência da doença um período de molhamento foliar de dez horas (na presença de chuva) com temperatura igual ou superior a 15 °C (KATSURAYAMA, BONETI e BECKER, 2000). Basta a ocorrência de três DF para o início da epidemia. Após a infecção, os sintomas nas folhas aparecem em apenas 45 horas e nos frutos em 96 horas

(HAMADA, 2005).

2.2.5 Controle

O controle da doença é realizado de forma preventiva devido à falta de fungicidas de ação curativa que é ocasionada, em parte, pelo curto período de incubação da doença, de apenas 45 horas em temperaturas acima de 20 °C, o que compromete a eficácia de tratamentos dessa natureza (KATSURAYAMA e BONETI, 2012).

O controle da MFG tem sido efetuado com a aplicação, principalmente, de fungicidas do grupo dos ditiocarbamatos (mancozebe, metiram e propinebe), que apresentam alto índice de controle (IC) no início do ciclo vegetativo da macieira (IC > 80%) e mediano (IC > 70%) no final, quando a pressão do inóculo aumenta. O controle baseado na aplicação de fungicidas protetores resulta em elevado número de pulverizações, que pode chegar a 15 por safra no estado de Santa Catarina (KATSURAYAMA e BONETI, 2012).

Entretanto, as normas de Produção Integrada de Maçã no Brasil (IN SDC N° 01 de 14/09/2006)¹ limitam o uso de fungicidas por safra, muitas vezes inviabilizando esse sistema de controle. Outro entrave é o período que antecede a colheita por ser o mais crítico em relação ao ataque da doença. Pode-se afirmar que os tratamentos utilizados atualmente não são eficazes devido às restrições quanto ao período de carência dos fungicidas. (VALDEBENITO-SANHUEZA *et al.*, 2002; KATSURAYAMA e BONETI, 2009; KATSURAYAMA e BONETI, 2012).

Uma estratégia para otimizar o manejo da MFG é prever a sua ocorrência (CRUSIUS *et al.*, 2002; KATSURAYAMA e BONETI, 2012), sendo relevante, por exemplo, a compreensão do local de produção do inóculo primário (COPES e THOMSON, 2008) que no caso de plantas decíduas como a macieira ocorre no início da brotação, ou seja, decorre do período de sobrevivência do patógeno no inverno (STADNIK, ARAÚJO e VALDEBENITO-SANHUEZA, 2009).

¹ Instrução normativa SDC No 1 de 14 de setembro de 2006, que aprova as normas técnicas específicas para a produção integrada de maçã, NTEPI-Maçã. Publicada no Diário Oficial da União em 21 de setembro de 2006.

2.3 CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS EM PLANTAS

Tradicionalmente, o uso de pesticidas químicos tem sido bastante eficiente no controle de várias pragas que atingem plantações mundiais. Doenças, como a requeima da batata, causada por *Phytophthora infestans* (Irlanda, meados do século XIX) e a brusone do arroz, causada por *Pyricularia oryzae* (Japão, II Guerra Mundial), deixaram milhões de pessoas famintas, e, nessas ocasiões, o controle químico foi crucial (OKU, 1994). O uso prolongado de produtos químicos no tratamento de doenças de plantas, no entanto, pode provocar, além de possíveis efeitos danosos à saúde humana, o desenvolvimento de resistência por alguns fitopatógenos, provocando o uso de doses cada vez maiores e diminuindo o rendimento da produção dessas plantas.

Conseqüentemente, o controle químico tem sido repensado na agricultura mundial, no sentido de se utilizar microrganismos antagonistas como uma via alternativa no controle de doenças de plantas (HIRAOKA *et al.*, 1992). Assim, foi introduzido o termo Controle Biológico, que pode ser descrito como a influência de um organismo, o antagonista, sobre outro, o patógeno, causando uma diminuição da quantidade de inóculo ou dos efeitos provocados por esse último em determinada planta hospedeira. O biocontrole é, portanto, composto por três agentes: o patógeno, que pode ser fungo, bactéria, vírus, protozoários, entre outros, a planta hospedeira e o antagonista, estando esses três componentes sob influência do ambiente (MARIANO, 2000).

O antagonista é um agente biológico com potencial para interferir nos processos vitais de fitopatógenos (MARIANO, 2000). Dentre os microrganismos antagonistas envolvidos no biocontrole, estão incluídos vários gêneros de bactérias, como, por exemplo, *Actinoplanes*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Azobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Rhizobium*, entre outros (WELLER, 1988). Esses organismos podem ser encontrados em diferentes partes da planta, podendo ser isolados de raízes ou regiões em torno delas (rizoplano e rizosfera, respectivamente), bem como nas folhas (filoplano) e no interior das plantas, sendo então classificados como microrganismos endofíticos (THOMSON, 1993).

O crescimento de bactérias na rizosfera e no rizoplano é favorecido devido aos exsudatos liberados pelas raízes, que incluem compostos como açúcares, aminoácidos, hormônios, intermediários metabólicos e vitaminas. Em geral, os bacilos Gram-negativos são frequentemente encontrados nesse ambiente, particularmente os dos gêneros *Pseudomonas*, *Flavobacterium* e *Alcaligenes* (THOMSON, 1993). Por outro lado, a

superfície de folhas não fornece um ambiente tão rico e propício para a colonização de bactérias. Devido à presença de cutina e ceras, a filosfera se apresenta hidrofóbica e com uma quantidade de nutrientes limitada. Além disso, o filoplano é um ambiente inóspito para a sobrevivência microbiana devido a flutuações de temperatura e umidade e à radiação ultravioleta (THOMSON, 1993).

Portanto, a escolha do antagonista adequado depende especialmente de qual região da planta está sendo afetada pelo fitopatógeno (THOMSON, 1993). No entanto, os antagonistas podem ser aplicados em qualquer parte da planta, desde que esta seja favorável a que esses agentes se estabeleçam rapidamente e em populações suficientemente grandes e ativas para mediar a proteção da planta contra os patógenos (THOMASHOW e WELLER, 1996).

Dentre as bactérias de maior interesse no biocontrole, estão aquelas chamadas de Bactérias Promotoras do Crescimento de Plantas (BPCP). Esse termo vem sendo utilizado para descrever bactérias que podem colonizar a superfície e ou interior de plantas e estimular o crescimento destas quando aplicados em sementes, tubérculos ou raízes (CHANWAY, RADLEY e HOLL, 1991). Em geral, as BPCP exercem esse efeito de forma direta quando, na ausência de fitopatógeno, elas próprias estimulam o crescimento através da produção de hormônios de crescimento, mineralização de nutrientes, aumento de absorção de água e nutrientes e fixação de nitrogênio, ou de forma indireta, através do controle biológico. Este pode ser obtido por um ou vários mecanismos, tais como, produção de antibióticos e sideróforos, competição por nicho ou nutrientes, parasitismo, proteção cruzada e indução de resistência (LUZ, 1996; THOMASHOW e WELLER, 1996; VALIDOV, 2007).

2.4 BIOCONTROLE DE DOENÇAS DE PLANTAS POR RESIDENTES DO FILOPLANO

A população microbiana do filoplano apresenta enorme diversidade nos eventos e nas condições que ditam sua dinâmica tornando-as, desta maneira, complexas (KINKEL, WILSON e LINDOW, 1996; KINKLE, 1997). Baker e Cook (1974) e Blakeman e Fokkema (1982) consideram que, sendo o filoplano um habitat natural para microrganismos, muitos deles apresentam, ou podem apresentar, potencialidade como

agentes de controle biológico de enfermidades. Vários são os relatos de casos de controle biológico ocorrendo naturalmente na superfície de plantas, como exemplo, em coqueiro (SUDO, 1989), seringueira (JUNQUEIRA e GASPAROTO, 1991), feijoeiro (BORA, GANGOPADHYAY e CHAND, 1993; JINDAL e THIND, 1994), sorgo (MICHREF, SILVEIRA e MARIANO, 1994), café (VÉLEZ e ROSILLO, 1995) e citrus (PABITRA *et al.*, 1996). Assim como Sudo (1989), Bettiol (1997) considerou que microrganismos com comprovada eficiência antagônica devem ter sua população aumentada na superfície da planta, visando o biocontrole da doença alvo.

Sendo assim, vários autores isolaram e selecionaram microrganismos residentes de filoplano visando o biocontrole de fitopatógenos. Na obtenção de antagonistas, Jiménez *et al.* (1988); Sandoval, Armbrrecht e Granada (1988); Micheref *et al.* (1994); Korsten *et al.* (1995); Mizubuti *et al.* (1995); Pabitra *et al.* (1996); Carrer Filho *et al.* (1999); Halfeld-Vieira, Romeiro e Carrer Filho (2000); Romeiro *et al.* (2000a); Macagnan (2005) obtiveram isolamentos da parte aérea de plantas e testaram-os para o biocontrole de enfermidades também na parte aérea da própria espécie vegetal de onde foram isolados. Por outro lado, Thomson *et al.* (1976); Liao (1989); Micheref, Silveira e Mariano (1994); Montesinos *et al.* (1996); Perondi, Luz e Thomas (1996); Stromberg, Kinkel e Leonard (2000); Yuen *et al.* (2001) isolaram antagonistas de órgãos subterrâneos e testaram-os como antagonistas de patógenos na parte aérea de plantas.

A espécie hospedeira e as condições do ambiente, como temperatura e umidade, influenciam a sobrevivência de bactérias no filoplano. Bactérias originárias do solo sobrevivem e crescem na superfície de folhas, mas a sua população decresce mais rapidamente em virtude da flutuação das condições do ambiente quando comparadas àquelas originalmente residentes de filoplano (O'Brien e Lindow, 1989).

Para um organismo ser bem sucedido no controle biológico, este deve ter capacidade de se multiplicar e colonizar o filoplano da planta (BETTIOL, 1997; BLAKEMAN e FOKKEMA, 1982; ANDREWS, 1992). Os critérios de seleção são pontos cruciais na prospecção de agentes de biocontrole, determinando as chances de sucesso do programa de controle biológico (BETTIOL, 1997). Andrews (1992), assim como Bettiol (1997) chamaram a atenção para o fato de que, em muitos casos, a seleção de antagonistas é baseada unicamente em ensaios *in vitro* considerando o seu baixo custo e rapidez. No entanto, estes mesmos autores alertaram que há baixa correlação dos resultados obtidos em condições de laboratório com os observados nas condições a campos onde os antagonistas são utilizados.

Por outro lado, a seleção baseada unicamente em ensaios de campo, embora possa resultar em dados mais consistentes, normalmente demandam muito espaço. Alia-se a isso, o fato de que trabalhos consistentes de seleção de organismos normalmente iniciam-se com centenas de isolamentos (MACAGNAN, 2005). Em muitos trabalhos são mencionadas cautelosas notas a respeito de metodologias de seleção de organismos e a sua inconsistente atividade em condições de campo (MERRIMAN e RUSSEL, 1990; DEACON, 1991; BECKER e SCHWINN, 1993; COOK, 1993).

Sendo assim, não é possível descartar o uso de testes em laboratório como ferramenta para determinar o possível modo de ação do antagonista (Kraus e Loper, 1992; Lemanceau *et al.*, 1993; Gomes, Araújo e Mariano, 1999; Barretti *et al.*, 2000), ou como ferramenta para a seleção inicial (CRAWFORD *et al.*, 1993; ELABYAD *et al.*, 1993). Uma maneira mais cautelosa na seleção de potenciais antagonistas é o uso de testes de laboratório combinados com testes *in vivo* conforme trabalhos de Carrer Filho *et al.* (1999); Nascimento *et al.* (1999); Romeiro *et al.* (2000a); Romeiro *et al.* (2000b); Silva, Romeiro e Deuner (2000); Macagnan (2005) que realizaram a seleção de antagonistas em duas fases. A primeira combinou testes de antibiose, em laboratório, e supressão do desenvolvimento de sintomas em mudas em casa-de-vegetação, com um pequeno número de repetições. A segunda submeteu os antagonistas a testes, desta vez unicamente em *in vivo* com um grande número de repetições.

CAPÍTULO I

MODO DE AÇÃO DE *Bacillus* spp. E *Pseudomonas* sp. COMO INIBIDORES DE *Colletotrichum* DO GRUPO *acutatum* E INTERFERÊNCIA NOS COMPONENTES DO MONOCICLO DA MANCHA FOLIAR DE *GLOMERELLA*

3 MODO DE AÇÃO DE *Bacillus* spp. E *Pseudomonas* sp. COMO INIBIDORES DE *Colletotrichum* DO GRUPO *acutatum* E INTERFERÊNCIA NOS COMPONENTES DO MONOCICLO DA MANCHA FOLIAR DE *GLOMERELLA*

RESUMO

Uma alternativa ao uso de fungicidas para o controle da MFG é a aplicação de bactérias epifíticas, por colonizarem o mesmo nicho do seu agente causal, *Colletotrichum* spp. e, conseqüentemente, estarem adaptadas as condições ambientais adversas que afetam a superfície da planta. O estudo dos mecanismos de ação destas bactérias é determinante para viabilizar o controle biológico. Na cultura da macieira existem poucos trabalhos relacionados ao biocontrole de doenças e, em sua grande maioria são voltados para patógenos de pós-colheita. Diante disso, os objetivos deste trabalho foram: (i) identificar isolados bacterianos do filoplano da macieira com potencial para controle da MFG; (ii) identificar dois isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de macieira para a realização dos ensaios (Col01 e Col156); (iii) avaliar a eficiência de isolados bacterianos na inibição da germinação de conídios de *Colletotrichum* spp.; (iv) verificar modo de ação dos isolados bacterianos e do produto comercial Serenade® - a base de *Bacillus subtilis* - em relação ao crescimento micelial e à produção de compostos antifúngicos termoestáveis e voláteis; e (v) avaliar a influência de isolados bacterianos e do produto comercial Serenade® no monociclo da MFG. Através da técnica de extração de ácidos graxos foi feita a identificação dos isolados bacterianos por cromatografia gasosa e, quando esta identificação não foi possível, foram identificados por análise molecular. O isolado de *Colletotrichum* spp. Col01 foi identificado através do sequenciamento da região ITS e o isolado de *Colletotrichum* spp. Col156 por PCR espécie-específica. Para verificar o modo de ação dos isolados bacterianos sobre *Colletotrichum* spp. foram realizados testes de germinação de conídios, de pareamento de colônias, de ação de metabólitos termoestáveis e de ação de compostos antifúngicos voláteis. A influência de isolados bacterianos no monociclo da MFG foi verificada através do tratamento de mudas em casa-de-vegetação e posterior inoculação com o patógeno. Os isolados bacterianos do filoplano da macieira foram identificados como *Pseudomonas putida*, *Bacillus* sp. e *Bacillus alcalophilus*. Os isolados de *Colletotrichum* foram identificados como pertencentes ao complexo *Colletotrichum acutatum*. *Bacillus* sp., isolado de macieira, inibiu em mais de 60% a germinação de conídios de *Colletotrichum* do grupo *acutatum*. O modo de ação de *Bacillus* sp. e *Bacillus alcalophilus* sobre *Colletotrichum* do grupo *acutatum* foi através da produção de compostos fixos e voláteis que inibiram o crescimento micelial. O principal modo de ação do produto comercial Serenade®, sobre *Colletotrichum* do grupo *acutatum* foi a produção de metabólitos termoestáveis capazes de inibir o crescimento micelial em 100%. Houve diferença significativa entre os parâmetros epidemiológicos calculados para incidência e severidade da MFG em mudas tratadas com bactérias isoladas do filoplano da macieira e com Serenade® em relação a testemunha.

Palavras-chave: Antibiose. Controle biológico. Macieira.

Mode of action of *Bacillus* spp. and *Pseudomonas* sp. as inhibitors of *Colletotrichum acutatum* group and interference in monocycle components of *Glomerella* leaf spot

ABSTRACT

An alternative to the use of fungicides for control of GLS is the study of the potential of epiphytic bacteria, for colonize the same niche of its causal agent, *Colletotrichum* spp. and thus are adapted to adverse environmental conditions affecting the plant surface. The study of the mechanisms of action of these bacteria is crucial to enhance biological control. In apple orchards there are few studies related to biocontrol and, mostly geared for post-harvest pathogens. Therefore, the objectives of this work were: (i) identify bacterial isolates phylloplane apple tree with potential to control the GLS, (ii) identify two isolates of *Colletotrichum* spp. apple obtained for the tests (and Col156 Col01), (iii) evaluate the influence of bacterial isolates on the germination of conidia of *Colletotrichum* spp. (iv) verify mode of action of bacterial isolates and the commercial product Serenade® - based on *Bacillus subtilis* - against the mycelial growth and the production of thermostable antifungal compounds and volatile, and (v) evaluate the influence of bacterial isolates and the commercial product Serenade® monocycle in the GLS. Through the technique of extraction of fatty acids was made to identify the bacteria isolated by gas chromatography, and when this identification was not possible, been identified by molecular analysis. The isolate of *Colletotrichum* spp. Col01 was identified by sequencing of the ITS region and the isolate of *Colletotrichum* spp. Col156 by species-specific PCR. To check the mode of action of bacterial isolates of *Colletotrichum* spp. tests of conidial germination of pairing colonies, action thermostable metabolites and action of antifungal volatile compounds. The influence of bacterial isolates in the monocycle GLS was verified by treating seedlings in a green house and after inoculation with the pathogen. The bacterial isolates from the phylloplane of apple trees were identified as *Pseudomonas putida*, *Bacillus* sp. and *Bacillus alcalophilus*. The *Colletotrichum* isolates were identified as belonging to the *Colletotrichum acutatum* complex. *Bacillus* sp. isolated apple inhibited by more than 60% germination of conidia of *Colletotrichum acutatum* group. Mode of action of *Bacillus* sp. and *Bacillus alcalophilus* on *Colletotrichum acutatum* complex is through the production of fixed and volatile compounds which inhibit mycelial growth. The primary mode of action of the commercial product Serenade® on *Colletotrichum acutatum* complex is the production of thermostable metabolites capable of inhibit mycelial growth by 100%. There were significant differences between epidemiological parameters calculated for incidence and severity of GLS in seedlings treated with bacteria isolated from the phylloplane of apple and Serenade® compared to control.

Keywords: Antibiosis. Biological control. Apple.

3.1 INTRODUÇÃO

A mancha foliar de *Glomerella* (MFG), causada por espécies do gênero *Colletotrichum*, acomete a macieira (*Malus domestica* Borkh.) e ocorre com maior intensidade em regiões de clima subtropical úmido, como Sudeste dos EUA (GONZÁLEZ, SUTTON e CORRELL, 2006) e Sul do Brasil (BECKER, KATSURAYAMA e BONETI, 2000). A MFG se desenvolve geralmente com verões chuvosos e tem se tornado uma grande preocupação nos últimos anos, principalmente nos estados onde a cultivar 'Gala', altamente suscetível, é a mais plantada. Sob tais condições, a doença pode resultar em desfolha intensa, superior a 75%, reduzindo o rendimento e enfraquecendo as reservas nutricionais das plantas (BECKER, KATSURAYAMA e BONETI, 2000; GONZÁLEZ, SUTTON e CORRELL, 2006).

O controle da MFG é feito com fungicidas (BECKER, KATSURAYSMA e BONETI, 2000) e, apesar de eficientes, aplicações freqüentes aumentam os custos de produção e também podem ter efeitos danosos sobre o meio ambiente e a saúde humana (STADNIK, ARAÚJO e VALDEBENITO-SANHUEZA, 2009).

Uma alternativa ao uso de fungicidas é a aplicação de bactérias epifíticas no controle de doenças de plantas, por colonizarem o mesmo nicho de alguns patógenos foliares. Leben (1965) preconizava que microrganismos isolados do filoplano de plantas poderiam reduzir o potencial de inóculo de patógenos. Estudos apontam algumas causas para tal efeito, por exemplo, a competição por nutrientes entre os antagonistas e fungos potencialmente patogênicos e a produção de substâncias potencialmente prejudiciais ao patógeno (BLAKEMAN e BRODIE, 1977; TROTEL-AZIZ *et al.*, 2008).

As interações envolvidas no controle biológico de fitopatógenos são determinadas pelos mecanismos de antagonismo. Esses mecanismos podem ser divididos em competição, parasitismo, antibiose, predação, hipovirulência e indução de defesa do hospedeiro (COOK e BAKER, 1983). É provável que os diferentes mecanismos atuem em sinergia durante uma interação antagônica (PUNJA e UTKHEDE, 2003). O conhecimento da natureza desses mecanismos é determinante para auxiliar o controle biológico de doenças (BLEKEMAN e FOKKEMA, 1982).

Considerando-se que a MFG apresenta-se como a principal “doença de verão” da cultura e o principal problema fitossanitário no Paraná, atingindo elevados níveis de severidade proporcionado pelo clima extremamente favorável e deixando os pomares em

condição de alta pressão de inóculo (KOWATA *et al.*, 2010), o estudo do potencial de controladores biológicos é uma alternativa importante para os produtores de maçã. Estes, embora apliquem um elevado número de tratamentos com fungicidas protetores, aumentando o custo de produção em 10%, chegam a ter prejuízos na ordem de 20% (KATSURAYAMA e BONETI, 2012).

Neste contexto, para o presente estudo foram escolhidos três isolados bacterianos do filoplano da macieira, pré-selecionados por Rollemberg (2008), de diferentes regiões produtoras de maçã no estado do Paraná com os seguintes objetivos: (i) identificar os isolados bacterianos do filoplano da macieira; (ii) identificar dois isolados de *Colletotrichum* spp. (Col01 e Col156) obtidos de macieira para a realização dos ensaios; (iii) avaliar a eficiência de isolados bacterianos na inibição da germinação de conídios de *Colletotrichum* spp.; (iv) verificar modo de ação dos isolados bacterianos e do produto comercial Serenade® - a base de *Bacillus subtilis* - em relação ao crescimento micelial e à produção de compostos antifúngicos termoestáveis e voláteis; e (v) avaliar a influência de isolados bacterianos e do produto comercial Serenade® no monociclo da MFG.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Obtenção e identificação dos isolados bacterianos

Os isolados bacterianos foram obtidos por Rollemberg (2008) que coletou amostras de órgãos aéreos (lançamentos vegetativos, folhagem completamente expandida, botões florais e frutos jovens) de macieiras saudáveis nos municípios de Campo Largo, Lapa, Quatro Barras e Porto Amazonas, no Estado do Paraná. As amostras foram levadas ao Laboratório de Epidemiologia e Manejo Integrado de Doenças de Plantas (LEMID) da Universidade Federal do Paraná, de onde foi extraída a flora epifítica seguindo metodologia adaptada de Romeiro *et al.* (2000). Dos 137 isolados obtidos, três foram selecionados para o presente trabalho de acordo com a eficiência observada no controle anteriormente. Sendo eles: Isolado A68 (Porto Amazonas), Isolado C02 (Campo Largo) e Isolado C12 (Quatro Barras) isolados de folhas de macieira.

Utilizando-se da técnica de extração de ácidos graxos bacterianos, cada um dos três isolados foi identificado por cromatografia gasosa no Laboratório de Microbiologia Ambiental da Embrapa Meio Ambiente.

Para a extração dos ácidos graxos das amostras foram transferidos, com o auxílio de uma alça de metal, 4 alças cheias de células bacterianas do terceiro quadrante riscado na placa para tubos de cultura de 13x100 mm. Estas amostras foram saponificadas com 1,0 + 0,1 mL do reagente de saponificação contendo 45 g de hidróxido de sódio (NaOH), 150 mL de metanol e 150 mL de água desionizada. Agitou-se em agitador tipo “vortex” por 10 s, aqueceu-se por 5 min em banho-maria a 100 °C, agitou-se novamente por 10 s, reaquecendo-se por mais 25 min, resfriando-se, em seguida, em banho de água até atingir temperatura ambiente.

Para a metilação dos ácidos graxos foram adicionados 2,0 + 0,1 mL do reagente de metilação, que consiste em uma mistura de 325 mL de HCl 6,0 mol L⁻¹ e 275 mL de metanol, agitou-se por 10 s, aqueceu-se a 80 °C por 10 min e resfriou-se em banho de água até temperatura ambiente. Os ésteres formados foram extraídos com 1,25 mL de um sistema de solventes, constituído de hexano e terc-butil-metil éter na proporção 50:50, agitando-se levemente em agitador por 10 min. Separou-se a fase orgânica contendo as substâncias de interesse, lavando-se o extrato com 3,0 mL de solução de NaOH (10,8 g em 900 mL de água desionizada) e agitando-se por 5 min. Observando-se a formação de emulsão, os tubos foram centrifugados a 3000 RPM por 3 min. A fase orgânica foi separada e armazenada em frascos tipo “vials” de 2 mL para injeção no cromatógrafo.

As análises cromatográficas foram efetuadas em Cromatógrafo a Gás Agilente CG 6850, empregando amostrador automático, coluna capilar Ultra 2 e detector de Ionização em Chama (DIC).

A identificação dos microrganismos foi realizada comparando-se os cromatogramas obtidos com as informações contidas na biblioteca do sistema Microbial ID, Inc., Newark, Dell. Os dados obtidos consistem na indicação da identidade da bactéria investigada e do índice de similaridade (IS).

Os isolados bacterianos que obtiveram IS inferior a 0,6 foram encaminhados para o Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) para identificação por análise molecular.

O gene RNA ribossomal 16S foi amplificado pela técnica de PCR, utilizando como molde o DNA genômico extraído diretamente da cultura bacteriana, segundo protocolo descrito por Van Soolinger *et al.* (1993). Os *primers* (oligonucleotídeos sintéticos)

utilizados para a reação de PCR foram p10f e p1100r, homólogos às extremidades conservadas do gene RNA ribossomal 16S de bactérias.

Os produtos das amplificações foram purificados em coluna (*GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit*, GE Healthcare) e submetidos diretamente ao seqüenciamento usando o seqüenciador automático ABI3500XL Series (Applied Biosystem). Os *primers* utilizados para o seqüenciamento foram o 10f e o 1100r.

