

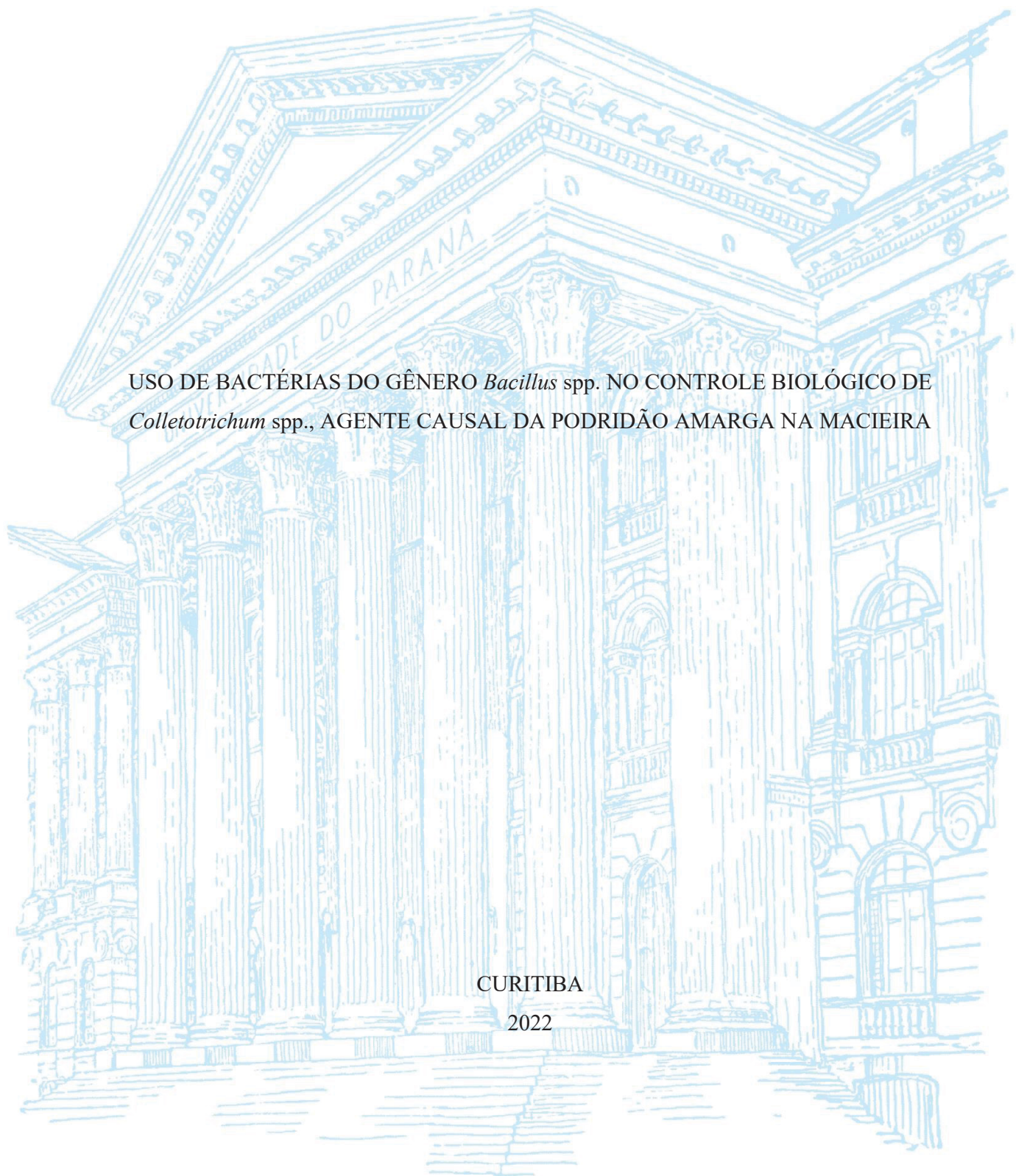
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DÉBORA PETERMANN

USO DE BACTÉRIAS DO GÊNERO *Bacillus* spp. NO CONTROLE BIOLÓGICO DE
Colletotrichum spp., AGENTE CAUSAL DA PODRIDÃO AMARGA NA MACIEIRA

CURITIBA

2022



DÉBORA PETERMANN

USO DE *Bacillus* spp. NO CONTROLE BIOLÓGICO DE *Colletotrichum* spp. AGENTE
CAUSAL DA PODRIDÃO AMARGA NA MACIEIRA

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, Departamento de Fitotecnia e Fitossanidade, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Profa. Dr^a. Louise Larissa May De Mio

Coorientadora: Dr^a. Rafaele Regina Moreira

CURITIBA

2022

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP) UNIVERSIDADE
FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

Petermann, Débora

Uso de bactérias do gênero *Bacillus spp.* no controle biológico
de *Colletotrichum spp.*, agente causal da podridão amarga na
macieira / Débora Petermann . – Curitiba, 2022.

1 recurso online: PDF.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná,
Setor de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em
Agronomia (Produção Vegetal).

Orientadora: Prof^a Dr^a Louise Larissa May De Mio

Coorientadora: Dr^a Rafaela Regina Moreira

1. Maçã - Doenças e pragas. 2. Fungos. 3. Agentes no
controle biológico de pragas. I. May De Mio, Louise Larissa. II.
Moreira, Rafaela Regina. III. Universidade Federal do Paraná.
Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Produção Vegetal).
IV. Título.

Bibliotecária: Telma Terezinha Stresser de Assis CRB-9/944

TERMO DE APROVAÇÃO



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO AGRONOMIA
(PRODUÇÃO VEGETAL) - 40001016031P6

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação AGRONOMIA (PRODUÇÃO VEGETAL) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **DÉBORA PETERMANN** intitulada: **USO DE BACTÉRIAS DO GÊNERO *Bacillus* spp. NO CONTROLE BIOLÓGICO DE *Colletotrichum* spp., AGENTE CAUSAL DA PODRIDÃO AMARGA EM MACIEIRA**, sob orientação da Profa. Dra. LOUISE LARISSA MAY-DE-MIO, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 26 de Outubro de 2022.

Assinatura Eletrônica

26/10/2022 14:07:29.0

LOUISE LARISSA MAY-DE-MIO

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

26/10/2022 14:16:38.0

HELOISA THOMAZI KLEINA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ - UFPR)

Assinatura Eletrônica

26/10/2022 11:15:18.0

RAFAELE REGINA MOREIRA

Coorientador(a)

Dedico este trabalho à minha mãe Beatris, ao meu pai Ademir e as minhas irmãs Bruna e Elaine, como forma de gratidão por todo o apoio e incentivo que me dão para que eu atinja os meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Beatris Petermann; ao meu pai, Ademir Petermann; as minhas irmãs, Bruna Petermann e Elaine Petermann; e ao meu cunhado, Thiago Júlio Reis, por serem fundamentais em todas as minhas conquistas e não medirem esforços para me ajudar. Estão sempre me apoiando para que eu alcance meus sonhos. Obrigado por todo o carinho e amor.

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

À minha orientadora, professora Dr.^a Louise Larissa May De Mio, por toda a sua paixão pela ciência, entusiasmo, ensinamentos, curiosidades e experiências, que está sempre compartilhando e que inspiram o meu crescimento. Obrigada por toda a paciência e por me auxiliar nos meus maiores desafios.

À minha coorientadora, Dr.^a Rafaela Regina Moreira, pelo seu amor à pesquisa, que também me inspira e está sempre disponível para me ensinar, tirar dúvidas, conversar e orientar. Muito obrigada pela atenção; é e foi extremamente importante na minha formação

Aos meus amigos do LEMID: Elizeu Junior, Mayara Catherine, André Graf, Alexandre Claus, Camilla Castellar, Jhulia Gelain, Giovana Beger, Daniel Steiner, Heloisa Thomazi, Camila Zela, Rafaela Regina Moreira, Marlon Hahn, Juliana Maia, Fernando Albertin, Érica Zielinski e Daniele Dutra obrigado pela amizade e por compartilharem o dia a dia de trabalho comigo.

À minha grande amiga Brenda Tortelli, por toda amizade e apoio. Muito obrigada por me ouvir nos momentos de grande dificuldade.

À minha estagiária Nicolly Campezi Xavier, que me ajudou na condução e avaliação de todos os experimentos. Além disso, se tornou uma amiga.

Aos meus amigos: Maria Gabriela Rocha, Gabriel Koch, Joabe Rodrigues, Maria Joana, Maria Letícia Mariani, Maria Eduarda Coelho e João Pedro Barros pelos momentos de descontrações, por toda amizade e apoio que sempre me deram.

Ao Doutorando Marcos Paulo Rosa, pela ajuda e produção das bactérias que foram utilizadas para a condução desse trabalho.

Aos técnicos do laboratório, que estavam sempre disponíveis em especial, à técnica Marli Izabel Miranda Borges.

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

As secretárias do PGAPV, Lucimara Antunes e Tatiana Miranda Borges, pelo auxílio, disposição e dedicação.

À UNIEDU/SC, pelo auxílio da bolsa para realização deste trabalho.