As seqüências parciais do gene RNA ribossomal 16S obtidas com os diferentes *primers* foram montadas em um *contig* (seqüência única combinando os diferentes fragmentos obtidos) e comparadas com as seqüência de organismos representados nas bases de dados do Genbank² e do RDP³. Foram então selecionadas seqüências de microrganismos relacionados ao microrganismo desconhecido para realização das análises filogenéticas. As seqüências de DNA foram alinhadas utilizando o programa CLUSTAL X (THOMPSON *et al.*, 1997) e as análises filogenéticas foram conduzidas utilizando o programa MEGA versão 4.0 (TAMURA *et al.*, 2007). A matriz de distância evolutiva foi calculada com o modelo de Kimura (1980) e a construção da árvore filogenética a partir das distâncias evolutivas foi feita pelo método de *Neighbor-Joining* (SAITOU e NEI, 1987), com valores de *bootstrap* calculados a partir de 1.000 re-amostragens, utilizando o software incluído no programa MEGA 4.0.

3.2.2 Obtenção e identificação dos isolados de *Colletotrichum* spp.

Dois isolados de *Colletotrichum* spp. foram obtidos de forma indireta de folhas de macieira ‘Gala’ com sintomas de mancha foliar de *Glomerella* e, tiveram sua patogenicidade comprovada mediante inoculações feitas com suspensão de conídios em folhas destacadas. Os isolados nomeados como Col01 e Col156, foram obtidos de pomares comerciais localizados na região metropolitana de Curitiba-PR em 2009 e 2011, respectivamente.

Para a identificação molecular foram obtidas culturas monospóricas de cada isolado de *Colletotrichum* conforme metodologia descrita por Pereira (2009). O DNA genômico

² <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

³ <http://rdp.cme.msu.edu/>

foi obtido com Kit de extração UltraClean[®] Microbial DNA Kit (MO Bio), seguindo as instruções do fabricante.

A concentração de DNA foi quantificada em gel de agarose 0,8% corado com GelRed (Uniscience[®]) e documentada em Sistema de Fotodocumentação L-Pix EX (Loccus[®]) comparando visualmente a intensidade das bandas formadas com um padrão de peso conhecido ("High DNA mass ladder" Invitrogen[®]). As amostras foram então diluídas até a concentração de 10 ng DNA μL^{-1} de suspensão e armazenadas sob temperatura de -20 °C.

Foi realizada identificação molecular do isolado Col156 pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando iniciador específico para *C. acutatum* (CaInt2) desenvolvido por Afanador-Kafuri *et al.* (2003).

A identificação de *C. acutatum* foi realizada com os iniciadores CaInt2 (5'- GGG GAA GCC TCT CGC GG-3') e ITS4 (5'- TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC--3') (AFANADOR-KAFURI *et al.*, 2003). A reação foi realizada com 25 μL de solução, em água ultrapura, contendo 2 μL do DNA extraído, 2,5 μL do tampão 10X para PCR, 1,5 mM de MgCl_2 , 0,2 mM de uma mistura de dNTPs, 0,5 μM de cada um dos iniciadores (CaInt2 e ITS4) e 0,04 U Taq DNA polimerase (Invitrogen[®]). O termociclador foi programado para um ciclo de 30 s a 94 °C, 45 s a 62 °C e 90 s a 72 °C, seguido de um ciclo de 30 s a 94 °C, 45 s a 60 °C e 90 s a 72 °C, finalizando com 33 ciclos de 30 s a 94 °C, 45 s a 58 °C e 90 s a 72 °C.

Para confirmação de presença da amplificação no tamanho esperado, os produtos da PCR foram aplicados em gel de agarose 1,5% e corados com GelRed (Uniscience[®]) e documentados em Sistema de Fotodocumentação L-Pix EX (Loccus[®]).

Foi utilizada linhagem referência de *C. boninense* (LGMF625) como controle, cordialmente cedida pelo Laboratório de Genética de Microrganismos da UFPR⁴.

Para identificação do isolado Col01 foi realizado sequenciamento da Região ITS1 – 5,8S – ITS2 do rDNA. A amplificação foi realizada com os iniciadores V9G (HOOG e GERRITS VAN DEN ENDE, 1998) e ITS4 (WHITE *et al.*, 1990), que são universais para fungos e permitem amplificar a região ITS1 - 5,8S - ITS2 do DNA ribossomal. As condições da reação seguiram o protocolo de Woudenberg *et al.* (2009) com algumas modificações: 10 ng de DNA, tampão PCR 1X, 1U de Taq polimerase (Invitrogen[®]), 0.2

⁴ LabGen, Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Departamento de Genética, Centro Politécnico. Jardim das Américas, Curitiba, Paraná, Brasil. www.labgen.ufpr.br.

μM de iniciadores, 0,2 mM de cada dNTP, 1,5 μl de MgCl_2 , e volume final de 12,5 μl . A amplificação foi realizada em termociclador *Eppendorf (Mastercycler Gradient®)*, com desnaturação inicial a 94 °C por 5 min; 35 ciclos de 30 s a 94 °C, 1 min a 55 °C, 1 min a 72 °C; seguida de extensão final de 3 min a 72 °C.

Para confirmação de presença do DNA na amostra, 5 μl foram aplicados em gel de agarose 1,0%. A purificação do produto de PCR foi realizada com acetato de amônio e etanol PA e o *pellet* resultante foi ressuspendido em 15 μL de água ultra-pura esterilizada.

Para reação de sequenciamento foi utilizado o Kit DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing (GE Healthcare®), seguindo as instruções do fabricante. A qualidade dos produtos de PCR foi verificada em gel de agarose. O produto final da amplificação foi purificado com Sephadex (Amersham Pharmacia Biotech Inc.) e submetida à eletroforese capilar semi-automática utilizando a plataforma MegaBACE (GE Healthcare®).

O alinhamento das seqüências obtidas foi realizado com auxílio do programa CLUSTAL-W versão 1.7 (THOMPSON *et al.*, 1994). Foi realizada posterior inspeção visual através do programa BioEdit 7.0.5.3 (HALL, 1999). As seqüências obtidas foram também comparadas com outras seqüências existentes no banco de dados NCBI⁵ pelo programa BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1997). Para análise das seqüências obtidas no presente trabalho, foi utilizado o programa Megablast, comparando seqüências de nucleotídeos altamente similares do banco de dados de seqüências de nucleotídeos do GenBank.

3.2.3 Modo de ação de *Bacillus* sp., *Bacillus alcalophilus* e *Pseudomonas putida* contra *Colletotrichum* spp.

Germinação de conídios de *Colletotrichum* spp.: Para avaliar o efeito dos isolados bacterianos sobre a germinação de conídios de *Colletotrichum* spp. (isolado Col01), uma gota de 40 μL da suspensão ajustada em 1×10^4 conídios mL^{-1} , foi depositada no centro de uma placa de Petri de poliestireno sem nenhum meio de cultura. Sobre a gota contendo os conídios foi depositada uma gota de 40 μL contendo o tratamento. Os tratamentos avaliados foram: isolados bacterianos A68, C02 e C12 nas concentrações de D.O.540 $\text{nm} =$

0,01, 0,05 e 0,25 e, como tratamento controle, água destilada esterilizada.

Para o preparo dos tratamentos contendo as bactérias, cada isolado bacteriano foi repicado para placas de Petri contendo meio Nutriente-ágar com cloreto de sódio (NaCl) (AES laboratoire®, 28 g L⁻¹) e mantido a 25 °C com fotoperíodo de 12 horas. Após 24 horas, quatro alçadas (40 µL) do isolado bacteriano foram transferidas para frascos do tipo Erlenmeyers, contendo meio líquido de Nutrient Broth (Himedia®, 13 g L⁻¹). Os frascos permaneceram por 48 horas sob agitação constante (120 rpm). Após este período, a suspensão de bactérias de cada isolado teve sua concentração padronizada, no espectrofotômetro, para D.O.540 = 0,02, 0,1 e 0,5, para que quando misturada à suspensão de conídios fosse diluída para a concentração desejada de 0,01, 0,05 e 0,25.

As placas foram incubadas a 25 ± 2 °C, no escuro. Considerou-se um delineamento inteiramente ao acaso, com tratamentos no esquema fatorial (4 tratamentos x 3 concentrações), com quatro repetições, em que cada placa de Petri constituiu-se em uma unidade experimental. A porcentagem de germinação de conídios foi determinada mediante contagem de 50 conídios do patógeno em cada repetição após 24 h de incubação, com a interrupção do processo através da adição de lactoglicerol. Consideraram-se como germinados os conídios com tubo germinativo maior que o próprio comprimento.

Influência em cultivo pareado no crescimento micelial de *Colletotrichum* spp.: Para estudar o efeito antagônico de isolados bacterianos no crescimento micelial de *Colletotrichum* spp., utilizou-se a técnica de cultivo pareado em placa de Petri contendo meio de cultura BDA (Himedia®, 39 g L⁻¹), conforme descrito por Dennis e Webster (1971). Discos de 5 mm de diâmetro obtidos do bordo de colônias de *Colletotrichum* spp. (isolado Col01), com oito dias de idade, foram repicadas para o centro de placas de Petri contendo meio BDA. Um dia depois, foram depositadas 4 gotas da suspensão bacteriana padronizada, no espectrofotômetro, para D.O.540 nm=0,2 (2 x 10⁵ UFC/mL) em pontos equidistantes a 3 cm de distância da colônia do fitopatógeno. Os tratamentos utilizados foram: isolados bacterianos A68, C02 e C12; produto comercial a base de *Bacillus subtilis*, Serenade® (40 mL L⁻¹); e a testemunha foi constituída de placas contendo apenas o fitopatógeno no meio de cultura. As placas foram incubadas a 25 ± 2 °C, sob fotoperíodo de 12 horas. Utilizou-se delineamento inteiramente ao acaso, com quatro repetições, em

⁵ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

que cada placa de Petri constituiu-se em uma unidade experimental. Na avaliação do crescimento micelial, fez-se a medição de dois diâmetros perpendiculares e opostos das colônias aos 4, 7 e 11 dias a partir do momento em que foi colocado o disco de micélio com os isolados no meio de cultura.

Ação de metabólitos termoestáveis no crescimento micelial de *Colletotrichum* spp.:

Quatro alçadas (40µL) de cada isolado bacteriano foram transferidas para Erlenmeyers contendo 100 mL de meio líquido Nutrient Broth (Himedia®, 13 g L⁻¹). Após a incubação, em condições de laboratório durante 48 horas e sob agitação (120 rpm), alíquotas de 10 mL de cada caldo fermentado foram transferidas para novos frascos contendo 90 mL de meio BDA, e posteriormente esterilizados em autoclave durante 20 min, a 121 °C.

Após a autoclavagem, depositou-se 25 mL de cada meio por placa de Petri. Após a solidificação, transferiu-se para o centro de cada placa um disco de 5 mm de diâmetro, obtido do bordo de colônias de *Colletotrichum* spp. (isolado Col01), com oito dias de idade. Os tratamentos utilizados foram: isolados bacterianos A68, C02 e C12; produto comercial a base de *Bacillus subtilis*, Serenade® (40 mL L⁻¹); e as testemunhas foram constituídas de placas contendo o fitopatógeno nos meios de cultura, sem a presença de metabólitos. As placas foram incubadas a 25 ± 2 °C, sob fotoperíodo de 12 horas. Utilizou-se delineamento inteiramente ao acaso, com quatro repetições, em que cada placa de Petri constituiu-se em uma unidade experimental. Foram medidos dois diâmetros perpendiculares e opostos por colônia ao 11° dia.

Ação de compostos antifúngicos voláteis no crescimento micelial de *Colletotrichum* do grupo *acutatum*:

Para estudar o efeito de compostos antifúngicos voláteis foi utilizada metodologia adaptada de Dennis e Webster (1971). Para um dos lados de placas de Petri bipartidas foram repicados os isolados bacterianos em meio Nutriente-ágar (AESlaboratoire®, 28 g L⁻¹). Após 24 horas, transferiu-se para o outro compartimento da placa de Petri contendo BDA, um disco de micélio de 5 mm de diâmetro, obtido do bordo de colônias de *Colletotrichum* spp. (isolado Col01), com oito dias de idade. Os tratamentos utilizados foram: isolados bacterianos A68, C02 e C12; produto comercial a base de *Bacillus subtilis*, Serenade® (40 mL L⁻¹); e as testemunhas foram constituídas de placas contendo água como tratamento. As placas foram incubadas a 25 ± 2 °C, sob fotoperíodo

de 12 horas. Utilizou-se delineamento inteiramente ao acaso, com três repetições. Na avaliação do crescimento micelial, fez-se a medição de dois diâmetros perpendiculares e opostos das colônias aos 4, 7 e 11 dias a partir do momento em que foi colocado o disco de micélio com os isolados no meio de cultura, obtendo-se três leituras.

3.2.4 Influência de isolados bacterianos no monociclo da mancha foliar de *Glomerella*

Mudas de macieira 'Gala' mantidas em casa-de-vegetação foram tratadas semanalmente durante cinco semanas a partir do início da brotação das folhas por meio de atomizador manual (GUARANY) com capacidade para 700 mL. Os tratamentos testados foram: isolados bacterianos A68, C02 e C12; produto comercial a base de *Bacillus subtilis*, Serenade® (40 mL L⁻¹); água e outro, sem aplicação. O volume de calda aplicado foi calibrado para atingir o início do ponto de escorrimento, utilizando-se em média 20 mL de calda por planta.

Para o preparo da calda de pulverização, os isolados bacterianos foram repicados para placas de Petri contendo meio Nutriente-ágar e mantidos a 25 °C e fotoperíodo de 12 horas. Após 24 horas, quatro alçadas (40 µL) dos isolados bacterianos foram transferidas para frascos do tipo Erlenmeyers, contendo meio líquido de Nutrient Broth. Os frascos permaneceram por um período de 48 horas sob agitação constante (120 rpm). Após este período, a suspensão de bactérias de cada isolado teve sua concentração padronizada, no espectrofotômetro, para D.O.₅₄₀=0,2 (2 x 10⁵ UFC/mL) e, adicionou-se 8,5 g de NaCl e 10 µL de Tween 80 para cada litro de suspensão bacteriana.

Após 24 horas da última pulverização com os tratamentos, as plantas foram inoculadas por aspersão com suspensão de conídios ajustada para 1x10⁴ conídios mL⁻¹ de dois isolados de *Colletotrichum* spp., Col01 e Col156. Para a obtenção dos conídios os isolados de *Colletotrichum* spp. foram repicados para placas de Petri contendo meio de cultura Aveia-ágar (40 g L⁻¹ de farinha de aveia; 16 g L⁻¹ de ágar; 1000 mL de água destilada), as placas foram mantidas a 25 ± 2 °C durante oito dias. Depois da inoculação foram feitas câmaras úmidas individuais para cada muda, com sacos plásticos transparentes contendo umidade e presos ao vaso com o auxílio de elásticos de borracha. Posteriormente, as mudas foram transferidas para câmaras de crescimento Conviron® a 25 °C e fotoperíodo de 12 horas.

Considerou-se um delineamento inteiramente ao acaso, com 4 mudas por tratamento. Realizou-se a contagem de lesões típicas causadas por *Colletotrichum* spp. diariamente durante 12 dias em todas as folhas da muda. O experimento foi repetido por duas vezes.

3.2.5 Análise dos dados

A partir dos dados de germinação calculou-se a porcentagem de inibição da germinação de conídios do patógeno ocasionada pelos tratamentos em relação a testemunha. Para os dados dos ensaios de cultivo pareado e ação de compostos antifúngicos voláteis foram calculados o índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) conforme fórmula descrita Maguire (1962) e adaptada por Oliveira (1991):

$$IVCM = \frac{\sum (D - D_a)}{N}$$

IVCM= índice de velocidade de crescimento micelial

D= diâmetro médio atual da colônia

D_a= diâmetro médio da colônia do dia anterior

N= número de dias após a inoculação

Para os ensaios de termoestabilidade de metabólitos, cultivo pareado e ação de compostos antifúngicos voláteis foi também mensurado o diâmetro no 11º dia. Para os testes realizados *in vitro*, as homogeneidades das variâncias foram verificadas pelo teste de Bartlett, em seguida os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), verificando-se o efeito de tratamentos pelo teste F para todos os ensaios. As médias foram, quando o teste F foi significativo, comparadas pelo teste de Tukey (P < 0,05). As análises foram feitas no software ASSISTAT 7.6 beta.

Para os dados de incidência e número de lesões no ensaio de ação de isolados bacterianos nos componentes do monociclo foram calculadas a área abaixo da curva do progresso da incidência (AACP_{inc}) e do número de lesões (AACP_{nl}), somando-se as áreas trapezoidais (CAMPBELL e MADDEN, 1990), baseado na fórmula: AACP = $\sum (y_i + y_{i+1})/2 * (t_{i+1} - t_i)$, onde: n = número de avaliações; y = incidência (%)/número de lesões; t = tempo (dias); a incidência final (I_f) e o número de lesões final (NL_f) (última avaliação) e o período de incubação (PI). Considerou-se como PI o tempo entre a inoculação e o aparecimento dos sintomas em 50% das mudas de cada tratamento. Para atender as

pressuposições da análise de variância foi feita transformação raiz cúbica de $(x+0,01)$ para os dados de AACPnl e de NL_t do isolado Col01 no experimento 1 e para os dados de AACPnl do isolado Col156 no experimento 2, e 1/raiz quadrada de $(x+0,1)$ para os dados de AACPinc do isolado Col01 no experimento 1. Em seguida procedeu-se análises de variâncias (ANOVA), verificando-se efeito de tratamentos pelo teste F. Os efeitos, quando significativos, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Foram, também, ajustados os modelos não lineares monomolecular ($y=1-(1-y_0).exp(-r.t)$) para incidência e logístico ($y=1/(1+exp((y_0-t)/r))$) para número de lesões, em que 'y' corresponde a incidência/número de lesões da doença, ' y_0 ' o inóculo inicial, ' r ' a taxa de progresso da doença e ' t ', o tempo em dias após a primeira avaliação, comparando-se os parâmetros estimados para os modelos entre os tratamentos pelo teste t-Student ($p < 0,05$) conforme proposto por Madden, Hughes e Van Den Bosch (2007). As análises foram feitas no software R, versão 2.13.2 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2011).

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Obtenção e identificação dos isolados bacterianos

Na análise cromatográfica, foi realizada uma leitura de branco, não tendo sido observado nenhum sinal referente a ésteres de ácidos graxos. A injeção de um padrão obteve índice de similaridade (IS) igual a 0,999 o que garante a confiabilidade dos dados obtidos. As análises resultaram na identificação dos microrganismos, com os índices de similaridade apresentados na Tabela 1.

Os isolados bacterianos A68 e C12 foram identificados através de cromatografia gasosa, obtendo índices de similaridade (IS) de 0,776 e 0,601, respectivamente (Tabela 1). O IS do isolado bacteriano C02 foi de 0,362, portanto a identificação inicial como *Paenibacillus macerans* por cromatografia gasosa não pôde ser considerada. Este isolado foi, então, identificado utilizando-se de análise molecular.

Os fragmentos do gene RNA ribossomal 16S foram amplificados com sucesso a partir do DNA genômico extraído das amostras. A sequencia parcial do gene RNA ribossomal 16S obtida para o isolado C02 está apresentada na Figura 1 e apresentou 100%

de similaridade com sequências do gene RNA ribossomal 16S de linhagens de *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus methylotrophicus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus vallismortis* e *Bacillus siamensis* contidas nas bases de dados consultadas.

A árvore filogenética construída a partir das sequências recuperadas da base de dados do GenBank e do isolado C02 (Figura 2) recuperou o isolado C02 em um agrupamento coeso suportado por alto valor de re-amostragem (85%) juntamente com as linhagens tipo de *Bacillus amyloliquefaciens* e *Bacillus methylotrophicus*, não sendo possível a identificação em nível de espécie. Neste caso, a gene RNAr 16S se mostrou muito conservado entre as espécies de *Bacillus* analisadas, não oferecendo resolução para discriminação em nível de espécie.

3.3.2 Obtenção e identificação dos isolados de *Colletotrichum* spp.

Na caracterização molecular por PCR espécie específica utilizando iniciador desenvolvido por Afanador-Kafuri *et al.* (2003) para identificação de *C. acutatum*, o isolado Col156 apresentou banda de amplificação de aproximadamente 490 pares de base (pb) quando utilizado o iniciador específico Caint2 em conjunto com o ITS4, o que o identificou como pertencente ao complexo *C. acutatum* (Figura 3).

Para a identificação mais refinada do isolado Col01 foi realizado o sequenciamento da Região ITS1 – 5,8S – ITS2 do rDNA. As sequências de nucleotídeos foram comparados com sequências disponíveis no GenBank fazendo uso do programa BLASTX. Foi possível obter 99% de similaridade com espécies de *C. simmondsii* causando antracnose em aipo no Japão (FUJINAGA *et al.*, 2011), frutos de oliveira (*C. europaea*) na Grécia, Itália, Sul da Espanha e Portugal (FAEDDA *et al.*, 2011) e *G. acutata* em morango (FREEMAN *et al.*, 2001).

A sequência de rDNA do isolado Col01 de aproximadamente 560 pb foi alinhada com sequências de espécies pertencentes ao complexo *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* identificados recentemente por Damm *et al.* (2012) e Weir, Johnson e Damm (2012), respectivamente por meio de análise multigênica. Para análise foi incluído o outgroup (*C. orchidophilum* CBS 632.80).

A árvore de Neighbor-Joining (Figura 4) e a árvore de Máxima Parcimônia (Figura 5) confirmam a identificação do isolado como pertencente ao grupo *C. acutatum*.

Entretanto, há variabilidade na sequência quando comparado com as sequências analisadas neste complexo.

3.3.3 Modo de ação de *Bacillus* sp., *Bacillus alcalophilus* e *Pseudomonas putida*

O isolado C02 (*Bacillus* sp.) foi o único antagonista capaz de inibir a germinação de conídios de *Colletotrichum* do grupo *acutatum* nas três concentrações testadas quando comparado com a testemunha. Nas concentrações de D.O. (540 nm) = 0,05 e 0,25 a inibição foi maior (67,5 e 66,5%, respectivamente) que na concentração D.O. (540 nm) = 0,01 (27,00%) (Tabela 2).

Pseudomonas putida e *Bacillus alcalophilus* inibiram significativamente a germinação dos conídios quando comparados a testemunha, apenas na concentração D.O. (540 nm) = 0,25. A inibição foi de 28,5% e 22,5%, respectivamente. No entanto, nesta mesma concentração *Bacillus* sp. inibiu 38 e 44% a mais a germinação dos conídios (Tabela 2).

Em cultivo pareado de colônias, *Bacillus alcalophilus*, *Bacillus* sp. e Serenade® reduziram o índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) e o diâmetro máximo de colônias de *Colletotrichum* do grupo *acutatum* em relação a testemunha. O isolado A68 (*Pseudomonas putida*) não inibiu o crescimento micelial de *Colletotrichum* do grupo *acutatum* em cultivo pareado (Tabela 3).

O teste visando o controle do crescimento micelial de *Colletotrichum* do grupo *acutatum* por compostos antifúngicos termoestáveis evidenciou a produção deste tipo de composto apenas no produto comercial a base de *Bacillus subtilis* (Serenade®). *Colletotrichum* do grupo *acutatum* teve o seu crescimento micelial estimulado pela presença de compostos termoestáveis produzidos por *Pseudomonas putida*, *Bacillus* sp. e *Bacillus alcalophilus* (Tabela 4).

O teste visando o controle do crescimento micelial de *Colletotrichum* do grupo *acutatum* por compostos antifúngicos voláteis evidenciou a produção deste tipo de composto por *Bacillus alcalophilus* e *Bacillus* sp. Estes dois antagonistas reduziram em 16% o IVCM de *Colletotrichum* do grupo *acutatum* em relação a testemunha. No tratamento com Serenade® não foi evidenciada a produção de compostos voláteis capazes de inibir o crescimento micelial de *Colletotrichum* do grupo *acutatum* (Tabela 5).

3.3.4 Influência de isolados bacterianos no monociclo da mancha foliar de *Glomerella*

A evolução do número de lesões de MFG foi mais lenta em mudas de macieira 'Gala' tratadas com *Bacillus* sp. (C02) e inoculadas com o isolado de *Colletotrichum* do grupo *acutatum* Col01, quando comparada aos outros tratamentos. Já em mudas inoculadas com o isolado de *Colletotrichum* do grupo *acutatum* Col156, a evolução no número de lesões de MFG foi menor para os tratamentos com Serenade® e *P. putida*, sendo que no experimento 1, o tratamento com *P. putida* chegou a formar menos de uma lesão em média (Figura 6).

Não houve diferença significativa entre os tratamentos para a incidência final (I_f) e para a área abaixo da curva do progresso da incidência (AACPinc) para os dois isolados testados em nenhum dos experimentos (Tabela 6).

O número de lesões final (NL_f) e a área abaixo da curva do progresso do número de lesões (AACPnl) verificadas em mudas de macieira 'Gala' pulverizadas com antagonistas biológicos só apresentaram diferença significativa entre os tratamentos para o isolado de *Colletotrichum* do grupo *acutatum* Col156 no experimento 2. No entanto, o único tratamento que diferiu significativamente do controle, foi Serenade® para AACPnl (Tabela 7).

O período de incubação (PI) variou de dois a cinco dias considerando os dois isolados em ambos os experimentos. O comportamento, em relação ao PI, foi semelhante entre os isolados de *Colletotrichum* do grupo *acutatum*, para o isolado Col01 o PI variou em média, entre os tratamentos, de três a quatro dias (Figura 7) e, para o isolado Col156 o PI variou em média, entre os tratamentos, de três a três dias e meio (Figura 8).

O modelo monomolecular foi o que melhor se ajustou aos dados de progresso da incidência da MFG (*Colletotrichum* do grupo *acutatum*) em mudas de macieira 'Gala' em todos os tratamentos (Figura 9), com coeficiente de determinação (R^2) acima de 88%.

O modelo logístico foi o que melhor se ajustou para o progresso do número de lesões da MFG (*Colletotrichum* do grupo *acutatum*) em mudas de macieira 'Gala' em todos os tratamentos (Figura 10), com coeficiente de determinação (R^2) acima de 87%.

Na comparação das estimativas dos parâmetros referentes aos dados de incidência do isolado Col01, a assíntota máxima ($y_{m\acute{a}x}$) nos dois experimentos foi significativamente inferior ao controle em mudas tratadas com *Bacillus* sp. e, a taxa (r) nos dois experimentos foi significativamente inferior ao controle em mudas tratadas com Serenade®. Para o

mesmo isolado na comparação das estimativas dos parâmetros referentes aos dados de número de lesões, a $y_{m\acute{a}x}$ nos dois experimentos foi significativamente inferior ao controle em mudas tratadas com *Bacillus* sp. e *B. alcalophilus* (Tabela 8).

Na comparação das estimativas dos parâmetros referentes aos dados de incidência do isolado Col156, o inóculo inicial (y_0) não apresentou diferença significativa em comparação com o controle para a maioria dos tratamentos, com exceção *Bacillus* sp. no experimento 1. Para o mesmo isolado na comparação das estimativas dos parâmetros referentes aos dados de número de lesões, a $y_{m\acute{a}x}$ nos dois experimentos foi significativamente inferior ao controle em mudas tratadas com Serenade® (Tabela 9).

As diferenças, significativas ou não, entre parâmetros epidemiológicos comparados entre todos os tratamentos testados estão especificadas no Apêndice 1, para o isolado Col01, e no Apêndice 2, para o isolado Col156.

3.4 DISCUSSÃO

Isolados de *Bacillus* e o produto comercial a base de *B. subtilis* tiveram potencial para o controle biológico *in vitro* e *in vivo* de *Colletotrichum* do grupo *acutatum*. *In vitro*, esta bactéria foi capaz de reduzir a germinação do patógeno, o índice de velocidade de crescimento micelial em cultivo pareado e quando exposto aos compostos voláteis. *In vivo* reduziu o número de lesões no monociclo e a quantidade máxima de doença ($y_{m\acute{a}x}$), quando comparado com o controle. Observou-se diferença no modo de ação entre isolados de *Bacillus* e também em relação ao efeito no controle sobre diferentes isolados do patógeno.

A identificação molecular por PCR espécie-específica do isolado Col156 indicou que o mesmo pertence ao complexo *C. acutatum*, pois o mesmo apresenta 490 pb. A identificação por PCR espécie-específica para identificação molecular de isolados de *Colletotrichum* spp. mostra-se eficiente para caracterização de isolados dos complexos *C. acutatum*, *C. gloeosporioides* e *C. boninense*. Esta metodologia é rápida e exige menos equipamentos e conhecimento na área molecular quando comparada a metodologia de sequenciamento e, além disso, gera a mesma informação do sequenciamento da região ITS1, que permite simplesmente agrupar os isolados nos complexos sem identifica-los a nível de espécie.

O sequenciamento da região ITS1 do isolado Col01 mostra que quando a sequência

de nucleotídeos deste isolado é comparada com as sequências depositadas no GenBank, apresenta 99% de similaridade com espécies de *Colletotrichum* sp. (Nº de acesso no GenBank HM038361), *C. simmondsii* (AB618089 e JN121203) e *G. acutata* (EF622180). Entretanto quando analisada em conjunto com sequências de espécies pertencentes ao complexo *C. acutatum* (DAMM *et al.*, 2012) e *C. gloeosporioides* (WEIR, JOHNSON e DAMM, 2012) pode-se inferir que o isolado Col01 faz parte do complexo *C. acutatum*.

A região de ITS1 dos isolados de *Colletotrichum* sp. (HM038361) e *C. simmondsii* (AB618089 e JN121203) mostra uma inserção de 13 pares de bases. Se esta inserção for retirada das sequências destes isolados, estes agrupam-se no mesmo sub clado (dados não mostrados). Indicando que o estudo da região ITS1 é importante para identificação de isolados do complexo *C. acutatum*, entretanto, não é capaz de identificar a nível de espécie.

Para certificar que Col01 representa uma espécie distinta do complexo *C. acutatum* sugere-se que seja realizada uma análise multigênica complementar, além da possibilidade de incluir mais isolados para serem estudados. Segundo Damm *et al.* (2012), a análise multigênica com as regiões dos genes TUB2 e GAPDH foi capaz de resolver 29 subclados de espécies do complexo *C. acutatum* enquanto as sequencias ITS só eram capazes de resolver 11 deles.

O produto comercial Serenade®, a base de *Bacillus subtilis*, teve como principal modo de ação a produção de metabólitos termoestáveis, inibindo em 100% o crescimento micelial de *Colletotrichum* do grupo *acutatum*. Concordando com esses resultados, Moretto (2000) estudando isolados de *Bacillus* spp. obtidos de citros, verificou que estes mantiveram atividade antifúngica mesmo após autoclavagem e, Micheref, Silveira e Mariano (1994), testando isolados de *Bacillus subtilis* obtidos do solo contra *Colletotrichum graminicola*, determinaram que os metabólitos oriundos da bactéria eram termoestáveis, difusíveis, não-voláteis e inibiram o crescimento do fungo.

Na literatura são encontrados vários mecanismos envolvidos no controle de doenças de plantas por *Bacillus* spp., tais como, competição por espaço e nutrientes, indução de resistência sistêmica, produção de sideróforos e antibiose, sendo este último o principal deles (THOMASHOW e WELLER, 1996). Por exemplo, a produção por *B. subtilis* de metabólitos antifúngicos voláteis demonstrou ser um importante modo de ação contra doenças causadas por *Fusarium* spp. e *Rhizoctonia solani* (FIDDMAN e ROSSALL, 1994). Do mesmo modo, neste estudo, *Bacillus* sp. e *Bacillus alcalophilus* obtidos do filoplano da macieira, tiveram a produção de metabólitos antifúngicos voláteis

como um dos principais modos de ação contra *Colletotrichum* do grupo *acutatum* nos testes *in vitro*.

Leifert (1995) estudou duas espécies de *Bacillus*, *B. subtilis* CL27 e *B. pumilus* CL45, e relatou que a atividade exercida *in vivo* contra *Botrytis cinerea* por *B. subtilis* CL27 era devida à produção de antibióticos peptídicos, pois mutantes dessa espécie, incapazes de produzir o antibiótico, deixavam de apresentar atividade contra esse patógeno. De forma semelhante, Pichard, Larue e Thouvenot (1995) relataram que a atividade *in vitro* contra *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, apresentada por *B. polymyxa*, era devido a produção de dois antibióticos peptídicos, gavaserina e satavalina. Dentre os diversos metabólitos produzidos por *Bacillus* spp., os principais responsáveis pela ação antagônica são os antibióticos peptídicos que controlam fungos e bactérias fitopatogênicas, incluindo *Erwinia amylovora*, agente da queima das rosáceas (ABO-ELDAHAB e EL-GOORAMI, 1964) e *Uromyces phaseoli*, causador da ferrugem do feijoeiro (BAKER e STAVELY, 1985), além de *Rhizoctonia solani*, *Pythium* spp., *Fusarium* spp. e *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (MELO, 1998; PUSEY, 1989). Os isolados bacterianos obtidos do filoplano da macieira ainda não tiveram os compostos antifúngicos identificados, sendo este um importante estudo a ser realizado em próximos trabalhos.

Além de *Bacillus* sp., *Pseudomonas putida* e *Bacillus alcalophilus* também inibiram a germinação de *Colletotrichum* do grupo *acutatum* associado a MFG, no entanto, a porcentagem de inibição foi menor e só ocorreu na maior concentração testada, sendo necessário testes com concentrações maiores para verificar se o efeito inibitório pode ser intensificado. A inibição de germinação de esporos por procariotas residentes do filoplano *in vitro* já havia sido observada por Hetherington *et al.* (1995) os quais encontraram um isolado que suprimiu em 95% a germinação de conídios de *Colletotrichum gloeosporioides*. Parbery (1981) e Robbs (1986) relataram que certos *Bacillus* spp. apresentavam ação lítica às paredes de esporos de ferrugens em diversos estádios. Possivelmente, este fato possa ser explicado pelos estágios iniciais da germinação, quando o esporo absorve grandes quantidades de água (ALEXOPOULOS, MIMS e BLACKWELL, 1996) e com esta, metabólitos tóxicos produzidos pelas bactérias.

Além do efeito inibitório da germinação de conídios de *Colletotrichum* do grupo *acutatum* pelos isolados bacterianos do filoplano da macieira, foram observados, também, redução do crescimento micelial do patógeno, com diferenças desta redução entre os isolados bacterianos. *Bacillus* sp. e *Bacillus alcalophilus* reduziram o índice de velocidade

de crescimento micelial de *Colletotrichum* do grupo *acutatum* em cultivo pareado e em contato com compostos antifúngicos voláteis, no entanto, a bactéria *Pseudomonas putida* não foi capaz de reduzir este índice em comparação com a testemunha. Do mesmo modo, Fuga *et al.* (2011) avaliaram a inibição do crescimento micelial de *C. gloeosporioides*, causando podridão em frutos, por diversos isolados bacterianos obtidos de amostras de solo e concluíram que os isolados apresentaram uma enorme variação quanto a atividade antifúngica *in vitro* contra o patógeno.

O potencial antagônico de *Bacillus* spp. foi observado, também, por Bonatelli (2012) que isolou de folhas de guaranazeiro diversos gêneros de bactérias epifíticas, sendo que os isolados que apresentaram maior porcentagem de inibição do patógeno *Colletotrichum* spp., agente causal da antracnose, foram do gênero *Bacillus*. Do mesmo modo, Kim e Chung (2004) relataram atividade antagônica de um isolado de *B. amyloliquefaciens* através da produção de proteína antifúngica contra o fitopatógeno *C. lagenarium*.

Chen *et al.* (2008) identificaram 14 compostos voláteis antifúngicos a partir de *Bacillus subtilis* que inibiram o desenvolvimento de *Botrytis cinerea*, agente causal do mofo cinzento em frutas e vegetais. Entre as bactérias, cepas de *Bacillus subtilis* podem produzir mais de 24 substâncias antifúngicas com uma variedade considerável de estruturas (STEIN, 2005). Bactérias isoladas da raiz da canola e da palha e de raízes da soja produziram voláteis que são inibidores da sobrevivência (escleródios), infecção (micélio) e reprodução (ascósporos) de *Sclerotinia sclerotiorum* sendo que, das 14 bactérias testadas, 12 isolados apresentaram médio a altos níveis de produção de compostos voláteis antifúngicos (FERNANDO *et al.*, 2005). Apesar de existirem estudos e resultados satisfatórios do efeito de compostos voláteis produzidos por bactérias antagonistas sobre patógenos de pós-colheita e de solo, este potencial pode ser reduzido quando consideramos patógenos da parte aérea. Os isolados bacterianos do filoplano da macieira do gênero *Bacillus* foram capazes de produzir compostos antifúngicos voláteis reduzindo o índice de velocidade de crescimento micelial de *Colletotrichum* do grupo *acutatum in vitro*. No entanto, o efeito destes compostos no campo ficaria comprometido devido a sua natureza volátil sendo importante o estudo de formulações.

Kupper, Gimenes-Fernandes e Goes (2003) obtiveram isolados de *Bacillus subtilis* e *Bacillus* spp. de folhas e flores de plantas cítricas e constataram que todos os isolados provocaram inibição no crescimento micelial de *Colletotrichum acutatum* devido, possivelmente, a metabólitos produzidos pelas bactérias. Alguns isolados ainda revelaram

a produção de metabólitos termoestáveis mantendo sua atividade antagônica mesmo após a autoclavagem. A característica de termoestabilidade dos metabólitos não foi observada para os isolados obtidos do filoplano da macieira. *Bacillus* sp. e *Bacillus alcalophilus* produzem compostos antifúngicos, mas são possivelmente degradados após a autoclavagem, pois o crescimento micelial não foi reduzido na presença do caldo autoclavado destas bactérias. Assim, estes resultados sugerem que isolados de *Bacillus* spp. podem produzir metabólitos com propriedades e talvez modos de ação diferentes.

A constatação da produção de substâncias inibidoras à *Colletotrichum* do grupo *acutatum*, produzidas por isolados bacterianos do filoplano da macieira, é importante para o entendimento do mecanismo de ação de tal antagonismo, possibilitando, dessa forma, o controle da doença pelo uso das substâncias produzidas e, não apenas pela introdução massal dos agentes de biocontrole. Além disso, o estudo do potencial antagônico *in vitro* é importante para direcionar escolhas de metodologias a serem utilizadas em futuros ensaios de campo.

No ensaio para verificar a influência de isolados bacterianos no monociclo da MFG não foram observadas diferenças significativas dos tratamentos que utilizaram as bactérias do filoplano e Serenade® com os tratamentos controle e com aplicação de água para AACPinc, AACPsev e na S_f e I_f da doença. No entanto, foi possível observar a diferença entre os tratamentos após o ajuste de modelos e a comparação entre os parâmetros epidemiológicos estimados. Jeger (2004) afirmou que análises do progresso da doença oferecem informações importantes no desenvolvimento de epidemias e ações de controle da doença, mas salientou que o aspecto mais importante para se obter comparativos entre tratamentos e interpretações dos efeitos biológicos num sistema são as estimativas de parâmetros epidemiológicos obtidos de modelos não lineares.

O período de incubação (PI), de *Colletotrichum* do grupo *acutatum*, não variou muito entre os tratamentos e, na comparação dos parâmetros referentes aos dados de severidade, um detalhe importante que pode ser observado é que, o y_0 não difere do tratamento controle na maioria dos casos e, mesmo com um aumento em r , a quantidade de doença final não aumenta. Provavelmente, a cobertura dos tratamentos na superfície da folha não foi perfeita, o que pode explicar PI's e y_0 semelhantes. Apenas nas mudas inoculadas com o isolado Col156, no experimento 1, houve uma diminuição significativa do y_0 em todos os tratamentos e, mesmo com um aumento na taxa, a doença foi menor no final das avaliações, com exceção do tratamento com *P. putida*. Desta forma, o y_0 é um importante parâmetro a ser avaliado quando se estuda o monociclo de uma doença, pois de

acordo com Bergamin Filho (2011) no monociclo, o aumento dos sintomas se deve principalmente a quantidade de inóculo que chega na superfície da planta. No entanto, a MFG é uma doença policíclica e, o aumento dos sintomas se deve principalmente aos ciclos secundários do patógeno no hospedeiro e não apenas ao inóculo inicial (BERGAMIN FILHO, 2011). Assim, estudando o monociclo, pode-se perceber que é importante a aplicação preventiva de agentes de controle biológico na superfície da planta para evitar a infecção primária.

3.5 CONCLUSÕES

(i) Os isolados do filoplano da macieira foram identificados como *Bacillus* sp., *Bacillus alcalophilus* e *Pseudomonas putida*.

(ii) Os dois isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de folhas de macieira de pomar comercial na região metropolitana de Curitiba foram identificados como espécies pertencentes ao complexo *acutatum*.

(iii) *Bacillus* sp. inibiu em mais de 60% a germinação de *Colletotrichum* do grupo *acutatum*.

(iv) *Bacillus* sp. e *Bacillus alcalophilus* apresentaram como modo de ação a produção de compostos fixos e voláteis que inibem o crescimento micelial de *Colletotrichum* do grupo *acutatum* isolado de macieira. O principal modo de ação do produto comercial Serenade®, a base de *Bacillus subtilis*, sobre *Colletotrichum* do grupo *acutatum* isolado de macieira foi a produção de metabólitos termoestáveis capazes de inibir o crescimento micelial em 100%.

(v) Houve diferença significativa, em relação ao controle, entre os parâmetros epidemiológicos calculados para incidência e severidade no monociclo da MFG em mudas tratadas com bactérias isoladas do filoplano da macieira e com Serenade®.

REFERÊNCIAS

- ABO-EL-DAHAB, M. K.; EL-GOORANI, M. A. Antagonistic Effect of a *Bacillus subtilis* Strain upon *Erwinia amylovora*. **Phytopathological Notes**, v.54, p.1285-1286, 1964.
- AFANADOR-KAFURI, L.; MINZ, D.; MAYMON, M.; FREEMAN, S. Characterization of *Colletotrichum* isolates from tamarillo, pasiflora and mango in Colombia and identification of a unique species from genus. **Phytopathology**, v.93, n.5, p.579-587, 2003.
- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. 4. ed. New York: John Wiley & Sons, 1996.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v.25, p.3389-3402, 1997.
- BAKER, C. J.; STAVELY, J. R. Biocontrol of Bean Rust by *Bacillus subtilis* Under Field Conditions. **Plant Disease**, v.69, n.9, p.770-772, 1985.
- BECKER, W. F.; KATSURAYAMA, Y.; BONETI, J. I. S. Mancha foliar da Gala: principal doença de verão da cultura da macieira. **Agropecuária Catarinense**, v.13, p.14-20, 2000.
- BERGAMIN FILHO, A. **Curvas de progresso da doença**. In: AMORIN, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. (eds). Manual de fitopatologia – Vol. I, princípios e conceitos. 4ªed. Piracicaba- SP: Agronômica Ceres, p.647-666, 2011.
- BLAKEMAN, J. P.; BRODIE, I. D. S. Competition for nutrients between epiphytic microorganisms and germination of spores of plant pathogens and beetroot leaves. **Physiological Plant Pathology**, v.10, p.29-42, 1977.
- BLAKEMAN, J. P.; FOKKEMA, N. J. Potential for biological control of plant diseases on the phylloplane. **Annual Review of Phytopathology**, v.20, p.167-192, 1982.
- BONATELLI, L. B. **Bactérias epifíticas e endofíticas cultivadas e não cultivadas do guaranazeiro e o controle da antracnose**. 84 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - ESALQ/USP, São Paulo, 2012.

BOX, G. E. P.; COX, D. R. An analysis transformation. **Journal of the Royal Statistical Society**, Série B, v.26, p.211-252, 1964.

CAMPBELL, C. L.; MADDEN, L. V. **Introduction to plant disease epidemiology**. New York: John Wiley, 1990.

CHEN, H.; XIAO, X.; WANG, J.; WU, L.; ZHENG, Z.; YU, Z. Antagonistic effects of volatiles generated by *Bacillus subtilis* on spore germination and hyphal growth of the plant pathogen, *Botrytis cinerea*. **Biotechnology Letters**, v.30, p.919-923, 2008.

COOK, R. J.; BAKER, K. F. **The nature and practice of biological control of plant pathogens**. St. Paul: APS Press, 1983.

HOOG, G. S.; GERRITS VAN DEN ENDE, A. H. G. Molecular diagnostics of clinical strains of filamentous basidiomycetes. **Mycoses**, v.41, p.183-189, 1998.

DAMM U.; CANNON P. F.; WOUDEBERG J. H. C.; CROUS P.W. The *Colletotrichum acutatum* species complex. **Studies in Mycology**, v.73, p.37–113, 2012.

DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. II Production of volatile antibiotics. **Transactions of the British Mycological Society**, v.57, p.41- 48, 1971.

FAEDDA, R.; AGOSTEO, G. E.; SCHENA, L.; MOSCA, S.; FRISULLO, S.; MAGNANO DI SAN LIO, G.; CACCIOLA, S. O. *Colletotrichum clavatum* sp. nov. identified as the causal agent of olive anthracnose in Italy. **Phytopathologia Mediterranea**, v.50, p.283–302, 2011.

FERNANDO, W. G. D.; HAMARATH, R.; KRISHNAMOORTHY, A. S.; SAVCHUK, S. Identification and use of potential bacterial organic volatile in biological control. **Soil Biology and Biochemistry**, v.37, p.955-964, 2005.

FIDDMAN, P. J.; ROSSALL, S. Effect of Substrate on the Production of Antifungal Volatiles from *Bacillus subtilis*. **Journal Applied Bacteriology**, v.76, p.395-405, 1994.

FREEMAN, S.; MINQ, D.; MAYMON, M.; ZVERBIL, A. Genetic diversity within *Colletotrichum acutatum* sensu Simmonds. **Phytopathology**, v.91, p.586–592, 2001.

FUGA, C. A. G.; GONÇALVES, D. C.; CUNHA, W. V. Inibição do crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides* por *Bacillus* spp. "in vitro". **Revista do Núcleo Interdisciplinar de Pesquisa e Extensão**, v.8, p.188-194, 2011.

FUJINAGA, M.; YAMAGISHI, N.; OGISO, H.; TAKEUCHI, J.; MORIWAKI, J.; SATO, T. First report of celery stunt anthracnose caused by *Colletotrichum simmondsii* in Japan. **Journal of General Plant Pathology**, v.77, p.243-247, 2011.

GONZÁLEZ, E.; SUTTON, T. B.; CORRELL, J. C. Clarification of the etiology of *Glomerella* leaf spot and bitter rot of apple caused by *Colletotrichum* spp. based on morphology and genetic, molecular and pathogenicity tests. **Phytopathology**, v.96, p.982–992, 2006.

HALL, T. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v.41, p.95-98, 1999.

HETHERINGTON, S. D.; CHAKRABORTY, S.; THOMAS, M.; IRWIN, J. A. G. The relationship between anthracnose severity and populations of bacteria on the phylloplane of the tropical pasture legume *Stylosanthes scabra*. **Biological Control**, v.5, p.39-46, 1995.

JEGER, M. J. Analysis of disease progress as a basis for evaluating disease management practices. **Annual Review of Phytopathology**, v.42, p.61-82, 2004.

KATSURAYAMA, Y.; BONETI, J. I. S. Manejo da mancha da Gala. **Agropecuária catarinense**, v.25, n.2, p.45-51, 2012. Suplemento.

KIM, P. I.; CHUNG, K. Production of an antifungal protein for control of *Colletotrichum lagenarium* by *Bacillus amyloliquefaciens* MET0908. **FEMS Microbiology Letters**, v.234, p.177–183, 2004.

KIMURA, M. A simple model for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v.16, p.111-120, 1980.

KOWATA, L. S.; STRAPASSON, M.; CHALLIOL, M. A.; MAY-DE-MIO, L. L. *Glomerella* leaf spot in apple: validation of proposed diagrammatic scale and efficiency of fungicides. **Ciência Rural**, v.40, n.7, p.1502-1508, 2010.

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

LEBEN, C. Epiphytic microorganisms in relation to plant disease. **Annual Review of phytopathology**, v.3, p.209-230, 1965.

LEIFERT, C. Antibiotic Production and Biocontrol Activity by *Bacillus subtilis* CL27 and *Bacillus pumilus* CL45. **Journal Applied Bacteriology**, v.78, p.97-108, 1995.

MADDEN, L. V.; HUGHES, G.; VAN DEN BOSCH, F. (Eds) **The study of plant disease epidemics**. St. Paul USA. APS Press. 2007.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigours. **Crop Science**, v.2, p.176-177, 1962.

MELO, I. S. Agentes Microbianos de Controle de Fungos Fitopatogênicos. In: MELO, I.S., AZEVEDO, J.L. **Controle Biológico**. Editora Embrapa: Jaguariúna SP, 1998. p.17-30.

MICHEREF, S. J.; SILVEIRA, N. S. S.; MARIANO, R. L. R. Antagonismo de bactérias sobre *Colletotrichum graminicola* e potencial de biocontrole da antracnose do sorgo. **Fitopatologia Brasileira**, v.19, p.541 - 545, 1994.

MILLS, P. R.; SREENIVASAPRASAD, S.; BROWN, A. E. Detection and differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates using PCR. **FEMS Microbiology Letters**, v.98, n.1/3, p.137-144, 1992.

MORETTO, K.C.K. **Controle biológico da queda prematura dos frutos cítricos causada por *Colletotrichum acutatum***. 128 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2000.

OLIVEIRA, J. A. **Efeito do tratamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativas* L.) e pimentão (*Capsicum annanum* L.)**. 111 f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) – Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, 1991.

PARBERRY, D. G. Biology of anthracnoses on leaf surfaces. In: BLAKEMAN, J.P. **Microbial ecology of the phylloplane**. London: Academy Press, 1981. 502p.

PEREIRA, W. V. **Caracterização e identificação molecular de espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose da goiaba no Estado de São Paulo.** 79 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

PICHARD, B.; LARUE, J. P.; THOUVENOT, D. Gavaserin and Saltavalin, new Peptide Antibiotics Produced by *Bacillus polymyxa*. **FEMS Microbiology Letters**, v.133, p.215-218, 1995.

PUNJA, Z. K.; UTKHEDE, R. S. Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. **Trends in Biotechnology**, v.21, p.400-407, 2003.

PUSEY, P. L. Use of *Bacillus subtilis* and Related Organisms as Biofungicides. **Journal of Pest Science**, v.27, p.133-140, 1989.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical Computing.** R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0. Disponível em: <http://www.R-project.org> Acesso em 15 de agosto de 2012.

ROBBS, C. F. Potencialidade de bactérias no biocontrole de doenças de plantas. In: REUNIÃO SOBRE CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS DE PLANTAS, 1., 1986, Campinas. **Anais...** Campinas:Fundação Cargill, 1986. p.17-23.

ROLLEMBERG, C. L. **Mancha das folhas da macieira: caracterização fisiológica dos agentes causais, controle biológico com bactérias residentes de filoplano e sensibilidade dos antagonistas a fungicidas e inseticidas.** 124 f. Dissertação (Mestrado em produção vegetal) - Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Universidade Federal do Paraná, 2008.

ROMEIRO, R. S.; NEVES, D. M. S.; CARVALHO, M. G.; CARRER FILHO, R. Seleção de bactérias residentes de filoplano de tomateiro como agentes de biocontrole de enfermidades da parte aérea da cultura. **Summa Phytopathologica**, v.26, p.220-224, 2000.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v.4, p.406-425, 1987.

STADNIK, M. J.; ARAÚJO, L.; VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M. Estratégias alternativas de controle da mancha foliar de glomerella e da sarna da macieira In: STADNIK MJ (Ed.) **Manejo integrado de doenças da macieira.** Florianópolis, CCA-UFSC, 2009. p.105-126

STEIN, T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. **Molecular Microbiology**, v.56, p.845-857, 2005.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v.24, p.1596-1599, 2007.