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

**No fim tudo dá certo, e se não deu certo é porque
ainda não chegou ao fim.
(Fernando Sabino).**

RESUMO

A Podridão Amarga (PA) é uma doença causada por diferentes espécies de *Colletotrichum* spp. tendo grande importância para macieira por infectar frutos, inviabilizando sua comercialização. Em condições favoráveis para o patógeno, as perdas ocasionadas pela doença podem chegar em até 50%. O controle de *Colletotrichum* spp. na cultura da macieira se dá por pulverizações com fungicidas de ação preventiva, sendo esse o método mais utilizado no controle. Em condições de alta pressão do inóculo no pomar, é necessário aumentar a frequência de pulverizações, contudo esse aumento no número de pulverizações vem apresentando várias desvantagens como a ocorrência de microrganismos resistentes, o desequilíbrio ambiental, o acúmulo de substâncias nocivas no solo, água e alimentos e a presença de resíduos em frutos quando aplicados próximo a colheita. Uma alternativa para superar essas desvantagens seria a introdução de agentes de biocontrole, como bactérias, mais especificamente do gênero *Bacillus* spp. que vem apresentando alta eficiência no controle de doenças de plantas. Dessa forma, estudar o potencial de controle e como atuam as diferentes espécies de *Bacillus* spp. no controle de *Colletotrichum* spp. na cultura da macieira é de grande relevância para o manejo integrado de doenças. Com base no descrito, o objetivo desse estudo foi realizar uma busca na literatura visando compilar os resultados já obtidos para o controle de *Colletotrichum* spp. na cultura da macieira e outras frutíferas. Além disso avaliar o efeito de *B. subtilis* (Serenade®), frações biomassa e sobrenadante de *B. alcalophilus* e *B. amyloliquefaciens* (Duravel®), na germinação de conídios e crescimento micelial de diferentes espécies com diferentes níveis de sensibilidade a fungicidas de *Colletotrichum* spp. e avaliar a produção de metabólitos termoe estáveis e de compostos antifúngicos voláteis produzidos pelas bactérias. Na sequência, avaliar o controle de podridão amarga em frutos de macieira com as diferentes espécies de *Bacillus* spp. contrastados com produtos utilizados no controle químico, Delan® e CabrioTop®. A inibição de estruturas infectivas de *Colletotrichum* spp. *in vitro* variou entre as espécies de *Bacillus* spp. estudadas. Entretanto, *B. amyloliquefaciens* foi promissor apresentando redução de germinação de conídios variando de 12 a 64% para isolado com sensibilidade reduzida a tiofanato-metílico. Para crescimento micelial, todos os isolados de *Bacillus* foram promissores inibindo de 60 a 100% o crescimento. Em relação à produção de compostos termoe estáveis, a espécie *B. subtilis* produziu compostos capazes de inibir 100% o crescimento micelial de *Colletotrichum* spp. Para controle de podridão amarga, *B. subtilis* e *B. amyloliquefaciens* reduziram o risco do aparecimento dos sintomas de PA em inoculação combinada de duas espécies de *Colletotrichum*. Assim, estas espécies foram consideradas promissoras para serem testadas no manejo de PA em campo. Os fungicidas à base dos ativos ditianona e piraclostrobina + metiram foram eficientes, e atrasaram o aparecimento dos sintomas de PA em relação à testemunha. A inoculação foi realizada em frutos por metodologia *ex vivo* com alta concentração de inóculo. Futuros trabalhos devem avaliar eficiência dos produtos biológicos e fungicidas para controle de PA em campo.

Palavras-chave: *Malus domestica*, antagonistas, biocontrole.

ABSTRACT

Bitter rot (BR) is a highly important disease of apple, caused by different species of *Colletotrichum* spp. that infect fruits, interfering with commercial trades. When favorable conditions for the pathogens are in place, yield losses can reach 50%. Spraying fungicides with preventative activity is the most common method to control *Colletotrichum* spp. on apples, but it is necessary to increase the number of sprays under high inoculum pressure. However, such measure can bring several disadvantages such as the appearance of resistant microorganisms, environmental instability, accumulation of harmful substances on soil, water, and food sources, and the presence of chemical residues on fruits when sprayed close to harvest. The introduction of biocontrol agents like bacteria, specifically *Bacillus* spp., would be an alternative to overcome these downsides as they have been achieving high control efficiency on plant diseases. Therefore, studying their disease control potential and how the different species of *Bacillus* spp. control *Colletotrichum* spp. on apples are highly relevant to integrated disease management. Based on this information, the objective of this study was to perform a literature search to collect and assemble the results related to the control of *Colletotrichum* spp. on apples and other fruits, carry out experiments to evaluate the effect of *B. subtilis* (Serenade®) and biomass and supernatant fractions of *B. alcalophilus* and *B. amyloliquefaciens* (Duravel®) on conidia germination and mycelial growth of different species of *Colletotrichum* spp. with different levels of sensibility to fungicides, and evaluate bacterial production of thermostable metabolites and antifungal volatile compounds. Additionally, different species of *Bacillus* spp. were evaluated for bitter rot control on apples and contrasted with the chemical control products Delan® and CabrioTop®. The inhibition of infective structures of *Colletotrichum* spp. *in vitro* varied between species of *Bacillus* spp. However, *B. amyloliquefaciens* was promising and reduced conidia germination, which varied from 12 to 64% for isolates with reduced sensibility to thiophanate-methyl. All *Bacillus* isolates were promising for mycelial growth inhibition, reducing it from 60 to 100%. As regards the production of thermostable compounds, *B. subtilis* produced compounds that were able to inhibit 100% of mycelial growth from *Colletotrichum* spp. With respect to bitter rot control, *B. subtilis* and *B. amyloliquefaciens* reduced the risk of appearance of symptoms of BR on combined inoculation of two species of *Colletotrichum*. Therefore, these species were considered promising for field trials for BR management. Pyraclostrobin + methiram- and ditianone-based fungicides were efficient and delayed the appearance of BR symptoms when compared to the control. The inoculation was performed on fruits through *ex vivo* methodology with highly concentrated inoculum. Future works should evaluate the efficiency of biological products and fungicides to control BR on the field.

Keywords: *Malus domestica*, antagonists, biocontrol.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1 - REVISÃO DE LITERATURA: PODRIDÃO AMARGA NA CULTURA DA MACIEIRA E O USO DE *Bacillus* spp. PARA CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS

- FIGURA 1 – SINTOMAS TÍPICOS DE PODRIDÃO AMARGA (PA) EM FRUTOS DE MACIEIRA DA CULTIVAR GALA. (a) LESÕES INICIAIS DE PA NA SUPERFÍCIE DO FRUTO. (b) SINTOMA E SINAL DE PA. (c) SINTOMA DE MANCHA DE *Colletotrichum* EM FRUTOS IMATUROS. (d) SSINTOMA DE MANCHA DE *Colletotrichum* EM FRUTOS MADUROS..... 26
- FIGURA 2 – COLONIZAÇÃO DE *Colletotrichum* spp. EM FRUTOS..... 29
- FIGURA 3 – CICLO DE RELAÇÃO PATÓGENO-HOSPEDEIRO DE *Colletotrichum* spp. NA CULTURA DA MACIEIRA. 31
- FIGURA 4 – CONTROLE DE *Colletotrichum* spp. NA CULTURA DA MACIEIRA..... 36

Capítulo 2 - *Bacillus subtilis*, *B. alcalophilus* e *B. amyloliquefaciens* ATUAM REDUZINDO ESTRUTURAS INFECTIVAS DE ESPÉCIES DE *Colletotrichum* E POSSUEM POTENCIAL PARA CONTROLE DA PODRIDÃO AMARGA EM MACIEIRA

- FIGURA 1 – EFEITO DE *Bacillus alcalophilus* NO CRESCIMENTO MICELIAL DE *Colletotrichum* spp. A) EFEITO INIBITÓRIO DA FRAÇÃO SOBRENADANTE DE *Bacillus alcalophilus* CULTIVADA POR 24 HORAS, COM A FORMAÇÃO DE HALOS DE INIBIÇÃO; B) HIFAS DE *Colletotrichum* sp. INIBIDAS PELA FRAÇÃO SOBRENADANTE DE *B. alcalophilus* CULTIVADA POR 24 HORAS, VISUALIZADA EM MICROSCÓPIO DE LUZ, MODELO OLYMPIS CH30, EM OBJETIVA DE 10 VEZES; C) TRATAMENTO TESTEMUNHA; D) HIFAS DO TRATAMENTO TESTEMUNHA VISUALIZADA EM MICROSCÓPIO DE LUZ, MODELO OLYMPUS CH30, EM OBJETICA DE 10 VEZES. 63
- FIGURA 2 – DIÂMETRO MÉDIO DA COLÔNIA (cm) DE *Colletotrichum nymphaeae* (MdCn-142) E *C. chrysophilum* (MdCc-110) EM MEIO DE CULTURA EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO PRODUTO BIOLÓGICO A BASE DE *Bacillus amyloliquefaciens*

(DURAVEL®) SENDO, A) PRIMEIRO EXPERIMENTO E B) SEGUNDO EXPERIMENTO.....	64
FIGURA 3 – DIÂMETRO MÉDIO DA COLÔNIA (mm) DE <i>Colletotrichum nymphaeae</i> (MdCn-142) E <i>C. chrysophilum</i> (MdCc-110) EM MEIO DE CULTURA DEM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE <i>Bacillus alcalophilus</i> (Lemid) sendo: A) PRIMEIRO EXPERIMENTO E B) SEGUNDO EXPERIMENTO	65
FIGURA 4 – PLAQUEAMENTO DA SUSPENSÃO DE CONÍDIOS DE <i>Colletotrichum nymphaeae</i> E <i>C. chrysophilum</i> APÓS 12 HORAS EM CONTATO COM OS PRODUTOS BIOLÓGICOS A BASE DE <i>Bacillus</i> spp. E O FUNGICIDA CABRIOTOP® EM MEIO DE CULTURA BDA.....	68
FIGURA 5 – CRESCIMENTO MICELIAL DE <i>Colletotrichum nymphaeae</i> E <i>C. chrysophilum</i> EM MEIO DE CULTURA CONTENDO PRODUTOS À BASE DE <i>Bacillus</i> spp. E OS FUNGICIDAS CABRIOTOP® E DELAN®.....	71
FIGURA 6 – CRESCIMENTO MICELIAL DE DIFERENTES ESPÉCIES DE <i>Colletotrichum</i> spp. EM MEIO DE CULTURA POR METODOLOGIA DE PAPEL DE FILTRO, TRATADOS COM OS PRODUTOS À BASE DE <i>Bacillus</i> spp. COMPARADOS COM O FUNGICIDA DELAN®.	74
FIGURA 7 – DIÂMETRO MÉDIO DA COLÔNIA (mm) DE <i>Colletotrichum nymphaeae</i> (MdCn-142) E <i>C. chrysophilum</i> (MdCc-110) CULTIVADO EM MEIO DE CULTURA CONTENDO METABÓLITOS TERMOESTÁVEIS DE ISOLADOS BACTERIANOS. A) PRIMEIRO EXPERIMENTO; B) SEGUNDO EXPERIMENTO.....	75
FIGURA 8 – CRESCIMENTO MICELIAL DE <i>Colletotrichum nymphaeae</i> (MdCn-142) E <i>C. chrysophilum</i> (MdCc-110) CULTIVADO EM MEIO DE CULTURA CONTENDO METABÓLITOS TERMOESTÁVEIS DE ISOLADOS BACTERIANOS.....	75
FIGURA 9 – SINTOMAS DE PODRIDÃO AMARGA EM FRUTOS DA CULTIVAR GALA 12 DIAS APÓS INOCULAÇÃO, TRATADOS COM PRODUTOS À BASE DE <i>Bacillus</i> spp. E OS FUNGICIDAS COM INGREDIENTE ATIVO DITIANONA (DELAN®) E PIRACLOSTROBINA+METIRAM (CABRIOTOP®) E INOCULADOS COM SUSPENSÃO	

DE CONÍDIOS DE *Colletotrichum chrysophilum* e *C. nymphaeae* EM MISTURA COM DIFERENTES NÍVEIS DE SENSIBILIDADE À FUNGICIDA. 79

FIGURA 10 – PORCENTAGEM DE CONTROLE DOS PRINCIPAIS RESULTADOS OBTIDOS NA CONDUÇÃO DESSE TRABALHO VISANDO O CONTROLE DE DIFERENTES ESPÉCIES DE *Colletotrichum* spp. COM DIFERENTES NÍVEIS DE SENSIBILIDADE A FUNGICIDA, UTILIZANDO PRODUTOS À BASE DE *Bacillus* spp. E OS PRODUTOS QUÍMICOS DELAN® E CABRIOTOP®. 80

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2 – *Bacillus subtilis*, *B. alcalophilus* e *B. amyloliquefaciens* ATUAM REDUZINDO ESTRUTURAS INFECTIVAS DE ESPÉCIES DE *Colletotrichum* E POSSUEM POTECIAL PARA CONTROLE DA PODRIDÃO AMARGA EM MACIEIRA

- TABELA 1 – DESCRIÇÃO DOS ISOLADOS DE *Colletotrichum* spp. DE MACIEIRA DE ACORDO COM O CÓDIGO DE ARMAZINAMENTO, ESPÉCIE, PARTE DA PLANTA, ANO, ESTADO E NÍVEL DE SENSIBILIDADE AOS FUNGICIDAS TIOFANATO-METÍLICO E MANCOZEBE. 50
- TABELA 2 – DIÂMETRO DA COLÔNIA (mm) DE ISOLADOS DE *Colletotrichum nymphaeae* E *C. chrysophilum* SENSÍVEIS E COM SENSIBILIDADE REDUZIDA AO FUNGICIDA MANCOZEBE, QUANDO SUBMETIDOS AOS TRATAMENTOS COM A BACTÉRIA *Bacillus alcalophilus* EM METODOLOGIA DE PAPEL DE FILTRO COM SUSPENSÃO DE CONÍDIOS. 61
- TABELA 3 - DIÂMETRO DA COLÔNIA (mm) DE ISOLADOS DE *Colletotrichum nymphaeae* E *C. chrysophilum* SENSÍVEIS E COM SENSIBILIDADE REDUZIDA AO FUNGICIDA MANCOZEBE, QUANDO SUBMETIDOS AOS TRATAMENTOS COM A BACTÉRIA *Bacillus alcalophilus* EM METODOLOGIA DE PAPEL DE FILTRO COM DISCO DE MICÉLIO. 62
- TABELA 4 - PORCENTAGEM (%) DE GERMINAÇÃO DE CONÍDIOS DE *Colletotrichum* spp. APÓS 12 HORAS EM CONTATO COM OS PRODUTOS BIOLÓGICOS A BASE DE *Bacillus* spp. E O FUNGICIDA CABRIOTOP® 66
- TABELA 5 – DIÂMETRO DA COLÔNIA (mm) DE *Colletotrichum nymphaeae* E *C. chrysophilum* COM DIFERENTES NÍVEIS DE SENSIBILIDADE A FUNGICIDA, QUANDO COLOCADOS EM CONTATO COM OS PRODUTOS POR 12 HORAS E IMEDIATAMENTE PLAQUEADOS EM MEIO DE CULTURA. 67
- TABELA 6 – DIÂMETRO MÉDIO DA COLÔNIA (mm) DE *Colletotrichum nymphaeae* E *C. chrysophilum* CULTIVADOS EM MEIO DE CULTURA FUNDENTE COM OS PRODUTOS À BASE DE *Bacillus* spp. E OS FUNGICIDAS CABRIOTOP® E DELAN®. 70

TABELA 7 – DIÂMETRO DA COLÔNIA DE DIFERENTES ESPÉCIES DE *Colletotrichum* spp. CULTIVADOS EM MEIO DE CULTURA PELO MÉTODO DE IMERSÃO EM PAPEL FILTRO NOS TRATAMENTOS À BASE DE *Bacillus* spp. E O FUNGICIDA DELAN®. 73

TABELA 8 – PERÍODO DE INCUBAÇÃO (PI) E PERÍODO LATENTE (PL) DE PODRIDÃO AMARGA CAUSADA POR *Colletotrichum* spp. COM DIFERENTES NÍVEIS DE SENSIBILIDADE A FUNGICIDA, TRATADOS COM *Bacillus* spp. E FUNGICIDA. 77

TABELA 9 – ESTIMATIVA DE RISCO RELATIVO PARA A EXPRESSÃO DE SINTOMAS DE PODRIDÃO AMARGA, CAUSADA POR *Colletotrichum* spp., ESTIMADAS PELO MODELO SEMI-PARAMÉTRICO DE COX, SEGUIDAS DOS INTERVALOS DE CONFIANÇA DE 95%. 78

ABREVIATURAS OU SIGLAS

PA – Podridão Amarga

MFG – Mancha Foliar de Glomerella

MCF – Mancha de *Colletotrichum* em Frutos

B. alcalophilus – *Bacillus alcalophilus*

B. subtilis – *Bacillus subtilis*

B. amyloliquefaciens – *Bacillus amyloliquefaciens*

LEMID – Laboratório de Epidemiologia para Manejo de Doenças em Plantas

MdCn-142, MdCn-181, MdCn-CA32m e MdCn-Col179 – *Colletotrichum nymphaeae*

MdCc-110, MdCc-55PR, MdCc-Col33 e MdCc-134 - *C. chrysophilum*

MdCm-21 - *C. melonis*

MdCI-180 - *C. limetticola*

MdCs-3R4E - *C. siamense*

mm – Milímetro

ml – Mililitro

µL – Microlitro

rpm – Rotação por minuto

UFC – Unidade Formadora de Colônia

cm - Centímetro

g/L – Gramas/litro

ml/L – Mililitro/litro

spp. – Abreviatura de espécies

sp. – Abreviatura de espécie

BDA – Batata Dextrose e Ágar

Ø - Diâmetro

GLM – Modelo Linear Generalizado

BOD - Demanda Bioquímica de Oxigênio (Biochemical oxygen demand)

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	20
Capítulo 1 REVISÃO DE LITERATURA: PODRIDÃO AMARGA NA CULTURA DA MACIEIRA E O USO DE <i>Bacillus</i> spp. PARA CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS	23
1. A CULTURA DA MACIEIRA.....	23
2. PODRIDÃO AMARGA E MANCHA DE <i>Colletotrichum</i> EM FRUTOS DE MACIEIRA	24
2.1 Etiologia e Sintomatologia.....	24
2.2 Ciclo de relação patógeno-hospedeiro	27
3. CONTROLE DE <i>Colletotrichum</i> spp. NA CULTURA DA MACIEIRA.....	32
4. CONTROLE BIOLÓGICO	37
5. FORMULAÇÃO DE PRODUTOS À BASE DE <i>Bacillus</i> spp.	43
 Capítulo 2 – <i>Bacillus subtilis</i>, <i>B. alcalophilus</i> e <i>B. amyloliquefaciens</i> ATUAM REDUZINDO ESTRUTURAS INFECTIVAS DE ESPÉCIES DE <i>Colletotrichum</i> E POSSUEM POTENCIAL PARA CONTROLE DA PODRIDÃO AMARGA EM MACIEIRA.....	44
1. INTRODUÇÃO.....	46
2. METODOLOGIA	48
2.1 Cultivo da bactéria <i>Bacillus alcalophilus</i> (Lemid).....	48
2.2 Descrição dos isolados	49
2.3 Experimentos <i>in vitro</i>	50
2.3.1 Efeito das frações biomassa e sobrenadante de <i>Bacillus alcalophilus</i> cultivado em diferentes tempos na germinação de conídios de <i>Colletotrichum</i> spp.....	50
2.3.2 Efeito das frações biomassa e sobrenadante de <i>Bacillus alcalophilus</i> cultivado em diferentes tempos no crescimento micelial de <i>Colletotrichum</i> spp.	51