THOMASHOW, L. S.; WELLER, D. M. Current concepts in the use of introduced bacteria for biological disease control: mechanisms and antifungal metabolites. In: STACEY, G.; KEEN, N. T. **Plant-Microbe Interactions**. New York : Chapman and Hall, 1996. p.187-235.

THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D. G. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, v.24, p.4876-4882, 1997.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J.; CLUSTAL W. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v.22, p.4673-4680, 1994.

TROTEL-AZIZ, P.; CONDERCHET, M.; BIAGIANTI, S.; AZIZ, A. Characterization of new bacterial biocontrol agents *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Pantoea* and *Pseudomonas* spp. mediating grapevine resistance against *Botrytis cinerea*. **Environmental and Experimental Botany**, v.64, p.21-32, 2008.

VAN SOOLINGER, D.; DE HAAS, P. E. W.; HERMANS, P. W. M.; GROENEN, P.; VAN EMBDEN, J. D. A. Comparison of various repetitive DNA elements as genetics markers for strain differentiation and epidemiology of *M. tuberculosis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.31, p.1987-95, 1993.

WEIR B. S.; JOHNSTON, P. R.; DAMM, U. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. **Studies in Mycology**, v.73, p.115-180, 2012.

WHITE, T. M.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA for phylogenetics. In: INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J. (Eds.). **PCR protocols: a guide to methods and applications**. San Diego: Academic Press, 1990. p. 315-321.

WOUDEBERG, J.H.C.; AVESKAMP, M.M.; GRUYTER, J.; DE SPIERS, A.G.; CROUS, P.W. Multiple *Didymella teleomorphs* are linked to the *Phoma clematidina* morphotype. **Persoonia**, v.22, p.56-62, 2009.

Tabela 1 - Isolado, espécie, índice de similaridade (IS) por cromatografia gasosa, órgão de origem e município de origem de isolados bacterianos obtidos de macieiras da cultivar 'Gala' (*Malus domestica*) para testes de controle biológico da mancha foliar de *Glomerella* em macieira.

Isolado ¹	IS	Espécie	Órgão de origem	Município de origem
A68	0,776	<i>Pseudomonas putida</i>	folha	Porto Amazonas/PR
C02	0,362	<i>Paenibacillus macerans</i>	folha	Campo Largo/PR
C12	0,601	<i>Bacillus alcalophilus</i>	folha	Quatro Barras/PR

¹isolados escolhidos a partir dos resultados obtidos por Rolleberg, 2008.

GGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAG
 CCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGA
 GGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGT
 GATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATA
 GGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGC
 GGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGG
 TTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACC-GGGGAGGGTCATTGGAAACTGGG
 GAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGAT
 GTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAA
 AGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCT
 AAGTGTTAGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGG
 GGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGA
 GCATGTGGTTTAATTCTGAAGCAACGCGAAGAACCCTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACA
 ATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGGCA

Figura 1 - Sequência parcial do *operon* ribossomal 16S do isolado C02 obtido do filoplano da macieira.

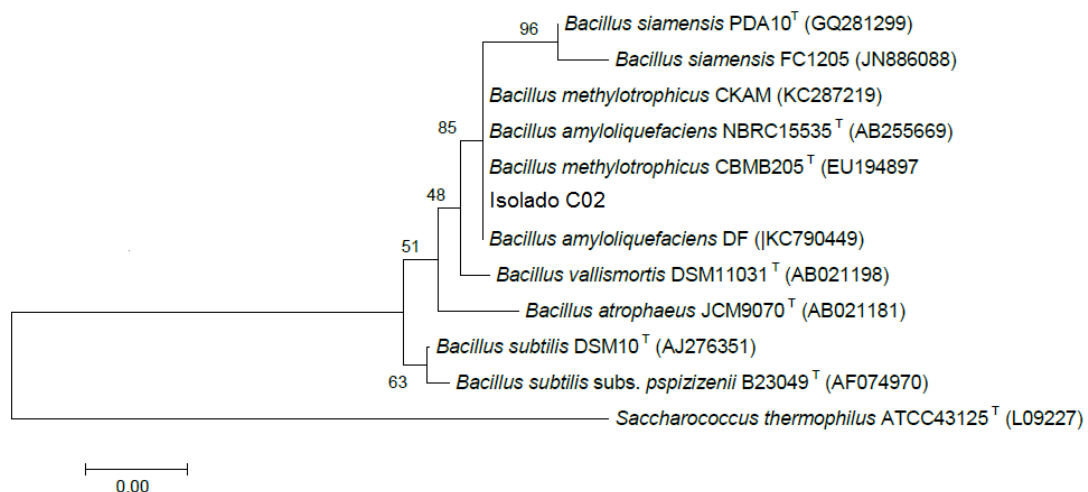


Figura 2 - Árvore filogenética demonstrando as relações evolutivas entre a sequência parcial do gene RNA ribossomal 16S do isolado C02 obtido do filoplano da macieira e sequências de linhagens de microrganismos relacionados presentes nas bases de dados RDP e GenBank.

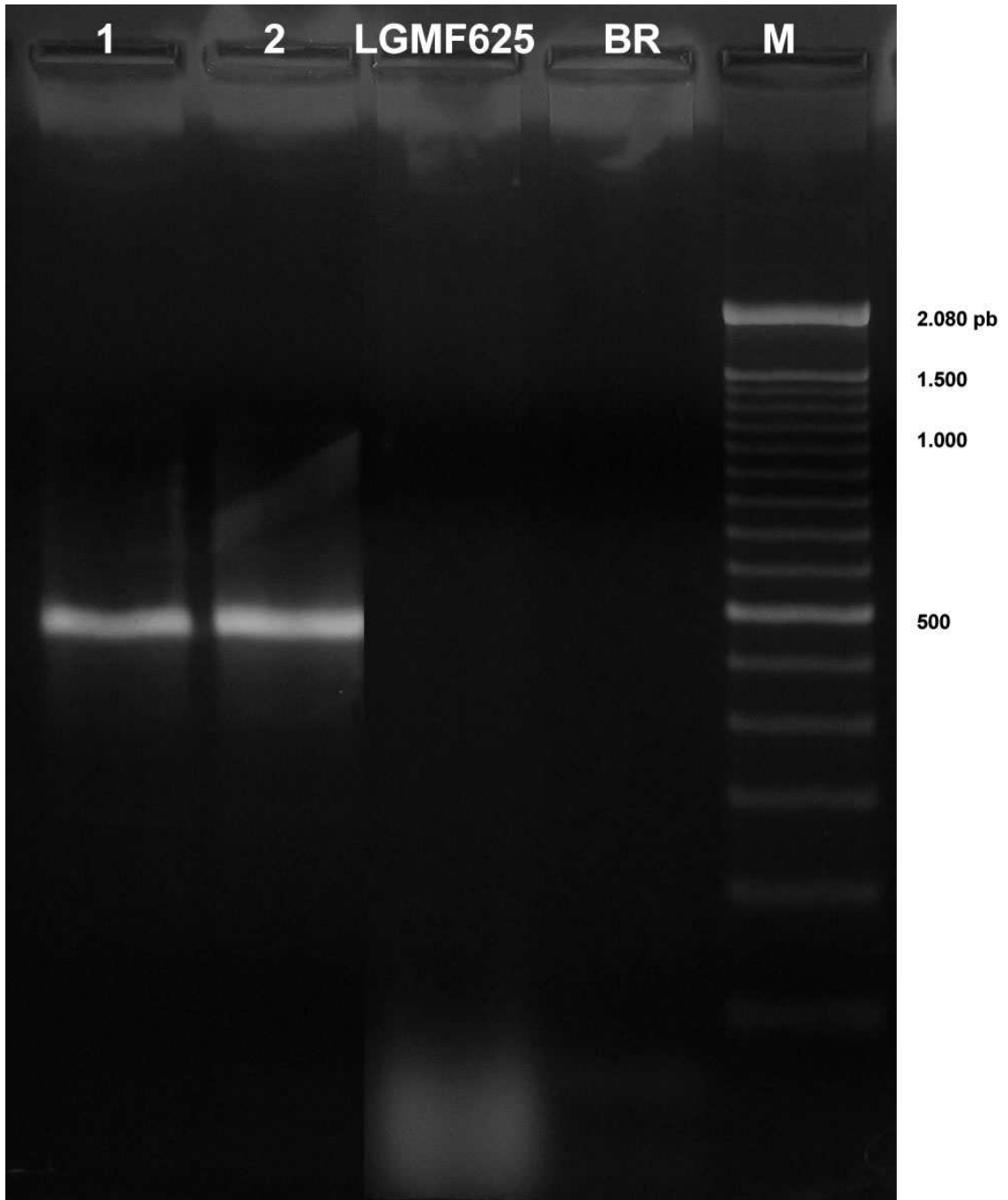


Figura 3 - Fragmentos amplificados por PCR utilizando os oligonucleotídeos CaInt2 e ITS4 observados em gel de agarose 1,5%. Amostras 1 e 2 referentes ao isolado Col156, LGMF625 - linhagem referência de *C. boninense*, BR - controle negativo sem DNA, M - marcador molecular 100 pares de base.

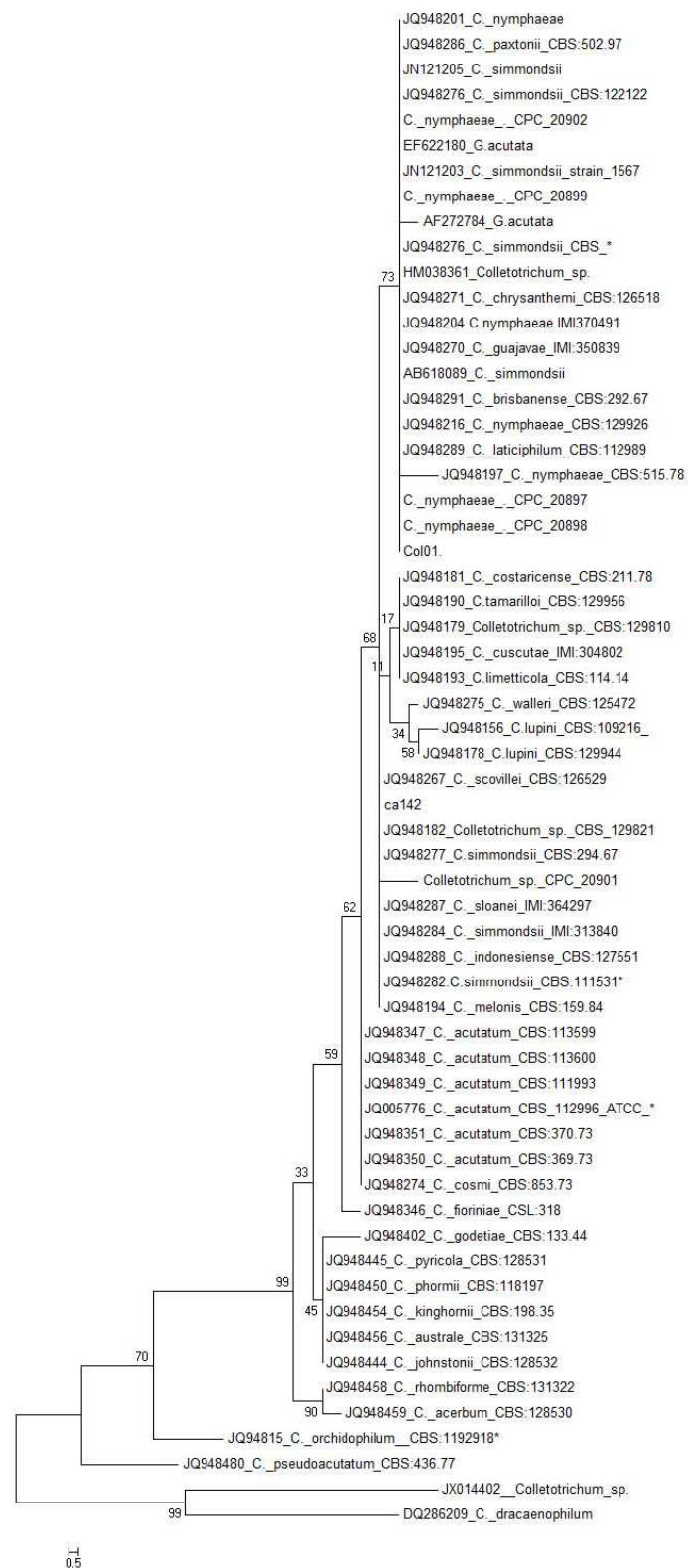


Figura 5 - Relações filogenéticas entre o isolado Col01 obtido de macieira e demais espécies do Complexo *C. acutatum* estudadas com base na máxima parcimônia. Valores acima dos ramos representam os valores de suporte de bootstrap.

Tabela 2 - Inibição da germinação de conídios de *Colletotrichum* do grupo *acutatum* (Col01) (%) após 24 horas em contato com antagonistas biológicos em diferentes concentrações.

Tratamento	Inibição da germinação de conídios (%) ¹		
	Concentração D.O. (540 nm)		
	0,01	0,05	0,25
<i>Pseudomonas putida</i> (A68)	6,5 abB	20,0 bAB	28,5 bA
<i>Bacillus</i> sp. (C02)	27,0 aB	67,5 aA	66,5 aA
<i>Bacillus alcalophilus</i> (C12)	12,0 abA	20,0 bA	22,5 bA
Testemunha	0,0 bA	0,0 bA	0,0 cA

¹ Dados originais, sem transformação; médias seguidas da mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade, CV(%) = 48,48.

Tabela 3 - Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) de *Colletotrichum* do grupo *acutatum* e crescimento máximo da colônia em cultivo pareado com isolados bacterianos.

Tratamento	IVCM ¹	Crescimento máximo da colônia (cm) ¹
Testemunha	0,728 a	3,75 a
<i>Pseudomonas putida</i> (A68)	0,575 ab	3,14 ab
<i>Bacillus alcalophilus</i> (C12)	0,418 b	2,54 bc
Serenade®	0,375 bc	2,11 bc
<i>Bacillus</i> sp. (C02)	0,169 c	1,40 c
CV (%)	24,50	20,63

¹ Dados originais, sem transformação; médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Serenade® = produto comercial a base de *B. subtilis*.

Tabela 4 - Crescimento máximo da colônia de *Colletotrichum* do grupo *acutatum* cultivado em meio de cultura contendo metabólitos termoestáveis de isolados bacterianos.

Tratamento	Crescimento máximo da colônia (cm) ¹
<i>Pseudomonas putida</i> (A68)	4,77 a
<i>Bacillus</i> sp. (C02)	4,39 a
<i>Bacillus alcalophilus</i> (C12)	4,31 a
Testemunha	2,80 b
Serenade®	0,00 c
CV (%)	19,25

¹ Dados originais, sem transformação; médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Serenade® = produto comercial a base de *B. subtilis*.

Tabela 5 - Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) de *Colletotrichum* do grupo *acutatum* e crescimento máximo de colônias sob a influência de compostos voláteis produzidos por isolados bacterianos.

Tratamento	IVCM1	Crescimento máximo da colônia (cm) ¹
Testemunha	0,54 a	3,05 a
Serenade®	0,51 ab	3,00 a
<i>Pseudomonas putida</i> (A68)	0,49 abc	2,78 ab
<i>Bacillus alcalophilus</i> (C12)	0,45 bc	2,62 b
<i>Bacillus</i> sp. (C02)	0,45 c	2,53 b
CV (%)	4,84	4,23

¹ Dados originais, sem transformação; médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Serenade® = produto comercial a base de *B. subtilis*.

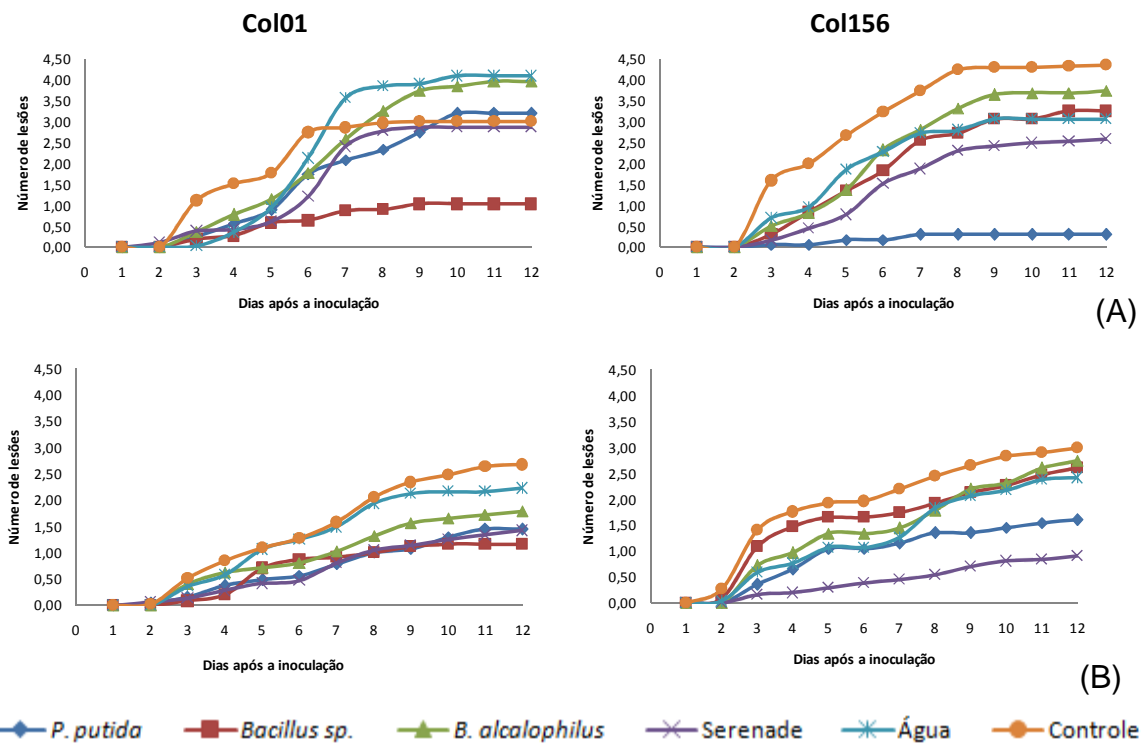


Figura 6 - Média do número de lesões de mancha foliar de *Glomerella* (MFG) observadas em mudas de macieira 'Gala' pulverizadas com antagonistas biológicos semanalmente durante cinco semanas e inoculadas com dois isolados de *Colletotrichum* do grupo *acutatum* (Col01 e Col156). Pontos representam o número de lesões médio em 4 mudas, obtidos por avaliação a partir da inoculação do patógeno. Mudas mantidas em câmara de crescimento Conviron a 25 °C. Avaliações realizados diariamente durante 12 dias. (A) dados do experimento 1, (B) dados do experimento 2. Curitiba/PR.

Tabela 6 - Incidência¹ final (I_f) e àrea abaixo da curva do progresso da incidência (AACPinc) em mudas de macieira 'Gala' pulverizadas com antagonistas biológicos semanalmente durante cinco semanas e inoculadas com isolados de *Colletotrichum* pertencentes ao grupo *acutatum* (Col01 e Col 156). Mudas mantidas em câmara de crescimento Conviron a 25 °C.

Tratamento	Experimento 1				Experimento 2			
	Col01		Col156		Col01		Col156	
	I _f (%)	AACP Inc ²	I _f (%)	AACP inc	I _f (%)	AACP inc	I _f (%)	AACP inc
<i>P. putida</i> (A68)	47,71 ns	373,16 ns	52,96 ns	388,24 ns	65,00 ns	433,48 ns	58,45 ns	449,94 ns
<i>Bacillus sp.</i> (C02)	30,56	221,53	48,61	382,84	65,42	475,00	74,11	558,93
<i>B. alcalophilus</i> (C12)	49,13	416,47	45,42	371,25	58,21	426,79	63,12	481,80
Serenade®	49,04	369,95	49,68	378,31	66,67	411,59	60,71	353,30
Água	53,70	396,05	41,88	354,06	81,93	541,67	76,74	558,51
Controle	56,55	487,80	46,51	409,60	76,29	592,56	81,11	696,11

¹porcentagem de mudas com sintomas. ²dados transformados por $y = \sqrt{x}$. ns = não significativo. Serenade® = produto comercial a base de *B. subtilis*.

Tabela 7 - Número de lesões¹ final (NL_f) e àrea abaixo da curva do progresso do número de lesões (AACPnl) em mudas de macieira 'Gala' pulverizadas com antagonistas biológicos semanalmente durante cinco semanas e inoculadas com isolados de *Colletotrichum* pertencentes ao grupo *acutatum* (Col01 e Col 156). Mudas mantidas em câmara de crescimento Conviron a 25 °C.

Tratamento	Experimento 1				Experimento 2			
	Col01		Col156		Col01		Col156	
	NL _f (%) ³	AACP nl ²	NL _f (%)	AACP nl	NL _f (%)	AACP nl	NL _f (%) ²	AACP NI ^{2,3}
<i>P. putida</i> (A68)	6,25 ns	32,13 ns	2,38 ns	13,19 ns	1,50 ns	9,00 ns	1,50 ab	10,88 ab
<i>Bacillus sp.</i> (C02)	3,25	23,13	1,50	9,63	0,88	5,81	4,50 a	32,00 a
<i>B. alcalophilus</i> (C12)	3,13	21,94	4,88	33,94	1,75	8,38	2,75 ab	17,00 ab
Serenade®	4,50	32,38	3,00	19,75	0,63	3,44	0,75 b	3,88 b
Água	3,50	22,63	2,63	22,81	1,25	8,38	2,88 ab	17,56 ab
Controle	5,38	41,31	2,88	20,06	1,13	9,19	4,25 ab	34,88 a

¹número de lesões por muda. ²médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. ³dados transformados por $y = \sqrt[3]{x}$. ns = não significativo. Serenade® = produto comercial a base de *B. subtilis*.

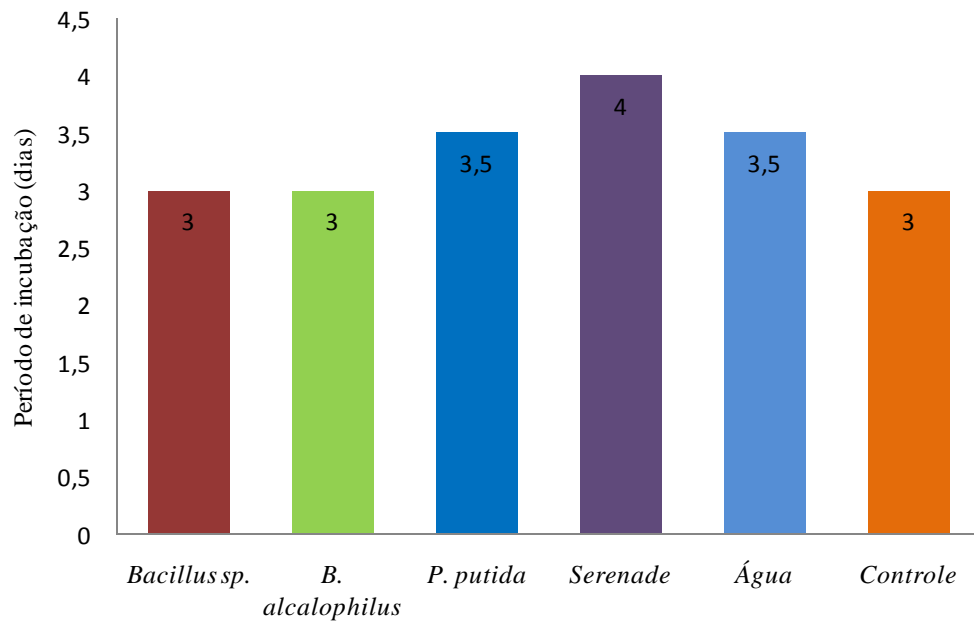


Figura 7 - Período de incubação (PI) médio da MFG em mudas de macieira 'Gala' tratadas com antagonistas semanalmente durante cinco semanas e inoculadas com isolado de *Colletotrichum* do grupo *acutatum* (Col01). Mudas mantidas em câmara de crescimento conviron a 25 °C.

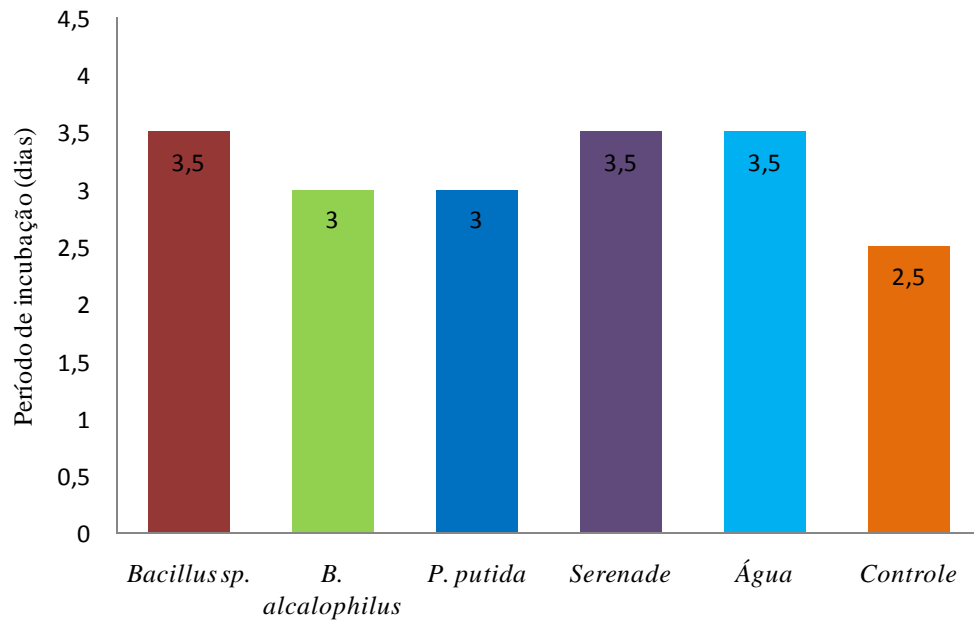


Figura 8 - Período de incubação (PI) médio da MFG em mudas de macieira 'Gala' tratadas com antagonistas semanalmente durante cinco semanas e inoculadas com isolado de *Colletotrichum* do grupo *acutatum* (Col156). Mudas mantidas em câmara de crescimento conviron a 25 °C.