2.3.3 Influência de diferentes concentrações de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> no crescimento micelial de <i>Colletotrichum</i> spp.....	52
2.3.4 Influência de diferentes concentrações de <i>Bacillus alcalophilus</i> no crescimento micelial de <i>Colletotrichum</i> spp.....	53
2.3.5 Eficiência de <i>Bacillus</i> spp. na germinação de conídios de <i>Colletotrichum</i> spp. .	53
2.3.6 Viabilidade dos conídios de <i>Colletotrichum</i> spp. em meio de cultura após experimento de germinação de conídios	54
2.3.7 Eficiência de <i>Bacillus</i> spp. no crescimento micelial de <i>Colletotrichum</i> spp. em meio de cultura fundente	55
2.3.8 Eficiência de <i>Bacillus</i> spp. no crescimento micelial de diferentes espécies de <i>Colletotrichum</i> spp.	56
2.3.9 Ação de metabólitos termoeestáveis no crescimento micelial de <i>Colletotrichum</i> spp.	57
2.4 EXPERIMENTO <i>ex vivo</i>	57
2.4.1 Eficiência de produtos à base de <i>Bacillus</i> spp. no controle de podridão amarga em frutos de macieira destacados (<i>ex vivo</i>), por metodologia de suspensão de conídios.....	58
3. RESULTADOS	59
3.1 Experimentos <i>in vitro</i>	59
3.1.1 Efeito das frações biomassa e sobrenadante de <i>Bacillus alcalophilus</i> cultivado em diferentes tempos na germinação de conídios de <i>Colletotrichum</i> spp.....	59
3.1.2 Efeito das frações biomassa e sobrenadante de <i>Bacillus alcalophilus</i> cultivado em diferentes tempos no crescimento micelial de <i>Colletotrichum</i> spp.	59
3.1.3 Influência de diferentes concentrações de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> no crescimento micelial de <i>Colletotrichum</i> spp.....	63
3.1.4 Influência de diferentes concentrações de <i>Bacillus alcalophilus</i> no crescimento micelial e <i>Colletotrichum</i> spp.....	64
3.1.5 Eficiência de <i>Bacillus</i> spp. na germinação de conídios de <i>Colletotrichum</i> spp. .	65

3.1.6 Viabilidade dos conídios de <i>Colletotrichum</i> spp. em meio de cultura após experimento de germinação de conídios	67
3.1.7 Eficiência de <i>Bacillus</i> spp. no crescimento micelial de <i>Colletotrichum</i> spp. em meio de cultura fundente	69
3.1.8 Eficiência de <i>Bacillus</i> spp. no crescimento micelial de diferentes espécies de <i>Colletotrichum</i> spp.	72
3.1.9 Ação de metabólitos termoeestáveis no crescimento micelial de <i>Colletotrichum</i> spp.	74
3.2 EXPERIMENTO <i>ex vivo</i>	76
3.2.1 Eficiência de produtos à base de <i>Bacillus</i> spp. no controle da podridão amarga em frutos de macieira destacados (<i>ex vivo</i>) por metodologia de suspensão de conídios	76
4. DISCUSSÃO	81
5. CONCLUSÕES	86
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	86
7. REFERÊNCIAS	88

INTRODUÇÃO GERAL

A macieira (*Malus domestica* Borkh) é uma importante cultura para a economia brasileira, e atualmente é considerada uma atividade consolidada no Brasil. A região sul do país é responsável por 99,3% da produção nacional, sendo que os estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul são os maiores produtores, com média de produção de 454.823 e 490.066 toneladas, respectivamente. O Paraná é o terceiro estado em termos de produção, com média de 29.453 toneladas na safra de 2020 (IBGE, 2022). Dentre as cultivares plantadas “Gala” e “Fuji” correspondem à 62% e 33% da produção, respectivamente (ABPM, 2019).

Uma das maiores limitações do cultivo dessa cultura, desde o início da sua implantação no país, é a ocorrência de problemas fitossanitários. Em frutos, diversos patógenos pode causar danos e inviabilizá-los para a comercialização e consumo, dentre eles podemos citar a podridão amarga (PA) e a mancha de *Colletotrichum* em frutos (MCF) (VALDEBENITO-SANHUEZA et al., 2018).

A podridão amarga (PA) é uma doença comum em frutos de macieira e foi identificada nos Estados Unidos em 1867 (SUTTON, 1990). É causada por diferentes espécies de *Colletotrichum* spp. e é considerada uma das mais importantes, podendo causar perdas na cultura em até 50% em regiões temperadas com alta pluviosidade (SHI et al., 1996). Em várias regiões do mundo há relatos de *Colletotrichum* spp. causando PA em frutos de macieira, sendo que todas as cultivares são suscetíveis à doença, porém as que pertencem ao grupo de colheita tardia são particularmente mais suscetíveis à doença (DENARDI; BERTON; SPENGLER, 2003). A MCF é caracterizada por pequenas lesões marrons (1 a 3 mm) com uma leve depressão e podem ser observadas em frutos, essas lesões geralmente não evoluem para PA, e dependendo do número de lesões na superfície dos frutos pode comprometer a comercialização (KATSURAYAMA e BONETI, 2009)

Para o controle de *Colletotrichum* spp. as práticas de manejo devem ser iniciadas no inverno, com a decomposição das folhas caídas no solo, com a utilização de ureia (STADNIK, 2009). Além disso, realizar a poda e retirar os restos podados e frutos mumificados da área (VALDEBENITO-SANHUEZA et al., 2002) e aplicar produtos à base de cúpricos e calda sulfocálcica para proteger as plantas também são medidas que devem ser adotadas no pomar para evitar o progresso da epidemia (VALDEBENITO-SANHUEZA e BETTI, 2005). Estas ações irão reduzir o inóculo que sobrevive em gemas e ramos (GELAIN; HAMADA; DE MIO, 2022; CRUSIUS et al. 2002) e garantir menor fonte de inóculo primário para o início do ciclo, o que é muito importante para

controle de doenças causadas por *Colletotrichum*, em especial, em clima subtropical como ocorre no Brasil (CARRARO et al. 2022 e DOLISNKI et al. 2021). Na primavera as práticas de manejo devem ser realizadas visando aumentar a ventilação e diminuir o acúmulo de umidade dentro da planta, reduzindo a duração do período de molhamento foliar e melhorando a cobertura dos produtos químicos, para isso o recomendado é realizar a poda com objetivo de atender todos esses objetivos VALDEBENITO-SANHUEZA et al., 2002).

Após a brotação, o controle de *Colletotrichum* spp. em macieira é realizado com a aplicação de produtos químicos de forma preventiva (KATSURAYAMA e BONETTI et al. 2009). É indispensável o monitoramento das condições climáticas, para que as aplicações sejam realizadas com um a dois dias antes de períodos chuvosos (ARAUJO e STADNIK, 2017), e reaplicado com intervalos de 7 a 10 dias ou sempre que houver acúmulo de chuva superior a 25mm, desde a brotação até a colheita (KATSURAYAMA e BONETTI, 2009). No estado do Paraná, as pulverizações são realizadas desde a brotação até o período de pós-colheita, próximo ao outono, devido ao clima favorável para o patógeno (HAMADA et al., 2012). Em média são realizadas na safra 20 aplicações com fungicidas protetores e 8 aplicações com fungicidas sistêmicas (HAMADA; MAY DE MIO, 2017).

A utilização de produtos biológicos para o controle de *Colletotrichum* spp. pode ser uma alternativa eficaz de controle, principalmente em momentos em que os fungicidas podem ter falhas na eficiência pela seleção de populações resistentes (TALAMINI e STADNIK, 2004), ou no período que antecede a colheita, principalmente para maçãs da cultivar “Gala”. Condições climáticas favoráveis para o desenvolvimento do patógeno, como temperaturas elevadas e maior precipitação, associadas ao alto inóculo na área, requerem aplicações intensivas de fungicidas, aumentando resíduos nos frutos (KATSURAYAMA e BONETTI, 2009). O uso de produtos no controle alternativo nesse período pode ser uma alternativa para controle de doenças causadas por *Colletotrichum* spp. na cultura da macieira, porém ainda não é muito difundido. Produtos biológicos, indutores de resistência e bioestimulantes estão sendo cada vez mais utilizados em diversas culturas para complementar o controle fornecido pelos clássicos fungicidas sintéticos (LIMA et al., 2018).

O uso de produtos biológicos à base de *Bacillus* spp. tem se mostrado promissor para o controle de doenças em diferentes patossistemas. Moreira et al. (2014) verificaram que *Bacillus* spp. *in vitro* inibem o crescimento micelial e germinação de conídios de *Colletotrichum* spp., e em mudas de macieira atuam no controle de mancha foliar de *Glomerella*. *B. alcolophilus* reduziu a incidência

de mancha foliar de *Glomerella* na cultura da macieira quando associada ao controle com fungicida em aplicação pelo método eletrostático (CASTELLAR, 2019). *B. velezensis* cepa AK-0 *in vitro* mostrou atividade antagônica contra *C. gloeosporioides* isolado da macieira, e em frutos mostrou-se eficiente com potencial de atividade de biocontrole contra a podridão amarga causada por *C. gloeosporioides* (KIM et al., 2021). *B. amyloliquefaciens* reduziu a germinação de conídios e o desenvolvimento do tubo germinativo de espécies de fungos pós-colheita, como *Alternaria citri*, *Botryosphaeria* sp., *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusicoccum aromaticum*, *Lasioidiplodia theobromae*, *Penicillium crustosum* e *Phomopsis persea* (ARREBOLA; JACOBS; KORSTEN, 2010). Rollemberg (2008) isolou microrganismos do filoplano de plantas na cultura da macieira, esses foram capazes de produzir compostos com efeito inibitório ao crescimento do micélio e a germinação de conídios de *Colletotrichum* spp.

Dessa forma, estudar o potencial de controle e como atuam as diferentes espécies de *Bacillus* spp. para o controle biológico de *Colletotrichum* spp. na cultura da macieira é de grande relevância para o manejo integrado de doenças. Com base no descrito, no presente trabalho foi realizada uma busca na literatura visando compilar os resultados já obtidos para o controle de *Colletotrichum* spp. na cultura da macieira e de forma experimental avaliar o efeito de diferentes espécies de *Bacillus* spp. (*B. subtilis*, *B. alcalophilus* e *B. amyloliquefaciens*) na germinação de conídios e crescimento micelial de *Colletotrichum* spp. e no controle de podridão amarga em frutos de macieira.

Capítulo 1 - REVISÃO DE LITERATURA: PODRIDÃO AMARGA NA CULTURA DA MACIEIRA E O USO DE *Bacillus* spp. PARA CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS

1. A CULTURA DA MACIEIRA

A macieira (*Malus domestica* Borkh) é uma frutífera de clima temperado, que tem seu centro de origem nas montanhas do Cáucaso, no Oriente Médio e no Leste Asiático. Em regiões de clima temperado, a maçã é cultivada há muitos milênios e histórias na qual envolvem seus frutos são relatadas em lendas e mitos (RICCE; PANDOLFO; PASA, 2018). No Brasil o primeiro relato do cultivo da macieira foi em 1926 no estado de São Paulo, porém o plantio em escala comercial no país teve início na década de 1970. Dessa época em diante, vários trabalhos voltados para a área de melhoramento genético e manejo da cultura foram realizados, a fim de introduzir novas tecnologias no campo para auxiliar o produtor (PETRI et al., 2011).

Apesar do pouco tempo de cultivo dessa cultura no país, é possível observar certa evolução quanto a sua produtividade e área plantada. No Brasil, em 1972, a área plantada correspondia a 931 hectares com produtividade aproximada de 9 toneladas/ha (KREUZ e SILBEREISEN, 1986). Em 2020, a área plantada no país era representada por 15.441 hectares com produtividade aproximada de 29 toneladas/ha (IBGE, 2022). Essa evolução gradativa no desenvolvimento da cultura se dá devido aos centros de pesquisas e extensão, que vão em busca de resultados que comprovem melhor adaptação da cultura, nutrição da planta, tecnologia pós-colheita e tecnologias voltadas para cultivares e clones capazes de atender as exigências dos consumidores (FACHINELLO et al., 2011).

O maior produtor mundial de maçã é a China, com produção média de 40.500.000 toneladas da fruta na safra de 2020, já o Brasil ocupa o 15º lugar nesse ranking, produzindo em média 983.247 toneladas nesse mesmo ano (FAO, 2022). A produção brasileira concentra-se em maior parte na região sul do país, sendo responsável por 99,3% da produção brasileira. Os estados, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, são os maiores produtores, com média de produção de 454.823 tonelada e 490.066 toneladas, respectivamente. Além desses dois estados, o Paraná com média de produção de 29.453 toneladas, São Paulo com 5.019 toneladas e Minas Gerais com 4.186 toneladas também compõe o cenário de produção da fruta no país, sendo que esses valores correspondem a produção da safra de 2020 (IBGE, 2022). Dentre as cultivares plantadas, “Gala” e “Fuji” são responsáveis por

62% e 33% da produção respectivamente, já os outros 5,0% correspondem a outras cultivares (ABPM, 2019).

Assim como em outras culturas, problemas fitossanitários são responsáveis por perdas significativas na cultura da macieira. Doenças de importância para a cultura da macieira, relatadas são: Sarna da Macieira (*Venturia inaequalis*), Mancha Foliar de Glomerella (MFG) e Podridão Amarga (*Colletotrichum* spp.), Mancha Olho de Boi (*Neofabraea* spp.), Podridão Carpelar (*Alternaria* spp., *Fusarium* spp., *Botrytis cinerea*, *Botryosphaeria dothidea*, *Cryptosporiopsis malicorticis*), Mofo Azul (*Penicillium expansum*), Podridão Marrom (*Alternaria alternata* e *Alternaria* sp.), Mofo Cinzento (*Botrytis cinerea*) e Podridão por Rhizopus (*Rhizopus nigricans*) (VALDEBENITO-SANHUEZA et al., 2018). As doenças de pós-colheita podem ser divididas em duas categorias. Na primeira categoria, estão inseridas as podridões oriundas de infecções latentes, onde os frutos são infectados pelo fungo durante o crescimento da fruta nos pomares, podridão olho de boi e a podridão amarga são exemplos de frutos pertencentes a essa categoria. Já na segunda categoria, estão as podridões originadas de infecções via ferimentos, que ocorrem no processo de colheita e pós-colheita das frutas, como bolor e mofo cinzento (OGOSHI et al., 2019). Conhecer o processo de infecção dos fungos em frutos, é de importância para realizar práticas de manejo adequadas.

Dentre as podridões mencionadas, a podridão amarga (PA) é considerada uma doença importante, podendo causar perdas de até 50% em regiões temperadas com alta pluviosidade (SHI et al., 1996). *Colletotrichum* spp. é o agente causal da PA e diferentes espécies já foram relatadas causando sintomas típicos em frutos.

Além da PA, o gênero *Colletotrichum* spp. é responsável também por causar a mancha foliar de Glomerella (MFG) e a mancha de *Colletotrichum* em frutos (MCF) sendo a primeira, a principal doença foliar para a cultura, pois interfere na fotossíntese e causa desfolha precoce em plantas de macieira.

2. PODRIDÃO AMARGA E MANCHA DE *Colletotrichum* EM FRUTOS DE MACIEIRA

2.1 Etiologia e Sintomatologia

A podridão amarga (PA) é uma doença comum em frutos de macieira e foi identificada pela primeira vez na Inglaterra em 1856 (TAYLOR, 1971) e nos Estados Unidos em 1867 (SUTTON, 1992). No Brasil, a PA começou a ter importância da década de 1970, junto com o aumento na produção de macieira no país (DENARDI; BERTON; SPENGLER, 2003). Inicialmente, duas espécies foram relatadas e associadas à Podridão Amarga em frutos de maçã, *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. e *C. acutatum* J. H. Simmonds (SHI et al., 1996). Com o passar do tempo, outras espécies foram identificadas, inseridas no complexo de espécies *C. gloeosporioides*, sendo: *C. fructicola* (PARK et al., 2018; VELHO et al., 2015), *C. chrysophilum* (KHODADADI et al., 2020), *C. siamense* (PARK et al., 2018), *C. theobromicola* (VELHO et al., 2015), *C. fragariae* (ALANIZ et al., 2012) e *C. noveboracense* (KHODADADI et al., 2020), complexo de espécies *C. acutatum*, sendo: *C. nymphaeae* (VELHO et al., 2015), *C. fioriniae* (KHODADADI et al., 2020; NODET et al., 2016; MUNDA, 2014; SHIVAS; TAN, 2009), *C. melonis* (VELHO et al., 2015), *C. godetiae* (MUNDA, 2014), *C. acutatum* (ALANIZ et al., 2012; MARI et al., 2012) e *C. clavatum* (KOU et al. 2014) e; complexo de espécies *C. boninense*, sendo: *C. salicis* (AMARAL CARNEIRO; STORTI; BARIC, 2021) e *C. karstii* (VELHO et al., 2015).

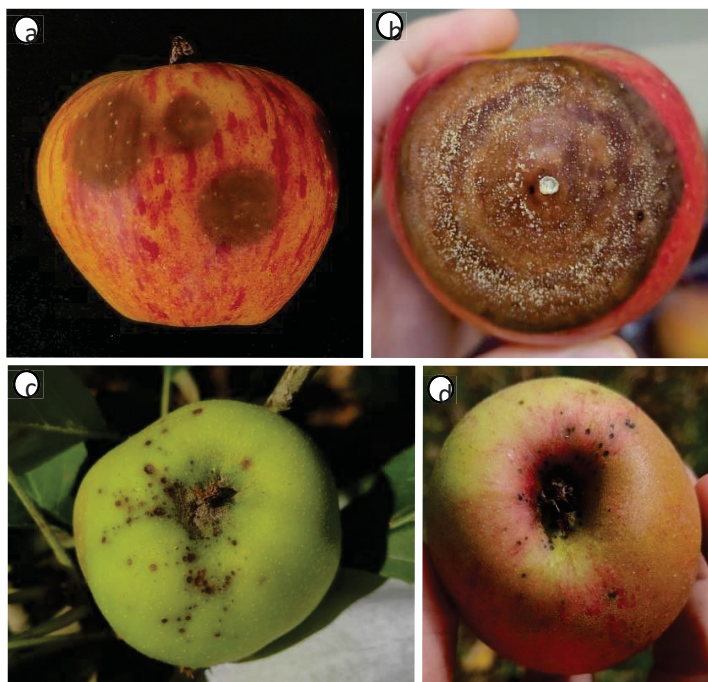
Recentemente, isolados já identificados inicialmente como *C. fructicola*, isolados da cultura da macieira e responsáveis por causar doenças na cultura, estão sendo reclassificados filogeneticamente, por meio de análises multilocus baseada em APN2, ApMAT, CAL e GS, como *C. chrysophilum* (ASTOLF et al., 2022). *C. chrysophilum* já foi relatado por outros autores causando sintomas de PA em frutos de macieira nos Estados Unidos (KHODADADI et al., 2020), China (CHEN et al., 2022), Espanha (CABREFIGA et al, 2021), Brasil e Uruguai (ASTOLFI et al., 2022).