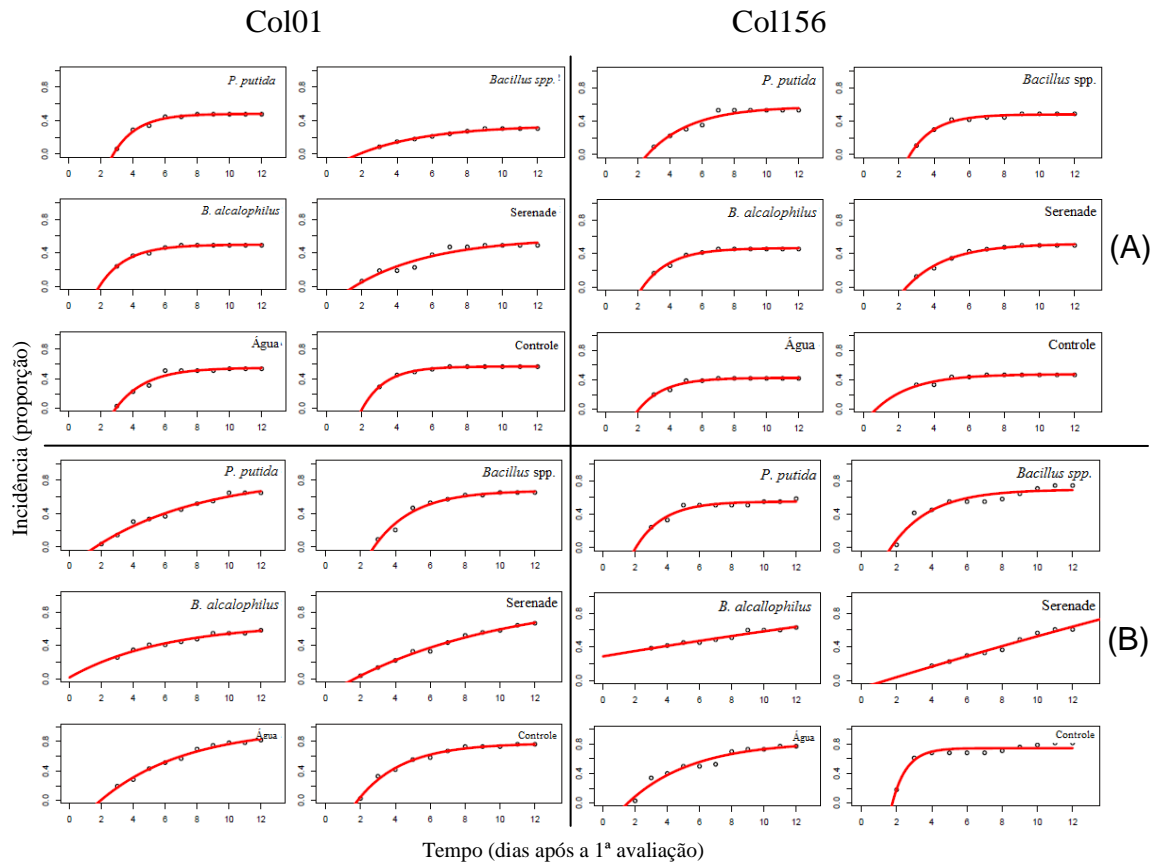


Figura 9 - Curvas de progresso da incidência (% de folhas com sintomas) da MFG em mudas de macieira 'Gala' pulverizadas com antagonistas biológicos semanalmente durante cinco semanas e inoculadas com dois isolados de *Colletotrichum* do grupo *acutatum* (Col01 e Col156). Valor 1 no eixo y do gráfico refere-se a 100% das mudas com sintomas. Pontos representam incidência média em 4 mudas, obtidos por avaliação a partir da inoculação do patógeno, e linhas representam o ajuste ao modelo monomolecular. (A) dados do experimento 1, (B) dados do experimento 2. Curitiba/PR.

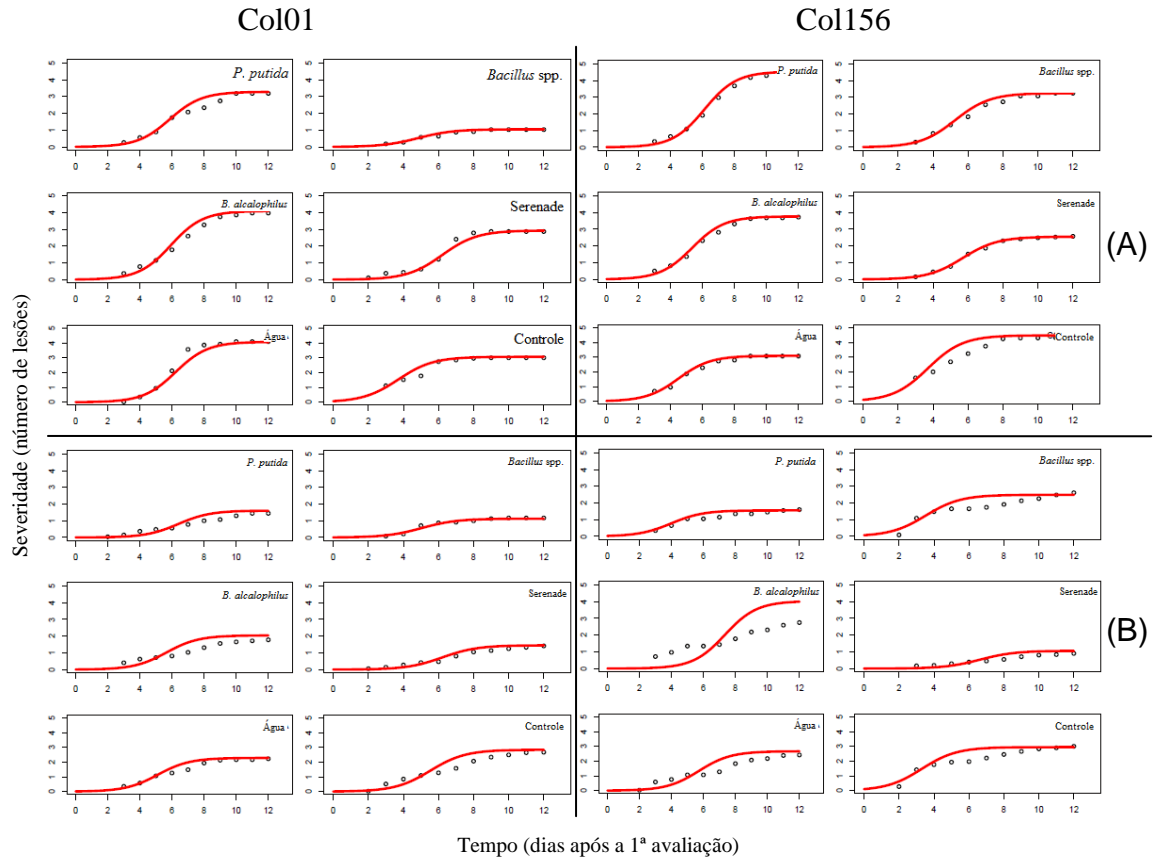


Figura 10 - Curvas de progresso do número de lesões da MFG em mudas de macieira 'Gala' pulverizadas com antagonistas biológicos semanalmente durante cinco semanas e inoculadas com dois isolados de *Colletotrichum* do grupo *acutatum* (Col01 e Col156). Pontos representam severidade média em 4 mudas, obtidos por avaliação a partir da inoculação do patógeno, e linhas representam o ajuste ao modelo logístico. (A) dados do experimento 1, (B) dados do experimento 2. Curitiba/PR.

Tabela 8 - Comparação dos parâmetros epidemiológicos do modelo monomolecular ajustados aos dados de incidência e parâmetros do modelo logístico ajustados aos dados de severidade da MFG em mudas de macieira 'Gala' tratadas com antagonistas biológicos semanalmente durante cinco semanas e inoculadas com isolado de *Colletotrichum* do grupo *acutatum* (Col01). Curitiba/PR.

Tratamento	Estimativas dos Parâmetros Epidemiológicos					
	Experimento 1					
	Incidência			Severidade		
	y_0	r	$y_{m\acute{a}x}$	y_0	r	$y_{m\acute{a}x}$
Controle	-1,640	0,756	0,567	1,334	3,996	3,064
Água	-1,640 ns	0,535 ns	0,550 ns	0,695 *	5,864 *	4,069 *
<i>P. putida</i> (A68)	-2,150 ns	0,676 ns	0,481 *	1,479 ns	6,245 *	3,279 ns
<i>Bacillus</i> sp. (C02)	0,457 *	0,247 *	0,345 *	1,307 ns	5,101 *	1,047 *
<i>B. alcalophilus</i> (C12)	-0,580 ns	0,602 ns	0,498 *	1,349 ns	6,228 *	4,091 *
Serenade®	0,175 *	0,219 *	0,582 ns	0,835 ns	6,028 *	2,928 ns
Experimento 2						
Controle	-0,590	0,387	0,777	1,947	6,199	2,833
Água	-0,420 ns	0,186 *	0,986 *	1,588 ns	5,573 ns	2,281 *
<i>P. putida</i> (A68)	-0,090 *	0,146 ns	0,860 ns	2,071 ns	7,114 ns	1,606 *
<i>Bacillus</i> sp. (C02)	-1,320 ns	0,443 ns	0,677 *	0,881 *	4,911 *	1,123 *
<i>B. alcalophilus</i> (C12)	0,351 *	0,167 *	0,663 ns	2,552 ns	6,593 ns	2,044 *
Serenade®	-0,200 *	0,107 *	1,003 ns	1,664 ns	6,720 ns	1,452 *

ns = Parâmetros estimados não apresentam diferença significativa em relação ao tratamento controle pelo teste t-Student, a 5% de significância. * Parâmetros estimados apresentam diferença significativa em relação ao tratamento controle pelo teste t-Student, a 5% de significância. $y_{m\acute{a}x}$ = assíntota máxima, y_0 = quantidade inicial de doença r = taxa de progresso. Valores estimados pelo modelo monomolecular ($y=1-(1-y_0).exp(-r.t)$) para incidência e logístico ($y=1/(1+exp((y_0-t)/r))$) para severidade.

Tabela 9 - Diferenças entre parâmetros epidemiológicos do modelo monomolecular ajustados aos dados de incidência e parâmetros do modelo logístico ajustados aos dados de severidade da MFG em mudas de macieira 'Gala' tratadas com antagonistas biológicos semanalmente durante cinco semanas e inoculadas com isolado de *Colletotrichum* do grupo *acutatum* (Col156). Curitiba/PR.

Tratamento	Estimativas dos Parâmetros Epidemiológicos					
	Experimento 1					
	Incidência			Severidade		
	y_0	r	y	y_0	r	y
Controle	0,339	0,477	0,474	1,695	4,233	4,471
Água	-0,540 ns	0,625 ns	0,426 *	1,205 *	4,686 *	3,087 *
<i>P. putida</i> (A68)	-0,470 ns	0,362 ns	0,573 *	1,186 *	6,295 *	4,537 ns
<i>Bacillus</i> sp. (C02)	-2,170 *	0,715 ns	0,479 ns	1,306 *	5,528 *	3,243 *
<i>B. alcalophilus</i> (C12)	-0,760 ns	0,577 ns	0,465 ns	1,224 *	5,558 *	3,769 *
Serenade®	-0,500 ns	0,436 ns	0,516 *	1,069 *	5,762 *	2,556 *
Experimento 2						
Controle	-5,400	1,223	0,741	2,079	4,033	2,946
Água	-0,210 ns	0,247 *	0,829 ns	2,249 ns	6,527 *	2,664 ns
<i>P. putida</i> (A68)	-0,800 ns	0,581 *	0,550 *	1,814 ns	4,582 ns	1,555 *
<i>Bacillus</i> sp. (C02)	-0,460 ns	0,443 *	0,693 ns	2,176 ns	4,303 ns	2,487 ns
<i>B. alcalophilus</i> (C12)	-0,950 ns	0,016 *	2,241 ns	4,086 ns	8,753 *	4,037 ns
Serenade®	-4,410 ns	0,012 *	5,321 ns	2,447 ns	7,529 *	1,062 *

ns = Parâmetros estimados não apresentam diferença significativa em relação ao tratamento controle pelo teste t-Student, a 5% de significância. * Parâmetros estimados apresentam diferença significativa em relação ao tratamento controle pelo teste t-Student, a 5% de significância. $y_{máx}$ = assíntota máxima, y_0 = quantidade inicial de doença r = taxa de progresso. Valores estimados pelo modelo monomolecular ($y=1-(1-y_0).exp(-r.t)$) para incidência e logístico ($y=1/(1+exp((y_0-t)/r))$) para severidade.

CAPÍTULO II

Bacillus spp. E *Pseudomonas* sp. NO CONTROLE BIOLÓGICO DA MANCHA FOLIAR
DE *GLOMERELLA* EM MACIEIRA

4 *Bacillus* spp. E *Pseudomonas* sp. NO CONTROLE BIOLÓGICO DA MANCHA FOLIAR DE GLOMERELLA EM MACIEIRA

RESUMO

A mancha foliar de *Glomerella* (MFG) tem grande impacto na cultura da macieira no Paraná, pois a maioria dos pomares do estado são implantados com a cultivar 'Gala' que é muito suscetível a doença. O controle baseado na aplicação de fungicidas protetores resulta em elevado número de pulverizações que pode chegar a 15 por safra. No entanto, as normas de Produção Integrada de Maçã no Brasil limitam o uso de fungicidas por safra, muitas vezes inviabilizando esse sistema, e ainda, considerando-se que o período que antecede a colheita é o mais crítico em relação ao ataque da doença, pode-se afirmar que os tratamentos utilizados atualmente não são eficazes devido às restrições quanto ao período de carência dos fungicidas. Diante disso, o controle biológico torna-se uma opção disponível para controle da doença em associação a produção Integrada e uma alternativa para os produtores na época de colheita dos frutos. Diante do exposto, os objetivos deste trabalho foram: (i) avaliar o potencial de isolados bacterianos do filoplano da macieira no controle da MFG em pomar experimental com inoculação do patógeno; (ii) avaliar o potencial de isolados bacterianos do filoplano da macieira e do produto comercial Serenade® como controle adicional ao químico da MFG, em folhas e em frutos, em pomar comercial sob pressão de inóculo natural. Para isso foram utilizados o pomar experimental da UFPR e um pomar comercial localizado em Campo Largo/PR, ambos da cultivar 'Gala'. A aplicação dos tratamentos foi realizada semanalmente e foram feitas avaliações periódicas de incidência, severidade e desfolha. No pomar comercial foram, também, coletados frutos das plantas tratadas para avaliação da latência da MFG. No pomar experimental os tratamentos obtiveram comportamento diferenciado entre as três safras avaliadas e os isolados bacterianos do filoplano da macieira não apresentaram o mesmo potencial antagônico dos ensaios *in vitro* (CAPÍTULO 1). Em pomar comercial, sob pressão de inóculo natural, as bactérias isoladas do filoplano da macieira não se diferenciaram significativamente da testemunha nas duas áreas avaliadas. O produto comercial Serenade®, a base de *Bacillus subtilis*, não apresentou efeito no controle da MFG em folhas e frutos. Frutos desinfestados e frutos obtidos da área com maior número de aplicações de fungicidas apresentaram menor número de lesões causadas por *Colletotrichum* spp. após 17 dias de incubação.

Palavras-chave: Serenade. *Colletotrichum* spp. Filoplano.

***Bacillus* spp. and *Pseudomonas* sp. in biological control of *Glomerella* leaf spot on apple**

ABSTRACT

The *Glomerella* leaf spot (GLS) has great impact on the apple crop in Paraná, since most of the orchards of the state are deployed with the cultivar 'Gala' which is very susceptible to disease. Control based on the application of protectant fungicides results in a high number of sprays that can reach 15 per season. However, the standards of Integrated Production of Apple in Brazil limit the use of fungicides per crop, often precluding this system, and yet, considering that the period before the harvest is the most critical of the attack of the disease, it can be stated that the treatments used today are not effective due to the restrictions on the grace period of fungicides. Thus, the biological control becomes an option available to control the disease in association with Integrated production and an alternative to the producers at the time of fruit harvest. Given the above, the objectives of this work were: (i) evaluate the potential of bacterial isolates from the phylloplane of the apple tree in the orchard control GLS experimental inoculation with the pathogen, (ii) evaluate the potential of bacterial isolates from the phylloplane of apple and commercial product Serenade® as an additional control to the GLS Chemical, on leaves and fruits in orchard under natural inoculum pressure. For this we used the experimental orchard UFPR and a commercial orchard located in Campo Largo / PR, both cultivar 'Gala'. The spraying was carried out weekly and periodic evaluations were made for incidence, severity and defoliation. In the orchard were also collected fruits from treated plants for evaluation of latency GLS. In experimental orchard treatments had different behavior between the three crop seasons and those isolated from the phylloplane of apple trees did not show the same antagonistic potential of *in vitro* tests (CHAPTER 1). In a commercial orchard under natural inoculum pressure, none of the bacteria isolated from the phylloplane of apple differed significantly from the control in the two areas evaluated. The commercial product Serenade®, based on *Bacillus subtilis*, had no effect on the control of GLS in leaves and fruits. Fruits disinfected and obtained the area with the highest number of fungicide applications had fewer lesions caused by *Colletotrichum* spp. after 17 days of incubation.

Keywords: Serenade. *Colletotrichum* spp. Phylloplane.

4.1 INTRODUÇÃO

No Paraná, a mancha foliar de *Glomerella* (MFG) tem grande importância, devido a maioria dos pomares serem implantados com a cultivar 'Gala', muito susceptível a doença, e, também, ao clima que favorece o seu desenvolvimento e a disseminação do patógeno. O controle da doença tem sido efetuado com a aplicação, principalmente, de fungicidas do grupo dos ditiocarbamatos (mancozebe, metiram e propinebe), que apresentam alto índice de controle (IC) no início do ciclo vegetativo da macieira (IC > 80%) e mediano no final (IC > 70%), quando a pressão do inóculo aumenta. O controle baseado na aplicação de fungicidas protetores resulta em elevado número de pulverizações que pode chegar a até 15 por safra (KATSURAYAMA e BONETI, 2012).

As normas de Produção Integrada de Maçã no Brasil (IN SDC No 01 de 14/09/2006)⁶ limitam o uso de fungicidas por safra, muitas vezes inviabilizando esse sistema de controle. Ainda, considerando-se que o período que antecede a colheita é o mais crítico em relação ao ataque da doença, pode-se afirmar que os tratamentos utilizados atualmente não são eficazes devido às restrições quanto ao período de carência dos fungicidas (VALDEBENITO-SANHUEZA *et al.*, 2002; KATSURAYAMA e BONETI, 2009; KATSURAYAMA e BONETI, 2012).

Portanto, o controle biológico torna-se uma opção viável para o controle de doenças de plantas em associação à produção Integrada e uma alternativa na época de colheita. No entanto, a seleção de microrganismos antagonistas deve ser feita de maneira criteriosa, determinando as chances de sucesso do programa de controle biológico (BETTIOL, 1997). Andrews (1992) e Bettiol (1997) chamaram a atenção para o fato de que, em muitos casos a seleção de antagonistas é baseada unicamente em ensaios *in vitro* considerando o seu baixo custo e rapidez. No entanto, alertaram que há baixa correlação dos resultados obtidos em condições de laboratório com os observados nas condições a campo.

Por isso, microrganismos com comprovada eficiência antagônica *in vitro* devem ter sua população aumentada na superfície da planta visando o biocontrole da doença alvo e a sua capacidade de sobrevivência deve ser avaliada visando sua efetividade em condições

⁶ Instrução normativa SDC No 1 de 14 de setembro de 2006, que aprova as normas técnicas específicas para a produção integrada de maçã, NTEPI-Maçã. Publicada no Diário Oficial da União em 21 de setembro de 2006.

de campo. Dentre os diversos agentes bióticos que podem ser utilizados em controle biológico, as bactérias do filoplano são uma alternativa ainda pouco explorada, principalmente quando comparadas às rizobactérias (LINDOW e LEVEAU, 2002). As bactérias do filoplano são um potencial a ser estudado pois utilizam basicamente dois tipos de estratégias para sobreviverem em ambientes de estresse: de tolerância e de escape. A primeira requer capacidade em tolerar condições inóspitas, tais como a incidência de radiação ultravioleta, baixa umidade, enquanto a segunda, considera a habilidade da bactéria em explorar sítios que ofereçam um ambiente menos sujeito a estresses ambientais (ANDREWS e HIRANO, 1991; BEATTIE e LINDOW, 1995; BEATTIE e LINDOW, 1999; WILSON, HIRANO e LINDOW, 1999).

Os objetivos deste trabalho foram: (i) avaliar o potencial de isolados bacterianos do filoplano da macieira no controle da MFG em pomar experimental com inoculação do patógeno; (ii) avaliar o potencial de isolados bacterianos do filoplano da macieira e do produto comercial Serenade® como controle adicional ao químico da MFG, em folhas e em frutos, em pomar comercial sob pressão de inóculo natural.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Biocontrole da mancha foliar de *Glomerella* em pomar experimental com inoculação

O estudo foi conduzido no município de Curitiba/PR, nas safras 2008/09, 2009/10 e 2010/11. O pomar experimental de macieira ‘Gala’, com porta-enxerto Maruba e inter-enxerto M9, implantado no ano de 2007, situa-se em latitude 25° 24’ 42.57” S, longitude 49° 14’ 53.22” W. O clima da região na classificação de Köppen é do tipo subtropical, com verões frescos e sem estação seca definida (Cfb). Os dados meteorológicos de precipitação pluviométrica e de temperatura foram obtidos junto ao Instituto Tecnológico Simepar (Estação 25264916).

O delineamento experimental utilizado foi em blocos ao acaso com cinco tratamentos e cinco blocos, totalizando 25 parcelas cada uma composta por quatro plantas, com espaçamento de 0,50 m entre plantas e 1,50 m entre linhas, sendo que as duas plantas centrais de cada parcela foram consideradas úteis. Nas safras 2008/09 e 2009/10 foram

avaliadas todas as folhas de cada planta útil e na safra 2010/11 foi avaliado um segmento de ramo marcado, contendo 10 folhas, em cada planta útil.

Os tratamentos testados foram isolados bacterianos obtidos do filoplano da macieira no Estado do Paraná por Rollemberg (2008) e identificados como *Bacillus* sp., *Bacillus alcalophilus* e *Pseudomonas putida* e, como tratamentos controle, foi realizada a aplicação de fungicida a base de mancozebe (2 g L^{-1}) e outro, sem aplicação.

A aplicação dos tratamentos foi feita de forma preventiva e realizada semanalmente a partir do início de dezembro até maio totalizando, em média, 20 pulverizações. O volume de calda aplicado foi calibrado para atingir o início do ponto de escorrimento, aproximadamente 1 L por parcela.

Para o preparo da calda de pulverização, os isolados bacterianos foram repicados para placas de Petri contendo meio Nutriente-ágar (AES laboratoire®, 28 g L^{-1}) e mantidos a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas. Após 24 horas, quatro alçadas ($40 \text{ }\mu\text{L}$) dos isolados bacterianos foram transferidas para frascos do tipo Erlenmeyers, contendo meio líquido de Nutrient Broth (Himedia®, 13 g L^{-1}). Estes frascos permaneceram por um período de 48 horas sob agitação constante (120 rpm). Após este período, a suspensão de bactérias de cada isolado teve sua concentração padronizada, ao espectrofotômetro, para $\text{D.O.}_{540}=0,2$ ($2 \times 10^5 \text{ UFC/mL}$) e, adicionou-se $8,5 \text{ g}$ de cloreto de sódio (NaCl) e $10 \text{ }\mu\text{L}$ de Tween 80 para cada litro de suspensão bacteriana.

A inoculação foi realizada após quatro aplicações dos tratamentos. Todas as plantas foram inoculadas por aspersão com uma suspensão ajustada para 1×10^4 conídios mL^{-1} de *Colletotrichum* do grupo *acutatum* (Col01) obtido de folhas de macieira. Para a obtenção dos conídios o isolado foi repicado para placas de Petri contendo meio de cultura Aveia-ágar (40 g L^{-1} de farinha de aveia; 16 g L^{-1} de ágar; 1000 mL de água destilada), as placas foram mantidas a $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ durante seis dias.

A incidência foi determinada pelo número de folhas com sintoma em relação ao número total de folhas avaliadas, e a severidade foi avaliada com o auxílio da escala diagramática de Kowata *et al.* (2010) representada na Figura 1. As avaliações foram realizadas de fevereiro a maio nas safras 2008/09 e 2010/11 e de janeiro a maio na safra 2009/10. Na safra 2008/09 as avaliações começaram quando a incidência já estava próxima de 10% e na safra 2009/10 próxima de 7%. Na safra 2010/11 avaliações iniciaram antes do início da epidemia.

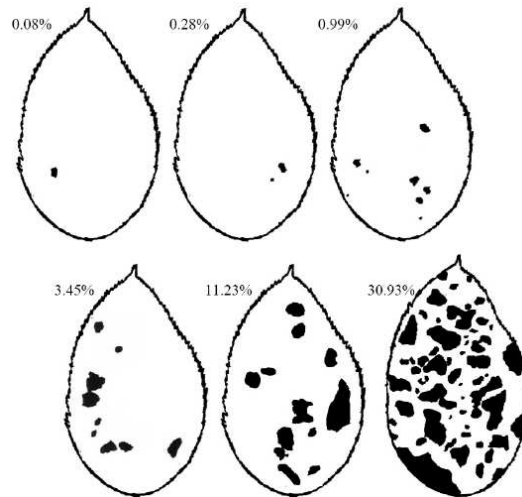


Figura 1 - Escala diagramática para avaliação da severidade (porcentagem total de área lesionada na folha) da mancha foliar de *Glomerella* (*Colletotrichum* spp.) em maçã (*Malus domestica*), composta por seis níveis de severidade (KOWATA *et al.*, 2010).