Todas as cultivares de macieira são suscetíveis a podridão amarga, porém as cultivares que pertencem ao grupo de colheita tardia são particularmente mais suscetíveis à doença (DENARDI; BERTON; SPENGLER, 2003). Os principais sintomas de PA podem ser observados na Figura 1. Lesões circulares de coloração castanho-claro com aspecto deprimido na epiderme do fruto são formadas. Na polpa, a lesão desenvolve-se em forma cônica tornando-se aprofundada em formato de “V”. Em um mesmo fruto, é possível observar várias lesões (Figura 1a) que ao alcançarem tamanho de 1,5 a 2,0 cm apresentam acérvulos em anéis concêntricos (Figura 1b) (MONDINO et al., 2009). A doença ocorre em condições de período chuvoso e com alta umidade relativa, em uma

ampla faixa de temperatura, porém a faixa de temperatura ótima para o desenvolvimento da doença é de 22°C a 26°C (CRUSIUS et al., 2002).

Além da PA em frutos, *Colletotrichum* spp. pode causar a mancha de *Colletotrichum* em frutos (MCF). Os sintomas de MCF são caracterizados por pequenas lesões marrons (1 a 3 mm) com uma leve depressão e podem ser observadas em frutos imaturos (Figura 1c) e maduros (Figura 1d), nas lesões não são observadas esporulações típicas de *Colletotrichum* spp. As lesões de MCF não evoluem para PA, como apresentado no trabalho realizado por Katsurayama, Boneti e Petri (2004), em que frutos com sintomas de MCF mantidos durante um mês a 24°C ou armazenados durante seis meses em câmara úmida a 5°C não evoluíram para sintomas de PA, embora alguns isolados tenham sido relatados como causadores de podridão, principalmente em frutos inoculados com ferimentos (VELHO et al., 2015). Investigar as razões pelas quais os isolados de MCF geralmente não são capazes de causar podridão em frutos é importante para pesquisas futuras.

FIGURA 1 – SINTOMAS TÍPICOS DE PODRIDÃO AMARGA (PA) EM FRUTOS DE MACIEIRA DA CULTIVAR GALA. (a) LESÕES INICIAIS DE PA NA SUPERFÍCIE DO FRUTO. (b) SINTOMA E SINAL DE PA. (c) SINTOMA DE MANCHA DE *Colletotrichum* EM FRUTOS IMATUROS E (d) MADUROS.



Fonte: O autor (2022).

2.2 Ciclo de relação patógeno-hospedeiro

As etapas do ciclo de relação patógeno – hospedeiro pode ser observado na Figura 1. A primeira fase do ciclo de relação patógeno-hospedeiro caracteriza-se pela sobrevivência do patógeno em um determinado local, sendo essa a fonte em que o inóculo será produzido antes de ocorrer a infecção (AMORIM e PASCHOLATI, 2018). Conhecer como *Colletotrichum* spp. sobrevive é de grande importância, pois a partir dessas informações, algumas práticas de manejo podem ser realizadas, visando eliminar as fontes de inóculo. No geral, algumas espécies são capazes de produzir micro-escleródios, que permanecem dormentes no solo durante o inverno ou quando em condições de estresse (PHOULIVONG, 2011). Contudo, na cultura na macieira essa forma de sobrevivência ainda não foi observada.

A sobrevivência de *Colletotrichum* spp., sob condições brasileiras, mais especificamente no estado do Rio Grande do Sul, é relatada que esporos de *Colletotrichum* spp. podem sobreviver assintomaticamente em gemas e ramos dormentes, mas não em folhas caídas no solo (CRUSIUS et al., 2002). Por outro lado, no Paraná, *Colletotrichum* spp. sobrevive durante o inverno em gemas e ramos dormentes, mas também em folhas caídas no solo, de uma safra para outra. Isolados obtidos de gemas, ramos e folhas caídas no solo foram patogênicos para folhas e frutos de macieira causando sintomas típicos de mancha foliar de *Glomerella* e podridão amarga. Isolados de ramos dormentes e de folhas caídas foram identificados como pertencentes a *Colletotrichum* do complexo de espécies *C. acutatum* e os isolados de gemas dormentes foram identificados como pertencentes ao complexo de espécies *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*. *Colletotrichum* spp. não foi recuperado do solo ou de folhas assintomáticas (HAMADA; MAY DE MIO, 2017). A importância da infecção de flores como fonte de inóculo foi observada por Hamada et al., (2020), neste trabalho os autores comprovaram que isolados do complexo de espécies *C. acutatum* obtidos de flores de macieira podem causar sintomas de mancha de *Colletotrichum* em frutos e também podem causar sintomas de podridão amarga.

No processo de disseminação de *Colletotrichum* spp., na fase de liberação dos conídios os respingos de chuva são imprescindíveis para o patógeno, devido a formação de uma massa com aspecto mucilaginoso, na qual tem a função de abrigar os conídios do patógeno nos acérvulos (MOUEN BEDIMO et al., 2010). Essa massa mucilaginosa é constituída por açúcares e proteínas

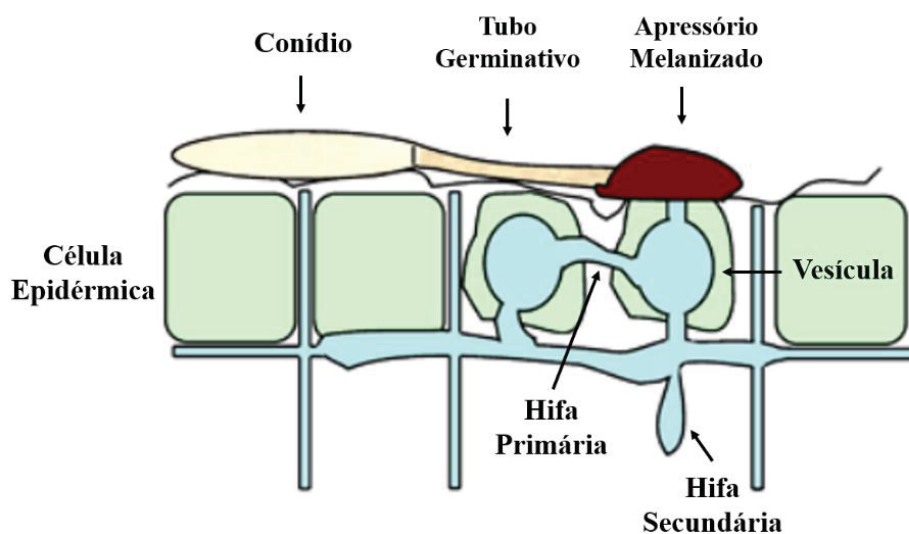
que além de abrigar os conídios, os protegem da dessecação. Essa mucilagem, quando em contato com a água, é dissolvida, deixando livre a suspensão dos propágulos do patógeno na superfície do hospedeiro (AMORIM e PASCHOLATI, 2018). Poucos são os estudos realizados que caracterizam a disseminação de *Colletotrichum* spp. na cultura da macieira. Em alguns patossistemas, *Colletotrichum* spp. pode ser disseminado pela ação de outros agentes, como insetos e por correntes de ar (SILVA-JUNIOR et al., 2014).

Em macieira, no estado do Paraná, esporos de *Colletotrichum* spp. foram coletados em armadilhas caça-esporos, dispostas a 30cm de altura do solo, associando o maior inóculo inicial da doença no terço inferior da copa das árvores em relação ao médio e superior (HAMADA et al., 2019), corroborando ao que já foi relato por Hamada e May De Mio (2017), sobre a ocorrência de inóculo de *Colletotrichum* spp. em folhas caídas. Relacionado ao fato de que as primeiras infecções de mancha foliar de *Glomerella* geralmente ocorrem nas partes inferiores e internas das plantas (VALDEBENITO-SANHUEZA et al. 2002). Além disso, após o ajuste dos modelos, o parâmetro relacionado ao inóculo inicial foi maior no extrato inferior das plantas (HAMADA et al., 2019). Portanto, infecções primárias geram rapidamente sintomas nas folhas inferiores do dossel, e os sintomas de mancha foliar de *Glomerella* aumentam exponencialmente produzindo inóculo secundário sob condições favoráveis. O inóculo secundário reflete uma alta taxa de crescimento da doença principalmente na parte superior da planta, onde as condições climáticas são mais favoráveis e onde as pulverizações de fungicidas podem ser menos eficientes devido à cobertura incompleta (HAMADA et al., 2019).

Após a liberação e dispersão, os conídios são depositados na superfície sadia e suscetível do hospedeiro, iniciando o processo de infecção (Figura 2). Em frutos inoculados de macieira da cultivar Golden Delicious e Granny Smith em temperatura de 21°C, a germinação dos conídios e emissão do tubo germinativo ocorre em duas horas após a inoculação. Apressórios de parede espessa e de coloração escura se formam na extremidade do tubo germinativo, e se fixam na superfície do fruto por meio de *peg* de penetração, entre 6 a 18 horas. Em até 48 horas, hifas de penetração crescem através dos poros basais e penetram diretamente abaixo da cutícula da célula epidérmica e crescem através da cutícula até o lúmen (BROOK, 1977). Com o crescimento da hifa dentro do lúmen celular, sem penetração no protoplasma, ocorre a formação da vesícula de infecção. Após a colonização de uma ou duas células, a hifa primária intracelular é formada a partir da vesícula, originando uma hifa secundária e iniciando a fase necrotrófica (O'CONNEL et al., 2000). No sétimo dia após a

inoculação, as lesões na superfície do fruto são observadas, com tamanho médio de 1mm de diâmetro. Até o 11º dia após a inoculação, é possível observar a presença de acérvulos com conídios se desenvolvendo na superfície das lesões (BROOK, 1977).