4.2.2 Biocontrole da mancha foliar de *Glomerella* sob condições de pomar comercial e inóculo natural

4.2.2.1 Descrição da área experimental e dos tratamentos

Utilizaram-se duas áreas em pomar comercial de macieira ‘Gala’, enxertadas sobre Maruba e com inter-enxerto M9, com espaçamento de 4 m entre linhas e 0,75 m entre plantas, de 12 anos de plantio no município de Campo Largo/PR. A área 1, situa-se em latitude $-25^{\circ} 42' 25,63''$ e longitude $-49^{\circ} 54' 21,50''$ e a área 2 em latitude $-25^{\circ} 42' 13,98''$ e longitude $-49^{\circ} 54' 61,43''$. O clima da região na classificação de Köppen é do tipo subtropical, com verões frescos e sem estação seca definida (Cfb). Os dados meteorológicos de precipitação pluviométrica, umidade relativa do ar e de temperatura foram obtidos junto ao Instituto Tecnológico Simepar (Estação 25264916).

O número de dias favoráveis (DF) à ocorrência da MFG foi calculado de acordo com o proposto por Katsurayama, Boneti e Becker (2000) que consideram um DF como sendo aquele com período de molhamento foliar (PMF) acima de 10 horas ($PMF > 10$ h) e temperatura acima de $15^{\circ}C$ ($T > 15^{\circ}C$). O PMF foi estimado com a utilização do modelo de número de horas com umidade relativa acima de 87% ($NHUR > 87\%$), que se baseia no

fato de que a presença de água líquida nas superfícies está relacionada, geralmente, com valores elevados de umidade relativa (UR) (GLEASON *et al.*, 1994).

Os tratamentos com fungicidas sistêmicos (tiofanato metílico) e protetores (mancozebe e clorotalonil), para controle da MFG, realizados pelo produtor em todas as plantas foram mantidos normalmente. Os tratamentos alternativos utilizados adicionalmente no ensaio foram os isolados bacterianos obtidos do filoplano da macieira: *Bacillus* sp., *Bacillus alcalophilus* e *Pseudomonas putida*. Como referência utilizou-se um tratamento com o fungicida Serenade® (40 mL L⁻¹ de água), que tem como ingrediente ativo o agente biológico *Bacillus subtilis*, e a testemunha sem nenhum tipo de tratamento alternativo.

Para o preparo da calda de pulverização, os isolados bacterianos foram repicados para placas de Petri contendo meio Nutrient-agar e mantidos a 25 °C e fotoperíodo 12 horas. Após 24 horas, quatro alçadas dos isolados bacterianos foram transferidas para frascos do tipo Erlenmeyers, contendo meio líquido de Nutrient Broth. Os frascos permaneceram por um período de 48 horas sob agitação constante (120 rpm). Após este período, a suspensão de bactérias de cada isolado teve sua concentração padronizada, ao espectrofotômetro, para D.O.540=0,2 (2 x 10⁵ UFC/mL) e, adicionados 8,5 g de NaCl e 10 µL de Tween 80 para cada litro de suspensão bacteriana.

Foram feitas aplicações semanais, totalizando 17 aplicações dos tratamentos alternativos desde o início da frutificação até o final do período de colheita dos frutos utilizando-se o pulverizador manual (GUARANY) com capacidade para 5L. O volume de calda aplicado foi calibrado para atingir o início do ponto de escorrimento. A pulverização foi realizada apenas em um lado da planta, onde os ramos foram marcados, utilizando-se em média 1 L de calda por planta.

4.2.2.2 Avaliação da doença em folhas

Para cada área foram escolhidas cinco plantas ao acaso por tratamento e em cada planta foram marcados três segmentos de ramo contendo dez folhas. A incidência foi determinada pelo número de folhas com sintomas em relação ao número total de folhas avaliadas por ramo nos três ramos marcados por planta, e a severidade foi avaliada em um ramo por planta com auxílio de escala diagramática específica de Kowata *et al.* (2010)

(Figura 1). As avaliações iniciaram antes do início da epidemia, um mês após a primeira aplicação dos tratamentos e foram de janeiro a março de 2012, totalizando 11 avaliações.

4.2.2.3 Avaliação da doença em frutos

Foram coletados das plantas marcadas, dois dias após terem sido tratadas, 450 frutos em ponto de colheita, sendo 9 frutos por planta. Destes, 4 frutos foram desinfestados em álcool 70% (1 min), hipoclorito de sódio 1% (1 min) e, enxaguados em água destilada esterilizada três vezes, e em seguida colocados em caixa plástica (15 x 20 x 10 cm) contendo uma folha de papel de filtro umedecido com 10 mL de água destilada esterilizada, e 5 foram coletados em sacos individuais, não foram desinfestados e colocados em caixas plásticas individuais (10 cm de diâmetro) contendo uma folha de papel filtro umedecido com 5 mL de água destilada esterilizada. O ensaio foi mantido sob fotoperíodo natural e temperatura variável entre 22,5 e 27 °C.

Realizou-se a contagem de lesões típicas causadas por *Colletotrichum* spp. a partir de 24 horas da instalação do experimento, diariamente, durante 17 dias. Considerou-se um delineamento inteiramente ao acaso, com tratamentos no esquema fatorial (5 tratamentos x 2 áreas x 2 condições de armazenamento).

4.2.3 Análise dos dados

Nos ensaios em pomar experimental, as epidemias foram comparadas em relação ao valor máximo de severidade e incidência, e à área abaixo da curva do progresso relativa da incidência e da severidade da doença, somando-se as áreas trapezoidais (CAMPBELL e MADDEN, 1990) e dividindo-as pelo intervalo de avaliação. Foi calculada também, a área abaixo da curva do progresso relativa do número de folhas. Então, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste t ($P < 0,05$), usando o software ASSISTAT 7.6 beta.

Nos ensaios em pomar comercial, as epidemias de MFG foram comparadas pela severidade imediatamente anterior a queda da folha (SAQ), e pelas áreas abaixo das

curvas de progresso da incidência e da severidade da doença (AACP inc e AACPsev). Para atender as pressuposições da análise de variância, os dados de AACPinC e AACPsev foram submetidos à transformação $y = \sqrt{x}$. Foi calculada também, a área abaixo da curva do progresso do número de folhas (AACP n° de folhas). Então, os dados foram submetidos à análise de variância e as médias, comparadas pelo teste t ($P < 0,05$), usando o software ASSISTAT 7.6 beta.

A doença em frutos foi avaliada em relação ao número de lesões na última avaliação (17º dia de incubação). Para atender as pressuposições da análise de variância, os dados foram submetidos à transformação de Box-Cox (BOX e COX, 1964), com parâmetro de transformação $y = 1/3$. Então os dados transformados foram submetidos à análise de variância e as médias, comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$), usando o software R, versão 2.13.2 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2011).

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Biocontrole da mancha foliar de *Glomerella* em pomar experimental com inoculação

O volume acumulado de precipitação pluviométrica durante os períodos de avaliação foi de 223,40 mm no ano de 2009, 598,20 mm no ano de 2010 e de 284,20 mm no ano de 2011, sendo o ano de 2010 o que apresentou o maior número de dias consecutivos com chuva, seguido de 2011 e 2009. O número de dias favoráveis para a ocorrência da MFG foi maior no ano de 2010 (24 dias), seguido de 2011 (20 dias) e 2009 (6 dias) (Tabela 1).

Houve um aumento na porcentagem de severidade e no número de folhas da safra 2008/09 para a safra 2009/2010 e, na safra 2009/10 houveram mais dias com chuva no período avaliado quando comparado com a safra 2008/09 (Figura 2).

Na safra 2008/09 *Pseudomonas putida*, quando aplicada semanalmente, foi eficiente para reduzir o progresso da severidade, e a incidência e severidade máximas da MFG em comparação ao tratamento controle. O tratamento com este isolado bacteriano reduziu em 17% a incidência da doença e a severidade máxima chegou a apenas 0,22%, representando uma redução da AACPsev de 66,7%. Nesta mesma safra, *Bacillus* sp. reduziu em 13% a incidência máxima da doença em pomar experimental (Tabela 2).

Na safra 2009/10 houve um maior número de dias consecutivos com chuva (DCC) e de dias favoráveis (DF) à MFG no período avaliado quando comparada à safra 2008/09 (Tabela 1). Nesta safra, nenhum dos isolados bacterianos foi eficiente no controle da doença e apenas o tratamento com o fungicida mancozebe reduziu significativamente a área abaixo da curva do progresso da incidência e a incidência máxima da doença, mas não se diferenciou para severidade (Tabela 2).

Na safra 2010/11 a incidência nas folhas chegou a 100% das folhas marcadas e a severidade próximo de 16% ao final das avaliações. Nenhum dos isolados bacterianos foi eficiente em reduzir a AACPinc e a AACPsev da MFG. Nesta mesma safra, nenhum tratamento diferenciou da testemunha para AACP do nº de folhas. Apesar de na última avaliação a severidade no tratamento com *Pseudomonas putida* e com mancozebe ser menor que nos outros tratamentos testados (Figura 3), esta diferença não foi significativa (Tabela 2).

4.3.2 Biocontrole da mancha foliar de *Glomerella* sob condições de pomar comercial e inóculo natural

4.3.2.1 Avaliação da doença em folhas

O volume acumulado de precipitação pluviométrica durante o período de avaliação foi de 318,40 mm. O número de DCC foi de 37 e o número de DF para a ocorrência da MFG foi de 10. O número de pulverizações (NP) para o controle da MFG durante o período de avaliações para as áreas 1 e 2 foi 5 e 11, respectivamente (Tabela 3).

A incidência da doença nas duas áreas avaliadas, seguiram o mesmo padrão de ocorrência (Figura 4). Os isolados bacterianos e o produto comercial Serenade®, a base de *Bacillus subtilis*, não exerceram influência significativa, quando comparados à testemunha, na AACPsev, na AACPinc e na AACP nº de folhas nas duas áreas tratadas do pomar comercial de macieira localizado em Campo largo/PR (Tabela 4).

A severidade imediatamente anterior a queda da folha (SAQ) foi maior, quando comparada à testemunha, nos tratamentos com *Pseudomonas putida* e *Bacillus* sp. na A1 e no tratamento com o produto comercial Serenade® na A2 (Tabela 5).

4.3.2.2 Avaliação da doença em frutos

Os tratamentos com os isolados bacterianos do filoplano da macieira e com o produto comercial Serenade® não proporcionaram redução significativa, em relação a testemunha, no número de manchas causadas por *Colletotrichum* spp. em frutos de maçã ‘Gala’.

Frutos não desinfestados com solução de hipoclorito a 1% e frutos coletados da A1, apresentaram maior número de manchas após 17 dias de avaliação em relação à frutos desinfestados e à frutos coletados da A2 (Tabela 6).

4.4 DISCUSSÃO

Em pomar experimental com inoculação de *Colletotrichum* do grupo *acutatum*, os tratamentos a base de isolados bacterianos e o fungicida mancozebe tiveram resultados variáveis nas três safras avaliadas e, em pomar comercial, sob pressão do inóculo natural do patógeno e manejo com fungicidas, os tratamentos com bactérias antagonistas e com o produto comercial Serenade® não melhoraram o controle da MFG em folhas e em frutos.

A bactéria *Pseudomonas putida* foi o único isolado que reduziu, em folhas de pomar experimental, a AACPsev, assim como severidade e incidência máximas, mas não se observou efeito sobre a AACPinc e na AACP do nº de folhas na safra 2008/09. O gênero *Pseudomonas* é responsável pela produção de alguns compostos com propriedades antifúngicas, e ainda é capaz de induzir resistência sistêmica em plantas. O gênero é conhecido como capaz de interferir diretamente no fator de patogenicidade de alguns grupos de fungos (HAAS e DEFAGO, 1990). Viswanathan e Samiyappan (2004) descreveram algumas linhagens de *P. fluorescens* que apresentaram atividade antagônica contra *Colletotrichum falcatum*, sendo que estas mesmas linhagens foram avaliadas quanto à produção de enzimas, correlacionando a atividade antifúngica destas bactérias à sua produção de quitinase.

Embora *Pseudomonas putida* tenha influenciado no controle da MFG, este potencial não se repetiu ao longo das safras e, *Bacillus alcalophilus* e *Bacillus* sp., que obtiveram bons resultados *in vitro*, não apresentaram controle satisfatório quando

aplicados em testes em campo. Isso mostra que nem sempre os bons resultados de antagonismo obtidos *in vitro* sejam garantia de eficiência no campo. Essa eficácia apenas constitui-se em prognóstico e indicativo quanto à sua viabilidade no controle dos fitopatógenos, sob condições naturais de infecção. Muitas vezes, a eficácia dos antagonistas *in vitro* ou em casa-de-vegetação, pode ser insuficiente para estabelecer o limiar de população exigida para um biocontrole no campo (STOCKWELL, JOHNSON e LOPER, 1998).

Ainda em pomar experimental, na safra 2009/10 a severidade da doença aumentou em relação a safra anterior, provavelmente devido a uma maior ocorrência de DF a MFG e a um maior volume de precipitação pluviométrica no período de avaliação.

Nos ensaios realizados em pomar experimental, o fungicida mancozebe não controlou a MFG, o que coincide com declarações de produtores, ano após ano, sobre a ineficácia dos fungicidas seguindo a dose recomendada (2 g L^{-1}). Eles relatam que, para conseguir controlar a MFG, precisa aumentar a dose recomendada na bula dos produtos a base de mancozebe. A ineficácia de alguns fungicidas, inclusive de mancozebe, quando a pressão de inóculo é alta, já foi relatada. Hamada e May De Mio (2013) avaliaram o crescimento micelial de isolados de *Colletotrichum* spp. provenientes de macieira em diferentes doses de mancozebe e apenas uma minoria teve inibição de 100% na dose de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$, que é considerado uma dose muito alta *in vitro*, o que ressalta a importância do estudo de controles alternativos para a MFG.

No ensaio em pomar comercial, não foi observado diferença na severidade da MFG em frutos quando tratados com isolados do filoplano da macieira. Isso se deve provavelmente ao fato de que os tratamentos com os antagonistas iniciaram na fase em que os frutos já estavam em desenvolvimento e, o patógeno já estava estabelecido no seu interior por infecções ocorridas na floração. A detecção de *Colletotrichum* spp. em flores de macieira foi relatada por Hamada e May De Mio (2012), comprovando que *Colletotrichum* spp. pode infectar flores e permanecer latente em frutos evidenciando sintomas a partir da colheita. O número de manchas nos frutos foi maior na área 1, possivelmente pelo fato de que o número de pulverizações com fungicidas químicos nessa área, visando o controle da MFG, foi menor em relação ao número de pulverizações na área 2. Frutos desinfestados apresentaram menor quantidade de lesões causadas por *Colletotrichum* spp., provavelmente, devido ao fato de que os frutos não desinfestados expressaram, além das lesões latentes, lesões provenientes de infecções causadas por conídios que foram depositados, ainda no campo, na superfície dos frutos e tiveram sua

germinação favorecida pela câmara úmida onde foram acondicionados para a avaliação do experimento.

Em folhas de pomar comercial, a severidade imediatamente anterior a queda da folha (SAQ) foi menor para os tratamentos com *Pseudomonas putida* e *Bacillus* sp. na área 1, e para o tratamento com Serenade® na área 2. Diante desta diferença dos tratamentos entre as áreas não se pode concluir sobre o real efeito das bactérias na desfolha e, portanto, devem-se realizar mais estudos para esclarecer o fato de que há tratamentos que proporcionam à folha uma maior tolerância a severidades maiores antes da queda.

Os isolados bacterianos do filoplano da macieira e Serenade® não tiveram influência na AACPinc, na AACPsev e na AACP do nº de folhas, sendo que nenhum dos tratamentos diferenciou significativamente da testemunha. Este fato pode ser explicado, pois o próprio estabelecimento das bactérias antagonistas sobre o filoplano das plantas é sempre um desafio no controle biológico. Em muitos experimentos de campo, células dos antagonistas, quando cultivadas em meio sólido, suspensas em água e aplicadas nas plantas, não encontram ambiente apropriado para seu desenvolvimento. Na filosfera ficam expostas à luz ultravioleta, às mudanças rápidas de temperatura e às mudanças na disponibilidade de água, entre outras causas (STOCKWELL, JOHNSON e LOPER, 1998). Burrage (1971) já afirmava que a umidade e a temperatura no filoplano apresentam variações devido à exposição solar, ao ar atmosférico, às chuvas, à localização das folhas na planta e, que estas modificações no microclima do filoplano culminam em constante modificação da microbiota epifítica. Outro agravante é que em pomar comercial os tratamentos fitossanitários podem ter contribuído para reduzir o efeito das bactérias. Além disso, a ocorrência de chuva após algumas aplicações dos tratamentos, pode ter retirado as células bacterianas da superfície das folhas.

A disponibilidade de nutrientes no filoplano também apresenta variações (BETTIOL, 1991), sendo um fator determinante na competição entre as populações epifíticas (BAKER e COOK, 1974). A origem dos nutrientes no filoplano é diversa, podendo vir de exsudados foliares, resíduos orgânicos, grãos de pólen, secreções de afídios, entre outras. Assim, com o desenvolvimento da folha ocorrem mudanças na disponibilidade de nutrientes, aumentando com o passar do tempo (BETTIOL, 1991).

Dessa forma, a variação do microclima e da disponibilidade de nutrientes no filoplano afeta as condições para o desenvolvimento da população microbiana, e o seu conhecimento constitui em ponto chave para o sucesso de programas de controle biológico de doenças da parte aérea de plantas (BETTIOL, 1991). Segundo Morris e Rouse (1985),

pode-se até alterar um ecossistema, como o filoplano, para favorecer o aumento do tamanho da população dos microrganismos antagonistas introduzidos, a fim de contribuir para o controle biológico de doenças, porém, essa estratégia requer o profundo conhecimento das características do filoplano.

Diante disso, fica claro que muitos são os fatores a serem considerados para uma abordagem eficiente na escolha e utilização de agentes de controle biológico (ACBs). Não fosse isso, os estudos que buscam ACBs não seriam muitas vezes discrepantes entre a inibição encontrada *in vitro* e no campo (XU *et al.*, 2011). Os estudos de ecologia microbiana da planta hospedeira, de ecologia do patógeno e de metodologias eficientes na busca dos ACBs estão entre as abordagens mais importantes a serem consideradas na busca e obtenção de sucesso no controle. O controle biológico realizado com uso de microrganismos de ocorrência natural na planta pode ser uma maneira eficiente e menos invasiva para o vegetal, no entanto, o desenvolvimento de formulações que maximizem a sobrevivência e os efeitos dos isolados a campo é um aspecto muito importante (FURNKRANZ *et al.*, 2012).

Dessa forma, bactérias isoladas do filoplano da macieira, visando o biocontrole da mancha foliar de *Glomerella*, apresentam potenciais a serem explorados, visto que possuem efeitos no controle *in vitro* do patógeno. Próximos trabalhos com estes isolados podem estar voltados para o estudo de formulações e para a identificação dos compostos produzidos por estes antagonistas, tanto fixos como voláteis, realizando testes do efeito individual ou sinérgico destes compostos contra o patógeno.

4.5 CONCLUSÕES

Os isolados bacterianos do filoplano da macieira não foram eficientes no controle da MFG em condições de pomar experimental com inoculação e em condições de pomar comercial como controle adicional ao químico e sob pressão de inóculo natural.

O produto comercial Serenade®, a base de *Bacillus subtilis*, não apresentou efeito no controle da MFG em folhas e frutos.

Frutos desinfestados e obtidos da área com maior número de aplicações de fungicidas apresentaram menor número de lesões causadas por *Colletotrichum* spp. após 17 dias de incubação.

REFERÊNCIAS

ANDREWS, J. H.; HIRANO, S. S. **Microbial Ecology of Leaves**. New York: Springer-Verlag, 1991.

ANDREWS, J. H. Biological control in the phyllosphere. **Annual Review of Phytopathology**, v.30, p.603-635, 1992.

BAKER, K. F.; COOK, R. J. **Biological control of plant pathogens**. W. H. Freeman: San Francisco, 1974.

BEATTIE, G. A.; LINDOW, S. E. The secret life of foliar bacterial pathogens on leaves. **Annual Review of Phytopathology**, v.33, p.145-172, 1995.

BEATTIE, G. A.; LINDOW, S. E. Bacterial colonization of leaves: a spectrum of strategies. **Phytopathology**, v.89, p.353-359, 1999.

BETTIOL, W. **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA, 1991.

BETTIOL, W. Biocontrole na filosfera: problemas e perspectivas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.5, p.59-97, 1997.

BOX, G. E. P.; COX, D. R. An analysis transformation. **Journal of the Royal Statistical Society, Série B**, v.26, p.211-252, 1964.

BURRAGE, S. W. The micro-climate at the leaf surface. In: PREECE, T.F.; DICKINSON, C.H. **Ecology of Leaf Surface Micro-organisms**. Academic Press.: London, 1971. p.91-101.

CAMPBELL, C. L.; MADDEN, L. V. **Introduction to plant disease epidemiology**. New York: John Wiley, 1990.

FURNKRANZ, M.; LUKESCH, B.; MULLER, H.; HUSS, H.; GRUBE, M.; BERG, G. Microbial diversity inside pumpkins: microhabitat-specific communities display a high antagonistic potential against phytopathogens. **Microbial Ecology**, v.63, p.418-428, 2012.

GLEASON, M. L.; TAYLOR, S. E.; LOUGHIN, T. M.; KOEHLER, K. J. Development and validation of an empirical model to estimate duration of dew periods. **Plant Disease**, v.78, p.1011-1016, 1994.

HAMADA, N. A.; MAY DE MIO, L. L. Metodologia para detecção de *Colletotrichum* spp em flores de macieira. In: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 15., 2012, Jaguariuna. **Summa Phytopathologica** - Suplemento, 2012. v.38. p.175-175.

HAMADA, N. A.; MAY DE MIO, L. L. Sensibility of *Colletotrichum* spp., the causal agent of Glomerella Leaf Spot on apple, to mancozeb and tiophanate-methyl. In: INTERNATIONAL REINHARDSBRUNN-SYMPOSIUM ON 'MODERN FUNGICIDES AND ANTIFUNGAL COMPOUNDS', 17, 2013, **Anais...**, Friedrichroda, 2013. p.184-184.

HAAS, D.; DEFAGO, G. **Soil Biochemistry**. NewYork: Marcel Dekker, v.6, 1990.

KATSURAYAMA, Y.; BONETI, J.I.S.; BECKER, W. F. Mancha foliar da Gala: principal doença de verão da cultura da macieira. **Agropecuária catarinense**, v.13, p.14-20, 2000.

KATSURAYAMA, Y.; BONETI, J. I. S. Manejo das doenças de verão da macieira no sul do Brasil. In:STADNIK, M.J. **Manejo integrado de doenças da macieira**. Florianópolis-SC: Universidade Federal de Santa Catarina. 2009. p.45-64.

KATSURAYAMA, Y.; BONETI, J. I. S. Manejo da mancha da Gala. **Agropecuária catarinense**, v. 25, n. 2, p. 45-51, 2012. Suplemento.

KOWATA, L. S.; STRAPASSON, M.; CHALLIOL, M. A.; MAY-DE-MIO, L. L. Glomerella leaf spot in apple: validation of proposed diagrammatic scale and efficiency of fungicides. **Ciência Rural**, v.40, n.7, p.1502-1508, 2010.

LINDOW, S. E.; LEVEAU, J. H. J. Phyllosphere microbiology. **Current Opinion in Biotechnology**, v.13, p.238-243, 2002.

MORRIS, C. E.; ROUSE, D. I. Role of nutrients in regulating epiphytic bacterial population. In: WINDELS, C. E.; LINDOW, E. **Biological control on the phylloplane**. American Phytopathological Society: St. Paul, 1985.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical Computing**. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0. Disponível em: <http://www.R-project.org>. Acesso em 15 de agosto de 2012.

ROLLEMBERG, C. L. **Mancha das folhas da macieira: caracterização fisiológica dos agentes causais, controle biológico com bactérias residentes de filoplano e sensibilidade dos antagonistas a fungicidas e inseticidas.** 124 f. Dissertação (Mestrado em fitopatologia) - Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Universidade Federal do Paraná, 2008.

STOCKWELL, V. O.; JOHNSON, K. B.; LOPER, J. E. Establishment of bacterial antagonists of *Erwinia amylovora* on pear and apple blossoms as influenced by inoculum preparation. **Phytopathology**, v.88, p.506-513, 1998.

VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M.; BECKER, W.; BONETI, J. I .S.; KATSURAYAMA, Y.; CZERMAINSKI, A.B.C. **Manejo das doenças de verão na produção integrada de maçã.** Circular técnica. Embrapa, n.36, 2002.

VISWANATHAN, R.; SAMIYAPPAN, R. Secondary metabolites production by *Pseudomonas* spp. strains antagonistic to *Colletotrichum falcatum* causing red rot disease in sugarcane. **Acta Phytopathologica Entomologica et Hungarica**, v.39, p.28-37, 2004.

WILSON, M.; HIRANO, S. S.; LINDOW, S. E. Location and survival of leaf-associated bacteria in relation to pathogenicity and potential for growth within the leaf. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p.1435-1443, 1999.

XU, X. M.; JEFFRIES, P.; PAUTASSO, M.; JEGER, M. J. Combined use of biocontrol agents to manage plant diseases in theory and practice: a review. **Phytopathology**, v.101, p.1024–1031, 2011.

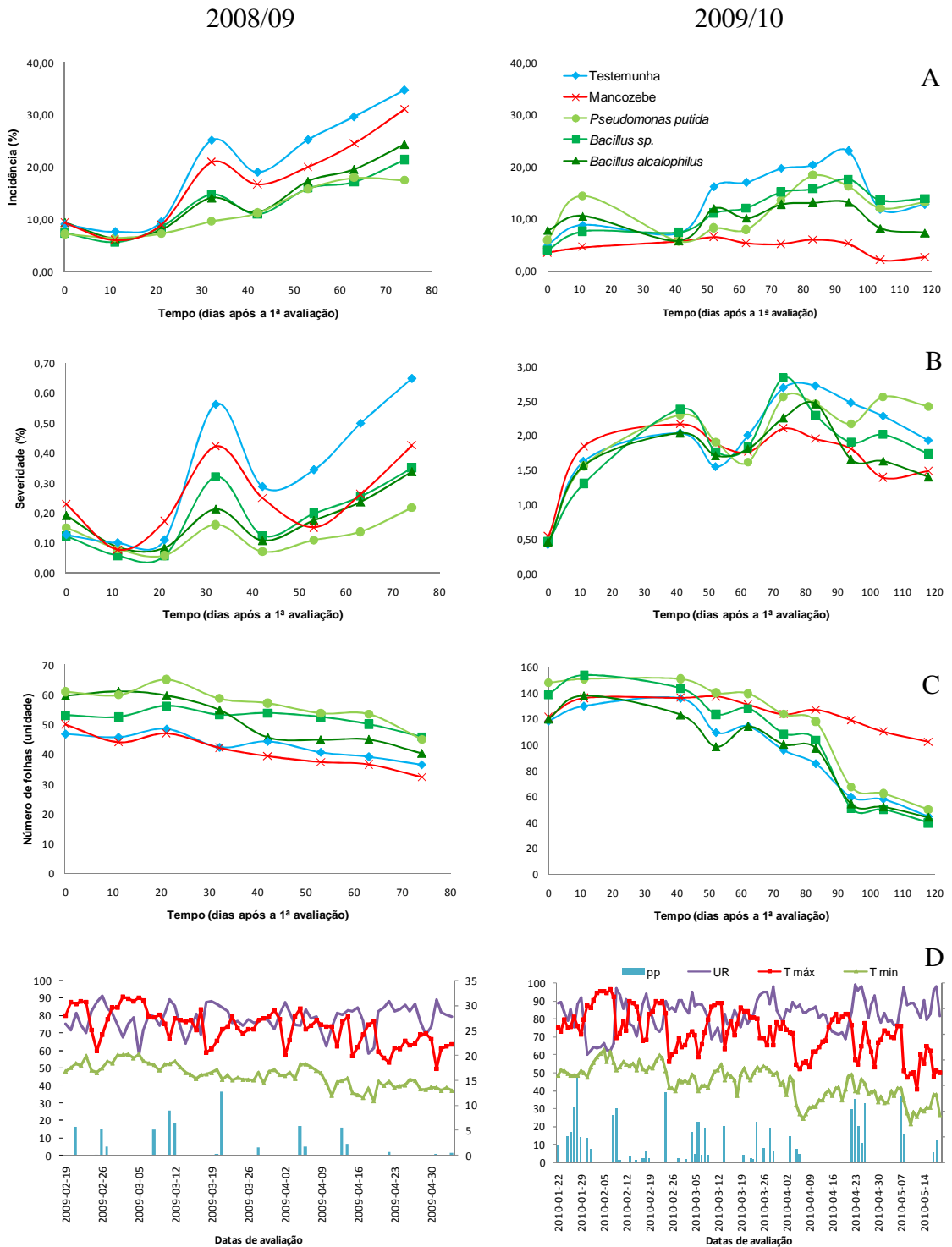


Figura 2 - Incidência da mancha foliar de *Glomerella* (MFG) (A), Severidade da MFG (B), número de folhas em plantas de macieira (C) e precipitação (mm), umidade relativa média (UR%) e temperaturas (T) máxima, média e mínima (D), observadas em pomar experimental pulverizado com antagonistas biológicos. Primeira avaliação (tempo 0) realizada em 19/02/2009 (safra 2008/09) e 22/01/2010 (safra 2009/10). Inoculação das plantas realizada em 10/01/2009 (safra 2008/09) e 10/01/2010 (safra 2009/10). Curitiba/PR.

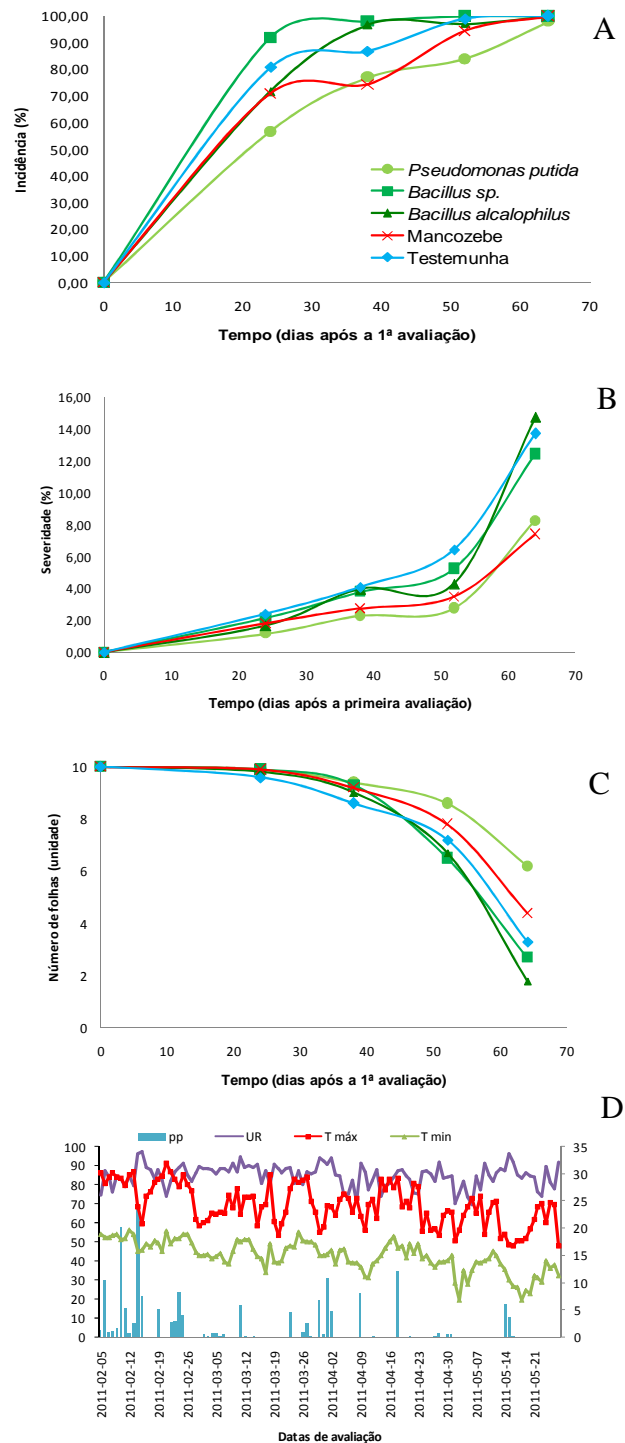


Figura 3 - Incidência da mancha foliar de *Glomerella* (MFG) (A), Severidade da MFG (B), número de folhas em ramos marcados de macieira (C) e precipitação (mm), umidade relativa do ar média (UR%) e temperaturas (T) máxima, média e mínima (D), observadas em pomar experimental pulverizado com antagonistas biológicos durante a safra 2010/11. Primeira avaliação (tempo 0) realizada em 22/02/2011. Inoculação das plantas realizada em 22/01/2011. Curitiba/PR.

Tabela 1 - Temperaturas média (T méd), máxima (T máx) e mínima (T mín), umidade relativa do ar média (UR%), volume de precipitação pluviométrica (PP) (mm), número de dias consecutivos com chuva (DCC)¹ e número de dias favoráveis (DF)² para a ocorrência da mancha foliar de *Glomerella*. Dados relativos a média dos 10 dias anteriores a cada data de avaliação da incidência, severidade e número de folhas em pomar experimental. Curitiba/PR.

Safr	Data da avaliação	Média das condições ambientais entre os 10 dias anteriores a data de avaliação					DCC	DF
		T méd (° C)	T máx (° C)	T mín (° C)	UR (%)	PP (mm)		
2008/09	19/02/2009	20,6	25,5	17,5	81,6	51,4	3	1
	02/03/2009	22,0	28,0	18,3	79,8	38,8	7	2
	12/03/2009	23,0	29,0	19,0	75,5	41,2	0	1
	23/03/2009	20,1	25,2	16,4	78,9	37,8	2	2
	02/04/2009	20,3	26,7	15,8	76,4	5,0	0	0
	13/04/2009	20,1	25,9	16,1	75,8	22,4	2	0
	23/04/2009	17,5	23,3	13,5	78,0	25,2	2	0
	04/05/2009	17,0	22,1	13,9	80,8	1,6	0	0
2009/10	22/01/2010	21,6	27,0	18,4	86,2	90,4	8	2
	02/02/2010	21,1	27,5	17,4	79,3	146,0	7	3
	04/03/2010	19,5	24,8	16,5	84,2	44,0	3	3
	15/03/2010	20,8	26,7	16,2	79,4	74,8	5	3
	25/03/2010	21,2	27,8	16,7	81,1	31,6	4	1
	05/04/2010	20,1	25,4	16,6	87,8	48,8	4	5
	15/04/2010	15,1	20,8	10,9	84,4	13,2	3	0
	26/04/2010	19,9	25,9	14,6	81,1	96,2	4	3
	06/05/2010	17,4	23,8	13,1	82,9	33,4	2	3
19/05/2010	13,8	18,5	10,4	87,7	19,8	2	1	
2010/11	15/02/2011	22,3	28,9	18,4	82,9	196,4	10	2
	18/03/2011	19,3	24,6	15,8	88,6	18,8	5	8
	01/04/2011	20,1	25,3	16,9	87,1	44,6	5	7
	15/04/2011	18,3	24,3	13,5	80,3	24,4	2	2
	27/05/2011	14,9	21,4	10,5	82,3	0,0	0	1

¹dias com a ocorrência de chuva, com intervalo máximo de um dia entre eles.

²Número de dias favoráveis calculado de acordo com Katsurayama, Boneti e Becker (2000) que consideram um DF como sendo aquele com período de molhamento foliar (PMF) acima de 10 horas (PMF>10 h) e temperatura acima de 15 ° C (T>15 ° C).

Tabela 2 - Área abaixo da curva do progresso (AACP) relativa da incidência, da severidade e da desfolha e médias de severidade e incidência máximas da mancha foliar de *Glomerella* (*Colletotrichum* spp.) em mudas de macieira (*Malus domestica*) de pomar experimental pulverizadas com antagonistas biológicos durante três safras consecutivas. Curitiba/PR.

Tratamento/Safra	AACP relativa ¹			Máxima (%) ¹	
	Incidência	Severidade	Nº de folhas	Incidência	Severidade
2008/09²					
Testemunha	19,72 ns	0,33 a	43,25 ns	34,71 a	0,65 a
Mancozebe	16,81	0,24 ab	41,14	31,11 ab	0,43 ab
<i>Bacillus</i> sp. (C02)	12,47	0,18 ab	52,52	21,42 bc	0,35 ab
<i>Bacillus alcalophilus</i> (C12)	13,32	0,17 ab	51,58	24,29 abc	0,34 ab
<i>Pseudomonas putida</i> (A68)	11,52	0,11 b	57,28	17,49 c	0,22 b
2009/10²					
Testemunha	13,51 a	0,52 ns	101,53 ns	12,70 a	1,93 ab
Mancozebe	4,74 b	0,56	126,94	2,58 b	1,54 b
<i>Bacillus</i> sp. (C02)	11,29 a	0,52	111,07	13,82 a	1,73 ab
<i>Bacillus alcalophilus</i> (C12)	9,85 ab	0,57	99,86	7,27 ab	1,37 b
<i>Pseudomonas putida</i> (A68)	11,43 a	0,54	120,87	13,12 a	2,42 a
2010/11³					
Testemunha	77,85 ab	5,5 ns	7,59 ab	100,00	13,71 ns
Mancozebe	72,55 ab	3,25	8,13 ab	100,00	5,88
<i>Bacillus</i> sp. (C02)	82,22 a	4,97	7,45 ab	100,00	11,51
<i>Bacillus alcalophilus</i> (C12)	76,63 ab	4,91	7,26 b	100,00	14,74
<i>Pseudomonas putida</i> (A68)	66,44 b	3,02	8,74 a	100,00	9,83

¹ Dados originais, sem transformação; médias seguidas de letras distintas, nas colunas, não diferem significativamente entre si pelo teste t, ao nível de 5% de probabilidade.

² Avaliação da incidência e da severidade em todas as folhas da repetição.

³ Avaliação da incidência e da severidade em ramos marcados (1 ramo/repetição) contendo dez folhas.
ns = não significativo.

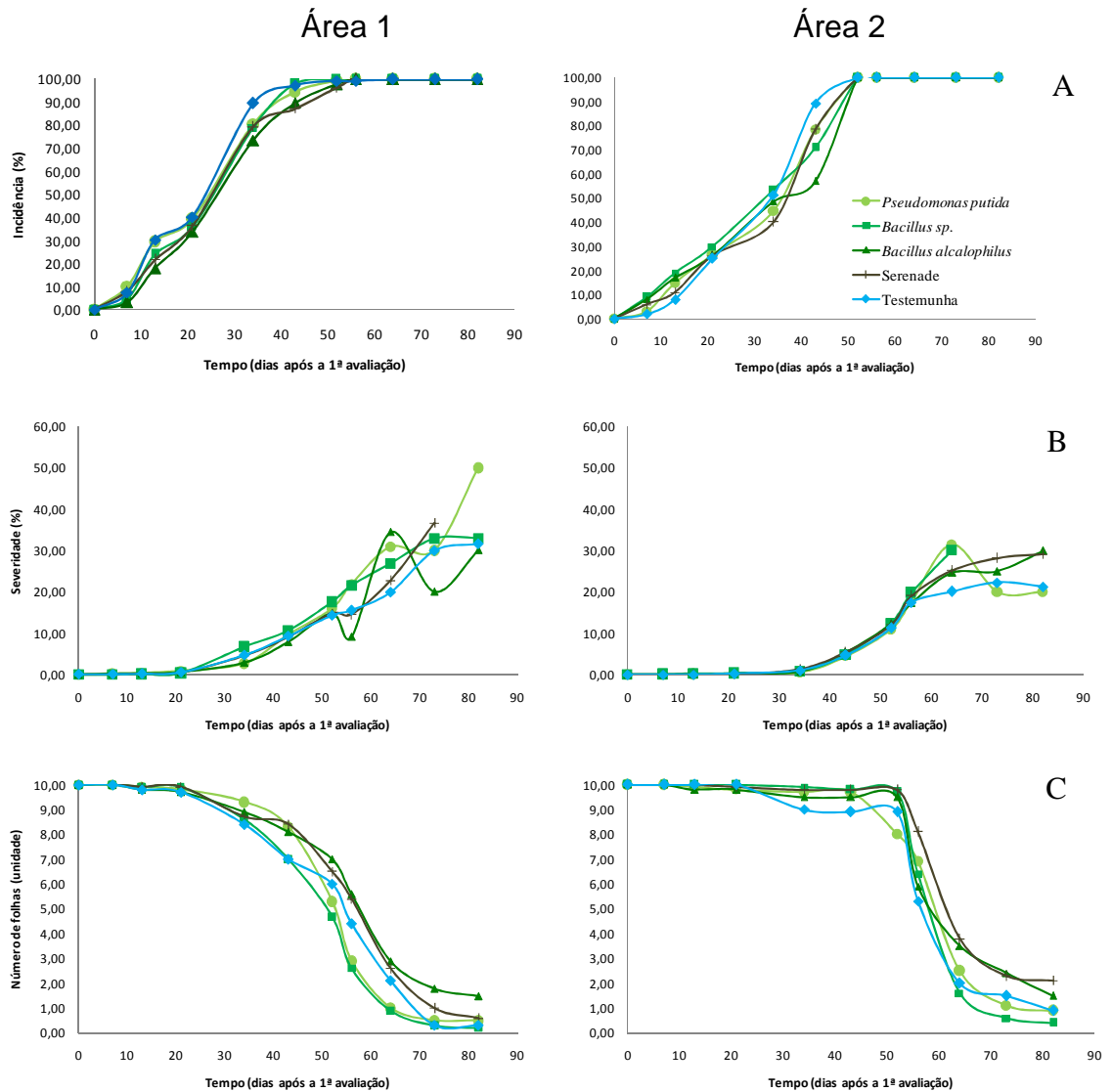


Figura 4 - Incidência da mancha foliar de *Glomerella* (MFG) (A), Severidade da MFG (B) e número de folhas em plantas de macieira (C), observadas em pomar comercial pulverizado com antagonistas biológicos em duas áreas. Primeira avaliação (tempo 0) realizada em 06/01/2012 (área 1 e 2).

Tabela 3 - Temperaturas média (T méd), máxima (T máx) e mínima (T mín), umidade relativa do ar média (UR%), volume de precipitação pluviométrica (PP) (mm), número de dias consecutivos com chuva (DCC)¹, número de dias favoráveis (DF)² a ocorrência da mancha foliar de glomerella (MFG) e número de pulverizações (NP)³ para o controle da MFG. Dados relativos a média entre as datas de avaliação da incidência, severidade e número de folhas em pomar comercial (A1 e A2). Campo Largo/PR.

Avaliação	Média das condições ambientais entre as avaliações					DCC ¹	DF ²	NP ³	
	T méd	T máx	T mín	UR	PP			A1	A2
	(° C)	(° C)	(° C)	(%)	(mm)				
1	19,6	26,5	15,5	78,8	20,6	4	0	1 (M)	1 (M)
2	20,1	26,3	16,5	82,3	20,4	4	0	2 (T,M)	2 (M,T)
3	20,3	26,7	17,3	85,6	56,0	4	1	1(M)	1 (M)
4	20,9	27,5	16,5	81,2	32,8	5	1	1 (M)	1 (M)
5	22,9	31,0	17,1	71,2	22,2	1	0	0	3 (M,M,M)
6	20,0	26,4	15,9	85,3	79,6	5	4	0	2 (M,C)
7	21,6	28,6	17,9	83,8	63,4	8	1	0	0
8	22,7	30,5	17,9	79,8	6,8	1	1	0	0
9	21,6	29,1	16,7	75,5	0,0	0	0	0	1 (M)
10	20,9	27,6	15,3	75,7	13,4	2	2	0	0
11	20,4	27,7	15,3	76,4	3,2	3	0	0	0

¹dias com a ocorrência de chuva, com intervalo máximo de um dia entre eles.

²Número de dias favoráveis calculado de acordo com Katsurayama, Boneti e Becker (2000) que consideram um DF como sendo aquele com período de molhamento foliar (PMF) acima de 10 horas (PMF>10 h) e temperatura acima de 15 ° C (T>15 ° C).

³Pulverizações com fungicidas sistêmicos (tiofanato metílico (T)) e protetores (mancozebe (M), clorotalonil (C)).

Tabela 4 - Área abaixo da curva do progresso da severidade (AACP sev), da incidência (AACP inc) e do número de folhas (AACP n° de folhas) da mancha foliar de Glomerella (*Colletotrichum* spp.) em plantas de macieira (*Malus domestica*) de pomar comercial pulverizadas com antagonistas biológicos em duas áreas (A1 e A2). Campo Largo/PR.

Tratamento	AACP sev ¹		AACP n° de folhas ²		AACP inc ¹	
	A1	A2	A1	A2	A1	A2
<i>Pseudomonas putida</i> (A68)	19,90 ns	18,78 ns	512,20 ns	587,35 ns	65,11 ns	69,19 ns
<i>Bacillus</i> sp. (C02)	20,34	15,17	484,60	586,30	62,05	63,28
<i>Bacillus alcalophilus</i> (C12)	15,96	22,15	561,65	609,05	68,49	67,94
Serenade®	19,05	23,47	547,05	635,75	68,96	67,63
Testemunha	21,23	19,60	507,95	571,20	71,43	66,62
CV (%)	39,26	25,20	11,86	8,66	12,85	8,78

¹Para análise estatística os dados foram transformados por $y=\sqrt{x}$, em que x se refere a AACP.

²Dados originais, sem transformação.

ns = não significativo.

Tabela 5 - Severidade da mancha foliar de *Glomerella* (*Colletotrichum* spp.) imediatamente anterior a queda da folha (SAQ) em plantas de macieira (*Malus domestica*) de pomar comercial pulverizadas com antagonistas biológicos em duas áreas (A1 e A2). Campo Largo/PR.

Tratamento	SAQ ¹	
	A1	A2
<i>Pseudomonas putida</i> (A68)	17,49 a	19,82 ab
<i>Bacillus</i> sp. (C02)	17,65 a	17,66 b
<i>Bacillus alcalophilus</i> (C12)	14,65 ab	19,19 b
Serenade®	14,72 ab	22,84 a
Testemunha	12,76 b	19,00 b
CV (%)	71,16	42,05

¹ Dados originais, sem transformação; médias seguidas da mesma letra, nas colunas, não diferem significativamente entre si pelo teste t, ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 6 - Média do número de lesões por fruto, após 17 dias de incubação, causadas por *Colletotrichum* spp. em frutos de maçã 'Gala' desinfestados e não desinfestados, coletados em pomar comercial pulverizado com antagonistas biológicos. Curitiba/PR.

Tratamento	Desinfestação	Número de manchas ¹		
		Área 1	Área 2	Média
<i>Pseudomonas putida</i> (A68)	Com	3,25 ns	0,75 ns	1,17 A
<i>Bacillus</i> sp. (C02)		1,85	1,60	
<i>Bacillus alcalophilus</i> (C12)		1,30	1,80	
Serenade®		2,50	0,95	
Testemunha		2,35	3,00	
<i>Pseudomonas putida</i> (A68)	Sem	2,72 ns	2,88 ns	1,36 B
<i>Bacillus</i> sp. (C02)		2,84	2,52	
<i>Bacillus alcalophilus</i> (C12)		5,16	3,60	
Serenade®		3,92	1,96	
Testemunha		2,64	3,04	
Média		1,34 A	1,18 B	

¹Para análise estatística os dados foram transformados por $y = 1/3$. Médias seguidas da mesma letra, nas linhas, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. ns = não significativo.

5 CONCLUSÕES GERAIS

Bacillus sp., *Bacillus alcalophilus* e Serenade® (*Bacillus subtilis*), apesar de apresentarem antagonismo contra *Colletotrichum* do grupo *acutatum* em ensaios realizados *in vitro*, não mostraram o mesmo potencial para controlar a MFG no campo. A avaliação *in vitro* do antagonismo destes isolados bacterianos contra várias espécies do gênero *Colletotrichum*, inclusive espécies pertencentes a outros complexos, poderia explicar melhor o comportamento do biocontrole no campo. É preciso fazer um levantamento nas áreas de cultivo de macieira para se saber qual a predominância de espécies de *Colletotrichum*. Com essa informação, há possibilidade de sucesso do controle da mancha das folhas pelo manejo integrado com a utilização de controle químico e biológico.

Outro fator necessário seria determinar épocas e formas adequadas de aplicação e concentração dos propágulos para aplicação no campo, verificar a sobrevivência da bactéria na planta durante a safra e na entressafra e, estudar formulações que mantivessem estáveis os compostos produzidos pelas bactérias quando em contato com as condições adversas do ambiente.

A utilização de bactérias do filoplano no controle da MFG é uma prática com potencial, pois na época de epidemia da doença o clima é ameno e propício para a multiplicação das bactérias na superfície da planta, sem que haja necessidade de reaplicações frequentes, além disso, a capacidade de combinar antagonistas e fungicidas pode ser um dos meios de otimizar o seu uso, aumentando a eficiência e permitindo a inserção do controle biológico em um sistema de manejo integrado da doença.

REFERÊNCIAS

ANDREWS, J. H. Biological control in the phyllosphere. **Annual Review of Phytopathology**, v.30, p.603-635, 1992.

AZEVEDO, J. L.; SERAFINE, L. A.; BARROS, N. M. Microrganismos endofíticos e seu papel em plantas tropicais. In: SERAFINE, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. **Biotechnologia: Avanços na Agricultura e na Indústria**. Editora Universidade de Caxias do Sul: Caxias do Sul, 2002. p.233-265.

BAKER, K. F.; COOK, R. J. **Biological control of plant pathogens**, W. H. Freeman: San Francisco, 1974.

BARRETTI, P. B.; ROMEIRO, R. S.; ANDRADE, C. G.; SILVA, H. S. A. Evidência experimental de que alguns endofitas podem atuar como agentes de biocontrole em tomateiro por indução de resistência. **Fitopatologia Brasileira**, v.25, p.319 - 320, 2000.

BECKER, J. O.; SCHWINN. Control of soil-borne pathogens with living bacteria and fungi: status and outlook. **Journal of Pest Science**, v.37, p.355 - 363, 1993.

BECKER, W. F.; KATSURAYAMA, Y.; BONETI, J. I. S. Mancha foliar da Gala: principal doença de verão da cultura da macieira. **Agropecuária Catarinense**, v.13, p.14-20, 2000.

BETTIOL, W. Biocontrole na filosfera: problemas e perspectivas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.5, p.59-97, 1997.

BLAKEMAN, J. P.; FOKKEMA, N. J. Potential for biological control of plant diseases on the phylloplane. **Annual Review of Phytopathology**, v.20, p.167-192, 1982.

BLEICHER, J. Botânica e fisiologia. In: EPAGRI (Ed.) **A Cultura da Macieira**. Florianópolis, Epagri, 2002. p. 29-36.

BLUM, L. E. B. *Cryptococcus laurentii* aplicado em pós-colheita reduz podridões em maçãs. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, n.4, p.433-436, 2004.

BONETI, J. I. S.; CESAR, J. D.; PETRI, J. L.; BLEICHER, J. Evolução da cultura da macieira In: **A Cultura da Macieira**. Florianópolis, 2002.

BONETI, J. I .S.; BECKER, W. F.; KATSURAYAMA, Y. Sistema de previsão da mancha-foliar-da-Gala em macieira, cultivar Gala. **Agropecuária Catarinense**, v.17, p.64-67, 2004.

BORA, L. C.; GANGOPADHYAY, S.; CHAND, J. N. Biological control of bacterial leaf spot (*Xanthomonas campestris* pv. *vignaeradiatae* Dye) of mung bean with phylloplane antagonists. **Indian Journal of Mycology and Plant Pathology**, v.23, p.162- 168, 1993.