FIGURA 2 – COLONIZAÇÃO DE *Colletotrichum* spp. EM FRUTOS.



Fonte: Miles e Schilder (2013).

Vários fatores podem afetar a interação patógeno-hospedeiro, como temperatura, características relacionadas ao hospedeiro e ao ambiente em que o hospedeiro é cultivado. As diferenças de temperatura têm implicações significativas para o manejo de doenças com base no controle químico, resistência genética de cultivares, e os cuidados no período de colheita (PHOULIVONG, 2012).

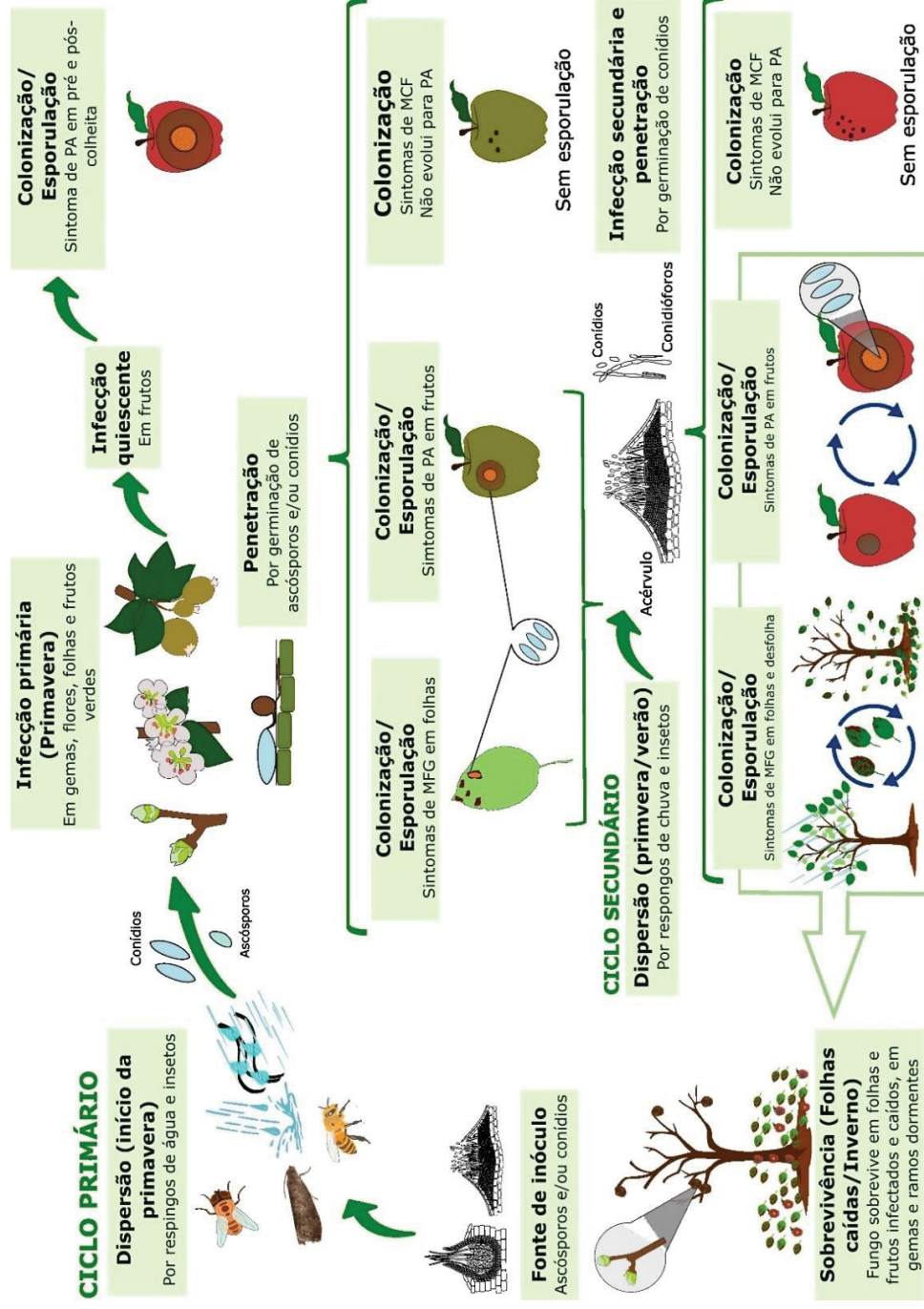
Em frutos, *C. siamense* pode causar sintomas independentemente da cultivar ou tipo de inoculação (suspensão de esporos ou tampões miceliais), *C. nymphaeae* e *C. melonis* causam sintomas em frutos com e sem ferimentos, mas para *C. paranaense* e *C. fructicola* sintomas foram observados apenas em frutos com ferimentos. Frutos da cultivar “Gala” inoculados com as espécies *C. melonis*, *C. fructicola*, *C. nymphaeae*, *C. karstii* e *C. theobromicola* foram patogênicos em frutos com ferimentos, produzindo sintomas típicos de PA (VELHO et al., 2015). Ferimentos nas superfícies dos frutos aumentam o sucesso de *Colletotrichum* spp. em realizar a infecção e causar

sintomas da doença (DENARDI; BERTON; SPENGLER, 2003; PHOULIVONG, 2012). No entanto, fungos produzem uma variedade de enzimas que degradam a cutícula e a parede celular e podem infectar plantas sem a necessidade de ferimentos (LIAO et al., 2012). Isolados que são incapazes de infectar frutos sem ferimentos, geralmente não produzem essas enzimas que degradam a cutícula e a parede celular.

Os sintomas de PA aparecem após três a quatro dias em frutos com ferimentos e após 5-6 dias em frutos sem ferimentos (VELHO et al., 2015). Resultados semelhantes foram encontrados por Moreira et al. (2021), que relataram o período de incubação de PA em cultivares ‘Gala’ e ‘Eva’ de dois a seis dias em frutos inoculados com ferimentos. No entanto, em frutos sem ferimentos, o período de incubação foi bem maior, sendo de 15 a 25 dias em frutos de ‘Gala’ e de 5 a 17 dias em frutos de ‘Eva’.

Para o controle de PA, é importante conhecer a epidemiologia da doença, diferenciar o ciclo primário e o ciclo secundário a fim de estabelecer critérios para o manejo integrado da doença (HAMADA, 2013). Diferentes práticas de manejo podem ser utilizadas para o controle; dentre elas, o manejo de restos culturais de uma safra para a outra, evitando a disseminação do inoculo primário (HAMADA; MAY DE MIO, 2017), o controle químico com a pulverização de fungicidas preventivos e, o uso de produtos biológicos em momentos em que o químico não é indicado (CASTELLAR, 2019).

FIGURA 3 – CICLO DE RELAÇÃO PATÓGENO-HOSPEDEIRO DE *Colletotrichum* spp. NA CULTURA DA MACIEIRA.



Fonte: CARRARO et al. (2022), adaptado.
PA – Podridão amarga; MFG – Mancha foliar de Glomerella; MCF – Mancha de *Colletotrichum* em frutos.

3. CONTROLE DE *Colletotrichum* spp. NA CULTURA DA MACIEIRA

A cultura da macieira no Brasil foi a pioneira na implantação das Normas Técnicas para a Produção Integrada de Frutas no país, criada em 1997. A produção integrada de macieira (PIM) baseia-se em uma produção que garante alimentos de qualidade para o consumidor, com a utilização de práticas de manejo que substituem ou reduzem o uso de insumos poluentes, garantindo a sustentabilidade da produção agrícola. Essas práticas de manejos podem estar associadas à resistência de plantas para determinadas doenças que afetam a cultura, à adoção do manejo cultural no pomar, o uso do controle biológico, a utilização de ferramentas que potencializam a ação de inimigos naturais e em últimos casos, a aplicação de agrotóxicos de forma racional, seguindo às normas propostas pelo programa (VALDEBENITO-SANHUEZA e HOFFMANN, 2009). O manejo de doenças dentro da produção integrada de macieira se caracteriza pela redução do uso de agrotóxicos, utilizando outras ferramentas não associadas ao controle químico, que vão atuar de forma eficiente no controle do patógeno. Para *Colletotrichum* spp., o controle eficaz nas regiões produtoras de macieira no Brasil, tem se tornado cada vez mais difícil.