BOST, S.; HALE, F. The apple leaf blotches: Necrotic, *Alternaria*, and *Glomerella*. **Fruit Pest News**, v.5,p.1-3, 2004.

BRAGANÇA, C. A. D. **Molecular characterization of *Colletotrichum* spp. associated with fruits in Brazil**. 69 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - ESALQ/USP, São Paulo, 2013.

BRAUN-KIEWNICK, A.; JACOBSEN, B. J.; SANDS, D.C. Biological control of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, the causal agent of basal kernel blight of barley, by antagonistic *Pantoea agglomerans*. **Phytopathology**; v.90, p.368-375, 2000.

CAMPOS SILVA, J. R.; SOUZA, R. M.; ZACARONE, A. B.; SILVA, L. H. C. P.; CASTRO, A. M. S. Bacterias endofíticas no controle e inibicao *in vitro* de *Pseudomonas syringae* pv. tomato, agente da pinta bacteriana do tomateiro. **Ciência e Agrotecnologia**, v.32, p.1062-1072, 2008.

CARISSE, O.; PHILION, V.; ROLLAND, D.; BERNIER, J. Effect of fall application of fungal antagonists on spring ascospore production of apple scab pathogen, *Venturia inaequalis*. **Phytopathology**, v.90, p.31–37. 2000.

CARRER FILHO, R.; ROMEIRO, R. S.; NEVES, D. M. S.; ARAUJO, J. C. A.; MIZUBUTI, E. S. G. Residentes de filoplano e sua potencialidade no biocontrole de enfermidades da parte aérea do tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.24, p.247, 1999. Suplemento.

CHANWAY, C. P.; RADLEY, R. A.; HOLL, F. B. Inoculation of Conifer Seed with Plant Growth Promoting *Bacillus* Strains Causes Increased Seedling Emergence and Biomass. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 23, n. 6, p. 575-580, 1991.

COOK, R. J. Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens. **Annual Review of Plant Phytopathology**, v.31, p.53 - 80, 1993.

COPEL, W.E.; THOMSON, J.L. Survival analysis to determine the length of the incubation period of camellia twig blight caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. **Plant Disease**, v. 92, p. 1177-1182, 2008.

CRAWFORD, D. L.; LYNCH, J. M.; WHIPPS, J. M.; OUSLEY, M. A. Isolation and characterization of actinomycete antagonists of a fungal root pathogen. **Applied Environment Microbiology**, v. 59, p.3899 - 3905, 1993.

CRUSIUS, L. U. **Epidemiologia da mancha foliar da macieira**. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Setor de Fitopatologia, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2000.

CRUSIUS, L. U.; FORCELINI, C. A.; SANHUEZA, R. M. V.; FERNANDES, J.M.C. Epidemiology of apple leaf spot. **Fitopatologia Brasileira**, v.27, p.65-70, 2002.

DAMM U.; CANNON P. F.; WOUDEBERG J. H. C.; CROUS P. W. The *Colletotrichum acutatum* species complex. **Studies in Mycology**, v.73, p.37-113, 2012.

DEACON, J. W. Significance of ecology in the development of biocontrol agents against soil-born plant pathogens. **Biocontrol Science and Technology**, v.1, p.5 - 20, 1991.

ELABYAD, M. S.; ELSAYED, M. A.; ELSHANSOURY, A. R.; ELSABBAGH, S. M. Towards the biological control of fungal and bacterial diseases of tomato using antagonistic *Streptomyces* spp. **Plant soil**, v.149, p.185 - 195, 1993.

FILIPPI, M. C. C.; SILVA, G. B.; SILVA-LOBO, V. L.; CÔRTEZ, M. V. C. B.; MORAES, A. J. G.; PRABHU, A. S. Leaf blast (*Magnaporthe oryzae*) suppression and growth promotion by rhizobacteria on aerobic rice in Brazil. **Biological Control**, 2011.

GARITA, V. S.; BUSTAMANTE, E.; SHATTOCK, R. Selección de antagonistas para el control biológico de *Phytophthora infestans* en tomate. **Manejo Integrado de Plagas**, v.48, p.25-34, 1998.

GOMES, A. M. A.; ARAÚJO, D. V.; MARIANO, R. L. R. Utilização de bactérias no controle da murcha-de-fusario em tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.24, p.288, 1999.

GONZÁLEZ, E.; SUTTON, T. B. First report of *Glomerella* leaf spot (*Glomerella cingulata*) of apple in the United States. **Plant Disease**, v.83, p.1174. 1999.

HALFELD-VIEIRA, B. A.; ROMEIRO, R. S.; CARRER FILHO, R. Atividade antagonística *in vitro* de residentes do filoplano de tomateiro contra fitopatógenos fúngicos e bacterianos da cultura. **Fitopatologia Brasileira**, v.25, p.347, 2000.

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W.F.; KLOPPER, J.W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, n.10, p.895-914, 1997.

HAMADA, N. A. Influência da temperatura e do período de molhamento foliar (PMF) na incidência e severidade da mancha-foliarda-Gala (*Colletotrichum* spp.). **Agropecuária Catarinense**, v.18, p.73-77, 2005.

HAMADA, N. A.; NESI, C. N.; ALVES, G.; MAY DE MIO, L. L. Fungicidas associados ou não a fosfitos no controle da mancha foliar de glomerella em macieira. **Agrária**, v.7, p.831-837, 2012.

HEYE, C. C.; ANDREWS, J. H. Antagonism of *Athelia bombacina* and *Chaetomium globosum* to the apple scab pathogen, *Venturia inaequalis*. **Phytopathology**, v.73, p.650–654, 1983.

HIRAOKA, H.; ASAKA, O.; ANO, T.; SHODA, M. Characterization of *Bacillus subtilis* rb14, coproducer of peptide antibiotics iturin A and surfactin. **Journal of General and Applied Microbiology**, v.38, p.635-640, 1992.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Levantamento sistemático da produção agrícola**. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/cidadesat/xtras/temas.php?codmun=432250&idtema=99&search=rio-grande-do-sul|vacaria|lavoura-permanente-2011>. Acesso em 20 de março de 2013.

ICEPA, Instituto de Planejamento e Economia Agrícola de Santa Catarina. **Síntese anual de agricultura de Santa Catarina 2004- 2005**. Disponível em: www.icepa.com.br/ Acesso em: 12 maio de 2013.

IUCHI, V. L. Botânica e fisiologia. In: Epagri (Ed.) **A Cultura da Macieira**. Florianópolis, Epagri, 2002. p. 59-104.

JANISIEWICZ, W. J.; T. J. TWORKOSKI; C. P. KURTZMAN. Biocontrol potential of *Metchnikowia pulcherrima* strains against blue mold of apple. **Phytopathology**, v.91, p.1098–1108, 2001.

JIMÉNEZ, J. M.; GALINDO, J. J.; RAMÍREZ, C.; ENRÍQUEZ, G. A. Evaluacion Del combate biologico y quimico de la moniliasis (*Moniliophthora roreri*) del cacao en Costa Rica. **Cocoa producers' Alliance**, p.553 - 456, 1988.

JINDAL, K. K.; THIND, B. S. Evaluation of green gram microflora for the control of *Xanthomonas campestris* pv. *vignaeradiatae*, the incitant of bacterial leaf spot. **Plant Disease Research**, v.9, p.10-19, 1994.

JONES, A. L.; SUTTON, T. B. **Diseases of tree fruits in the East**. Michigan State University, 1996.

JUNQUEIRA, N. T. V.; GASPAROTO, L. Controle biológico de fungos estromáticos causadores de doenças foliares em seringueira. In: Bettiol, W. (Ed). **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA - CNPDA, 1991. p.307 – 329.

KATSURAYAMA, Y.; BONETI, J. I. S. Epidemiologia da Mancha Foliar da Gala. In: **IV Reunião Anual de Fitossanidade na Cultura da Macieira**. São Joaquim: Epagri. 1999.

KATSURAYAMA, Y.; BONETI, J. I. S.; BECKER, W. F. Mancha foliar da Gala: principal doença de verão da cultura da macieira. **Agropecuária catarinense**, v.13, p.14-20, 2000.

KATSURAYAMA, Y.; TSUCHIYA, S.; BONETI, J. I. S. Herança da resistência da macieiras à mancha da Gala (*Colletotrichum goeosporioides*). **Fitopatologia Brasileira**, v.26, p.409, 2001.

KATSURAYAMA, Y.; BONETI, J. I. S. Manejo das doenças de verão da macieira no sul do Brasil In: STADNIK, M.J. (Ed.) **Manejo Integrado de Doenças da Macieira**. Florianópolis, CCA-UFSC, 2009. p.45-64.

KATSURAYAMA, Y.; BONETI, J. I. S. Manejo da mancha da Gala. **Agropecuária catarinense**, v.25, n.2, p.45-51. 2012. Suplemento.

KINKEL, L. L.; WILSON, M.; LINDOW, S. E. Utility of microcosm studies for predicting phylloplane bacterium population sizes in the field. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, p.3413-3423, 1996.

KINKLE, L. L. Microbial population dynamics in leaves. **Annual Review of Phytopathology**, v.35, p.327-347, 1997.

KONG, G. A.; KOCHMAN, J. K.; BROWN, J. F. Phylloplane Bacteria Antagonistic to the Sunflower Pathogen *Alternaria helianthi* Australas. **Plant Pathology**, v.26, p.85-97, 1997.

KORSTEN, L.; DE JAGER, E. S.; DE VILLIERS, E. E.; KOTZÉ, J. M.; WEHNER, F. C. Evaluation of bacterial epiphytes isolated from avocado leaf and fruit surfaces for biocontrol of avocado postharvest diseases. **Plant disease**, v.79, p.1149 - 1156, 1995.

KRAUS, J.; LOPER, J. E. Lack of evidence for a role of antifungal metabolite production by *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 in biological control of *Pythium* damping-off of cucumber. **Phytopathology**, v.82, p.264 - 271, 1992.

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

LEITE, R. P.; TSUNETTA, M.; KISHINO, A. Y. Ocorrência de mancha foliar de *Glomerella* em macieira no estado do Paraná. Fundação Instituto Agrônômico do Paraná. **Informe de Pesquisa**, v.81, 1988.

LEMANCEAU, P.; BAKKER, P. A. H. M.; DEKOGEL, W. J.; ALABOUVETTE, C.; SCHIPPERS, B. Antagonistic effect of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47 and pseudobactin 358 upon pathogenic *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*. **Applied Environmental Microbiology**, v.59, p.74 - 82, 1993.

LIAO, C. H. Antagonism of *Pseudomonas putida* strain PP22 to Phytopathogenic bacteria and its potential use as a biocontrol agent. **Plant disease**, v.73, p.223 - 226, 1989.

LUZ, W. C. Rhizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas e de Bioproteção. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.4, p.1-49, 1996.

MACAGNAN, D. **Isolamento e seleção de bactérias endosporogênicas e do tipo actinomicetos visando biocontrole da vassoura-de-bruxa (*Crinipellis pernicioso*) e da podridão parda (*Phytophthora* spp.) do Cacaueiro (*Theobroma cacao* L.) e estudos dos mecanismos de antagonismo ao fungo *Crinipellis pernicioso***. 122 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2005.

MARIANO, R. L. R., et al. Biocontrole de Doenças de Plantas. In: SEMANA DE FITOSSANIDADE, 2000, Recife. **Livro de Palestra e Mini Cursos - Desafios no Manejo Integrado de Pragas e Doenças**. Recife: UFPE, p 78-111, 2000.

MERRIMAN, P.; RUSSEL, K. Screening strategies for biological control. In: HORNBY, D. (Ed). **Biological control of soil-borne plant pathogens**. Wallingford, Oxon: C.A.B. International, 1990.

MICHEREF, S. J.; SILVEIRA, N. S. S.; MARIANO, R. L. R. Antagonismo de bactérias sobre *Colletotrichum graminicola* e potencial de biocontrole da antracnose do sorgo. **Fitopatologia Brasileira**, v.19, p.541 - 545, 1994.

MICHEREF, S. J.; SILVEIRA, N. S. S.; REIS, A.; MARIANO, R. L. R. Epiphytic Bacteria Antagonistic to *Curvularia* leaf spot of yam. **Microbial ecology**, v.28, p.101-110, 1994.

MIZUBUTI, E. S. G.; MAFFIA, L. A.; MUCHOVEJ, J. J.; ROMEIRO, R. S.; BATISTA, U. G. Selection of isolates of *Bacillus subtilis* with potential for the control of dry bean rust. **Fitopatologia Brasileira**, v.20, p.540 - 544, 1995.

MONTESINOS, E.; BONATERRA, A.; OPHIR, Y.; BEER, S. V. Antagonism of selected bacterial strains to *Stemphylium vesicarium* and biological control of brown spot of pear under controlled environment conditions. **Phytopathology**, v.86, p.856 - 863, 1996.

NACHTIGALL, G. R. Aspectos Socioeconômicos da Cultura da Maçã. In: NACHTIGALL, G.R (Ed) **Maçã Produção**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, p.9-16, 2004.

NASCIMENTO, J. F.; ROMEIRO, R. S.; SPONHOLZ, C.; RUANO, O.; PIZZINATO, M. A. Microbiolização de sementes de algodoeiro com rizobactérias, promoção de crescimento e indução de resistência a *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*. **Fitopatologia Brasileira**, v.24, p. 252, 1999.

O'BRIEN, R. D.; LINDOW, S. E. Effect of plant species and enviromental conditions on epiphytic population sizes of *Pseudomonas syringae* and other bacteria. **Phytopathology**, v.79, p.619 - 627, 1989.

OKU, H. Basic Principals of Plant Disease Control. In: OKU, H. **Plant Pathogenesis and Disease Control**. New York: CRC Press, INC., 1994. p. 1-2.

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

PERONDI, N. L.; LUZ, W. C. D.; THOMAS, R. Controle microbiológico da giberela do trigo. **Fitopatologia Brasileira**, v.212, p.243 - 249, 1996.

PETRI, J. L.; LEITE, G. B.; COUTO, M.; FRANCESCATTO, P. Avanços na cultura da macieira no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Volume Especial, p.48-56, 2011.

PETRI, J. L.; PALLADINI, L. A.; POLA, A. C. Dormência e indução da brotação da macieira. In: EPAGRI (Eds) **A cultura da macieira**. Florianópolis, Epagri, 2002. p.261-298.

ROLLEMBERG, C. L. **Mancha das folhas da macieira: caracterização fisiológica dos agentes causais, controle biológico com bactérias residentes de filoplano e sensibilidade dos antagonistas a fungicidas e inseticidas**. 124 f. Dissertação (Mestrado em fitopatologia) - Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Universidade Federal do Paraná, 2008.

ROMEIRO, R. S.; NEVES, D. M. S.; CARVALHO, M. G.; CARRER FILHO, R. Seleção de bactérias residentes de filoplano de tomateiro como agentes de biocontrole de enfermidades da parte aérea da cultura. **Summa Phytopathologica**, v.26, p.220 - 224, 2000a.

ROMEIRO, R. S.; NEVES, D. M. S.; HALFELD-VIEIRA, B. A.; MIZUBUTI, E. S. G.; DEUNER, C. C. Inadequação de apenas um patógeno desafiante na seleção massal de residentes de filoplano para fins de controle biológico - um caso. **Summa Phytopathologica**, v.26, p.142, 2000b.

SANDOVAL, G. A. D.; ARMBRECHT, H.; GRANADA, A. Posibilidad de control biologico de la moniliasis del cacao. In: **Proceedings 10th International Cocoa Research Conference Cocoa producers' Alliance**, 1988. p.473 - 477.

SILVA, H. S. A.; ROMEIRO, R. S.; DEUNER, C. C. Rizobactérias como indutoras de resistência sistêmica à mancha pequena do tomateiro (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*). **Fitopatologia Brasileira**, v.25, p.330 - 331, 2000.

STADNIK, M.J.; ARAÚJO, L.; SANHUEZA, R.M.V. Estratégias alternativas de controle da mancha foliar de glomerella e da sarna da macieira. In: Stadnik MJ (Ed) **Manejo Integrado de Doenças da Macieira**. Florianópolis, CCA-UFSC. p. 105-126, 2009.

STOCKWELL, V. O.; JOHNSON, K.B.; LOPER, J. E. Establishment of bacterial antagonists of *Erwinia amylovora* on pear and apple blossoms as influenced by inoculum preparation. **Phytopathology**, v.88, p.506-513, 1998.

STROMBERG, K. D.; KINKEL, L. L.; LEONARD, K. J. Interactions between *Xanthomonas translucens* pv. *translucens* the causal agent of bacterial leaf streak of wheat, and bacterial epiphytes in the wheat phyllosphere. **Biological Control**, v.17, p.61 - 72, 2000.

SUDO, S. **Biocontrole de *Catacauma torrendiella* e *Coccostroma palmicola***. USP/EMBRAPA, p.57 - 59, 1989.

SUTTON, J. C.; PENG, G. Manipulation and vectoring of biocontrol organisms to manage foliage and fruit diseases in cropping systems. **Annual Review of Phytopathology**, v.31, p.473-493, 1993.

TALAMINI, V.; STADNIK, M. J. Extratos vegetais e de algas no controle de doenças de plantas. In: **Manejo ecológico de doenças de plantas**, Florianópolis, SC: CCA/ UFSC. 2004. p.45-62.

TAVARES, S. C. C. H. Controle biológico clássico de patógenos de frutas no Brasil - Situação atual. In: SINCOBIOL, 5., Foz do Iguaçu. **Anais...** Foz do Iguaçu, 1996. p.57-68.

THOMSON, S. V.; SCHROTH, M. N.; MOLLER, W. J.; REIL, W. O. Efficacy of bactericides and saprophytic bacteria in reducing colonization and infection of pear flowers by *Erwinia amylovora*. **Phytopathology**, v.66, p.1457 - 1459, 1976.

THOMSON, J. A. Biological Control of Plant Pests and Pathogens: Alternative Approaches. In: CHET, Ilan. **Biotechnology in Plant Disease Control**. New York: Editora Wiley-Liss, INC., 1993. p.275-290.

THOMASHOW, L. S., WELLER, D. M. Current Concepts in the Use of Introduced Bacteria for Biological Disease Control: Mechanisms and Antifungal Metabolites. In: STACEY, G.; KEEN, N.T. **Plant-Microbe Interactions**. New York: Editora Chapman & Hall, 1996. v. 1, p.187-235.

TROTEL-AZIZ, P.; CONDERCHET, M.; BIAGIANTI, S.; AZIZ, A. Characterization of new bacterial biocontrol agents *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Pantoea* and *Pseudomonas* spp. mediating grapevine resistance against *Botrytis cinerea*. **Environmental and Experimental Botany**, v.64, p.21-32, 2008.

VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M.; BECKER, W.; BONETI, J. I. S.; KATSURAYAMA, Y.; CZERMAINSKI, A. B. C. **Manejo das doenças de verão na produção integrada de maçã**. Circular técnica. Embrapa, n.36, 2002.

VALE, F. X. R.; JESUS JÚNIOR, W. C.; LIBERATO, J. R.; SOUZA, C. A. Quantificação de doenças e do crescimento do hospedeiro. In: VALE, F. X. R.; JESUS JÚNIOR, W. C.; ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Epidemiologia aplicada ao manejo de doenças de plantas**. Belo Horizonte: Perfíl, 2004. p.91-126.

VALIDOV, S. Z., KAMILOVA, F., QI, S., STEPHAN, D., WANG, J. J., MAKAROVA, N., LUGTENBERG, B. Selection of bacteria able to control *Fusarium oxysporum* f. sp radicislycopersici in stonewool substrate. **Journal of Applied Microbiology**, v.102, p.461–471, 2007.

VÉLEZ, P. E.; ROSILLO, A. G. Evaluación del antagonismo del hongo *Verticillium lecanii*, sobre *Hemileia vastatrix*, em condiciones de invernadero y de campo. **Cenicafé**, v.46, p.45 - 55, 1995.

WANG, C. X.; ZHANG, Z. F.; LI, B. H. First report of Glomerella Leaf Spot of Apple Caused by *Glomerella cingulata* in China. **Plant Disease**, v.96, n.6, p.912, 2012.

WELLER, D. M. Biological Control of Soilborn Plant Pathogens in The Rhizosphere with Bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v. 26, p. 379-407, 1988.

WEIR B. S.; JOHNSTON, P. R.; DAMM, U. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. **Studies in Mycology**, v.73, p.115–180, 2012.

YUEN, G. Y.; STEADMAN, J. R.; LINDGREN, D. T.; SCHAFF, D.; JOCHUM, C. Bean rust biological control using bacterial agents. **Crop Protection**, v.20, p.395 - 402, 2001.

ZHANG, Z.; YUEN, G. Y. The role of chitinase production by *Stenotrophomonas maltophilia* strain C3 in biological control of *Bipolaris sorokiniana*. **Phytopathology**, v.90, p.384-389, 2000.

APÊNDICE

Apêndice 1 - Parâmetros do modelo monomolecular ajustados aos dados de incidência e parâmetros do modelo logístico ajustados aos dados de severidade da MFG em mudas de macieira 'Gala' tratadas com antagonistas biológicos semanalmente durante cinco semanas e inoculadas com isolado de *Colletotrichum* do grupo *acutatum* (Col01). Curitiba/PR. Experimento 1 (1) e experimento 2 (2).

Trat.	Parâmetros Epidemiológicos													
	<i>Pseudomonas putida</i>		<i>Bacillus alcalophilus</i>		<i>Bacillus</i> sp.		Serenade®		Água		Controle			
	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)		
<i>P. putida</i>	Inc	y		ns	ns	*	ns	ns	ns	*	ns	*	ns	
		y_0		ns	*	*	*	*	ns	ns	*	ns	*	
		r		ns	ns	*	*	*	ns	ns	ns	ns	ns	
	sev	y		*	*	*	*	*	ns	*	*	ns	*	
		y_0		ns	ns	*	*	ns	ns	ns	*	*	ns	
		r		ns	ns	ns	*	*	ns	*	ns	ns	ns	
<i>B. alcalophilus</i>	Inc	y				*	ns	ns	*	*	*	*	ns	
		y_0					*	*	ns	*	ns	*	*	
		r					*	*	*	ns	ns	ns	*	
	sev	y					*	*	*	*	ns	ns	*	*
		y_0					*	*	ns	ns	*	ns	*	ns
		r					ns	*	*	*	*	ns	ns	
<i>Bacillus</i> sp.	Inc	y						*	*	*	*	*	*	
		y_0						*	ns	*	ns	*	ns	
		r							ns	*	*	*	ns	
	sev	y							*	*	*	*	*	*
		y_0							*	*	*	*	*	*
		r							*	*	*	*	ns	*
Serenade®	Inc	y								ns	ns	ns	ns	
		y_0								*	ns	*	*	
		r								*	ns	*	*	
	sev	y								*	*	ns	*	
		y_0								ns	*	*	ns	
		r								ns	ns	ns	ns	
Água	Inc	y										ns	*	
		y_0											ns	ns
		r											ns	*
	sev	y											*	*
		y_0											*	ns
		r											*	ns

ns = parâmetros estimados não apresentam diferença significativa entre si pelo teste t-Student, a 5% de significância. *Parâmetros estimados apresentam diferença significativa entre si pelo teste t-Student, a 5% de significância. y = assíntota máxima, y_0 = inóculo inicial, r = taxa de progresso.

Apêndice 2 - Parâmetros do modelo monomolecular ajustados aos dados de incidência e parâmetros do modelo logístico ajustados aos dados de severidade da MFG em mudas de macieira 'Gala' tratadas com antagonistas biológicos semanalmente durante cinco semanas e inoculadas com isolado de *Colletotrichum* do grupo *acutatum* (Col156). Curitiba/PR. Experimento 1 (1) e experimento 2 (2).

Trat.	Parâmetros Epidemiológicos													
	<i>Pseudomonas putida</i>		<i>Bacillus alcalophilus</i>		<i>Bacillus</i> sp.		Serenade®		Água		Controle			
	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)		
<i>P. putida</i>	Inc	<i>y</i>		*	ns	*	*	ns	ns	*	*	*	*	
		<i>y</i> ₀		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	
		<i>r</i>		ns	*	*	ns	ns	*	ns	ns	ns	*	
	sev	<i>y</i>		*	*	*	*	*	*	*	*	ns	*	
		<i>y</i> ₀		*	*	*	ns	*	*	*	*	*	ns	
		<i>r</i>		ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	
<i>B. alcalophilus</i>	Inc	<i>y</i>				ns	ns	*	ns	*	ns	ns	ns	
		<i>y</i> ₀					ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	
		<i>r</i>					ns	*	ns	ns	ns	*	ns	
	sev	<i>y</i>					*	ns	*	*	ns	*	ns	
		<i>y</i> ₀					ns	ns	ns	ns	*	ns	*	
		<i>r</i>					ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	
<i>Bacillus</i> sp.	Inc	<i>y</i>						*	ns	*	ns	ns	ns	
		<i>y</i> ₀						ns	ns	ns	ns	*	ns	
		<i>r</i>						*	*	ns	ns	ns	*	
	sev	<i>y</i>							*	*	ns	*	ns	
		<i>y</i> ₀							ns	*	*	ns	*	
		<i>r</i>							*	ns	ns	ns	*	
Serenade®	Inc	<i>y</i>								*	ns	*	ns	
		<i>y</i> ₀								ns	ns	ns	ns	
		<i>r</i>								ns	*	ns	*	
	sev	<i>y</i>								*	*	*	*	
		<i>y</i> ₀								*	ns	*	*	
		<i>r</i>								ns	ns	ns	ns	
Água	Inc	<i>y</i>										*	ns	
		<i>y</i> ₀										ns	ns	
		<i>r</i>										ns	*	
	sev	<i>y</i>											*	ns
		<i>y</i> ₀											*	*
		<i>r</i>											*	ns

ns = parâmetros estimados não apresentam diferença significativa entre si pelo teste t-Student, a 5% de significância.

*Parâmetros estimados apresentam diferença significativa entre si pelo teste t-Student, a 5% de significância.

y = assíntota máxima, *y*₀ = inóculo inicial, *r* = taxa de progresso.