As principais causas para essa dificuldade no controle da doença estão relacionadas ao rápido desenvolvimento de sintomas. Temperaturas acima de 20°C e molhamento foliar de 10 horas, os sintomas se expressam com um período de incubação de 48 horas para *C. fructicola* (MOREIRA et al., 2021; VELHO et al., 2015) e 72 horas para *C. nymphaeae* em folhas. Para frutos, o período de incubação pode ser de até 96 horas (MOREIRA et al., 2021). Outra dificuldade está relacionada à variação nas espécies identificadas nos pomares do Brasil, dificultando o manejo das doenças. Foram observadas 5 diferentes espécies no levantamento realizado em 2019 nos pomares produtores de macieira nos estados de Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Paraná e São Paulo, as espécies observadas foram: *C. melonis*, *C. nymphaeae*, *C. paranaense*, e *C. limetticola* pertencente ao complexo *C. acutatum* e *C. fructicola* que pertence ao complexo *C. gloeosporioides* (MOREIRA; PERES; DE MIO, 2019). As espécies que compõe o complexo *C. acutatum* são menos sensíveis aos benzimidazóis (MBCs) do que os espécies do complexo *C. gloeosporioides* (ADASKAVEG; HARTIN, 1997; PERES et al., 2004). As cultivares plantadas nas regiões produtoras são suscetíveis a doença e isso também é um agravante para o controle tanto da MFG como da PA. A cultivar Gala e seus clones são altamente suscetíveis a *Colletotrichum* spp. (STADNIK et al. 2009; DENARDI;

KVITSCHAL; HAWERROTH, 2019), e representam aproximadamente 60% da área plantada no Brasil (HAWERROTH e PETRI 2014). Finalmente, o período que antecede a colheita é outro fator que merece atenção para o controle, pois nesse período são observadas condições ambientais que favorecem o desenvolvimento do patógeno como altas temperaturas e precipitações constantes. O período da colheita pode se estender e pulverizações com fungicidas possui restrições quanto ao intervalo de segurança para uso durante a colheita (VALDEBENITO-SANHUEZA et al. 2002). Nesta fase, o inóculo pode aumentar muito no campo devido ao uso restrito de fungicidas deixando o produtor com poucas alternativas para o controle.

O controle das doenças causadas por *Colletotrichum* spp. na cultura da macieira, inicia-se pela escolha da cultura a ser plantada. O emprego de cultivares resistentes representa um pilar dentre as estratégias utilizadas para o controle de doenças, sendo um método ideal por ser aplicável em larga áreas e possuir baixo impacto ambiental (CAMARGO, 2018). Espécies de *Colletotrichum* que causam mancha foliar de *Glomerella* infectam importantes cultivares de macieira, como a ‘Gala’ (BONETI; RIBEIRO e KATSURAYAMA, 1999). A MFG não é patogênica as folhas da cultivar ‘Fuji’, mas pode causar podridão amarga nos frutos desta cultivar (CAMILO e DENARDI, 2002). Em virtude do difícil controle da MFG, a opção de menor risco ambiental seria o uso da resistência genética. Cultivares de macieira obtidas no Brasil como ‘Baronesa’, ‘Carícia’, ‘Catarina’, ‘Daiane’, ‘Elenise’, ‘Eva’, ‘Fuji’ ‘Suprema’, ‘Imperatriz Luiza’, ‘Monalisa’, ‘Princesa’, ‘Venice’ e ‘Gala Gui’, possuem reação de resistência a mancha foliar de *Glomerella* (FAORO, 2022). Embora estes cultivares apresentem grande potencial para serem utilizados em pomares comerciais o mercado consumidor, ainda não se tem boa aceitabilidade devido principalmente a coloração da epiderme das frutas de padrão bicolor (ARAUJO; MEDEIROS e PASA, 2016). A ‘Gala Gui’, nova cultivar obtida a partir de uma mutação do clone de maçã ‘Star Gala’, tem como características frutos vermelhos rajados, característica apreciada pelos consumidores. Frutos são de alta qualidade e resistentes à MFG, sendo lançada em 2019 com potencial para ser a maçã mais plantada no Brasil (FAORO, 2019). Entretanto, estratégias como o uso de controle biológico no manejo integrado associadas a outras práticas de manejo são importantes para manter áreas já plantadas com cultivares suscetíveis.

No inverno deve-se decompor as folhas com a utilização de ureia entre 3,5 a 5% (STADNIK, 2009), podar e retirar os restos de poda e frutos mumificados da área (VALDEBENITO-SANHUEZA et al., 2002) e proteger as plantas com o uso de cúpricos, 300g/100 litros de água, e calda sulfocálcica, até 10% (VALDEBENITO-SANHUEZA e BETTI, 2005). Crusius et al. (2002)

observaram que o tratamento de inverno com duas pulverizações de 0,3% de oxiclreto de cobre reduz o inóculo inicial de *Colletotrichum* spp. em 72,9% nas gemas e 89,7% nos ramos. Gelain, Hamada e May De Mio (2022), observaram redução do inóculo inicial e ausência de *Colletotrichum* spp., em três dos quatros pomares onde foram coletados ramos de macieira no crescimento vegetativo, podendo ser resultado do tratamento de inverno com fungicidas cúpricos (sulfato de cobre e oxiclreto de cobre).

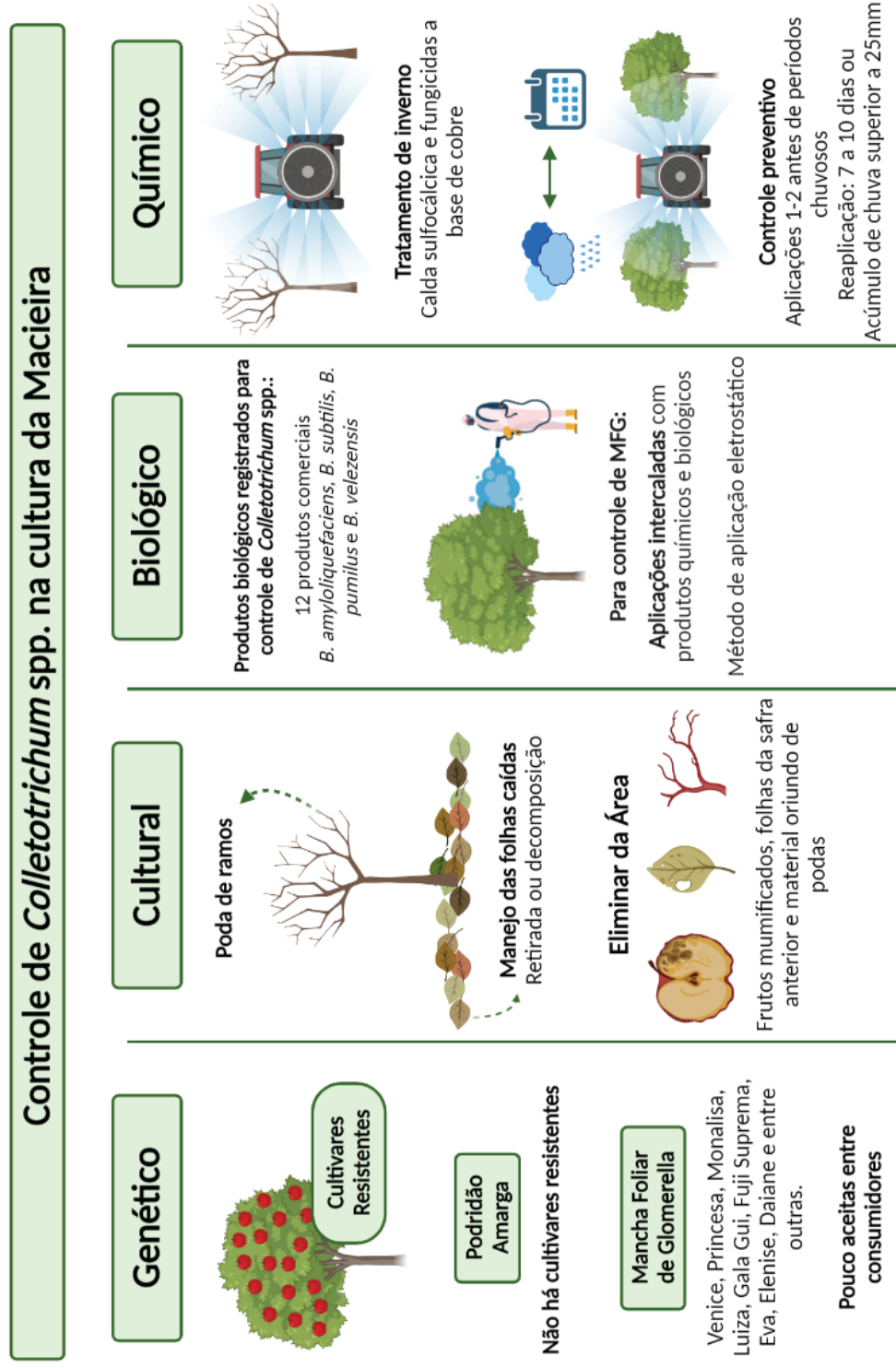
Na primavera, as práticas de manejo devem ser realizadas visando aumentar a ventilação e diminuir o acúmulo de umidade dentro da planta, reduzindo a duração do período de molhamento foliar e melhora da cobertura dos produtos químicos, para isso o recomendado é realizar a poda com objetivo de atender todos esses objetivos VALDEBENITO-SANHUEZA et al., 2002).

Para o controle químico de *Colletotrichum* spp. em macieira o recomendado é a realização do controle de forma preventiva ou no máximo quando se observa os sintomas iniciais da doença, no caso a mancha foliar de *Glomerella* nas folhas (KATSURAYAMA e BONETTI et al. 2009). É indispensável o monitoramento das condições climáticas, para que as aplicações sejam realizadas com um a dois dias antes de períodos chuvosos (ARAÚJO et al., 2017), e reaplicado com intervalos de 7 a 10 dias ou sempre que houver acúmulo de chuva superior a 25mm, desde a brotação até a colheita (KATSURAYAMA e BONETTI, 2009). No estado no Paraná, as pulverizações são realizadas desde a brotação até o período de pós-colheita, próximo ao outono, devido ao clima favorável para o patógeno. Com essas pulverizações, o produtor evita a queda precoce das folhas e garante o crescimento e produção para o ano seguinte (HAMADA et al., 2012). Os fungicidas mais comumente utilizados nos pomares de macieira são protetores, como os ditiocarbamatos (metiram, mancozebe e propinebe), com média de 20 aplicações por safra, e fungicidas sistêmicos dos grupos químicos metil benzimidazol carbamato (carbendazim e tiofanato-metilico) e QoIs (trifloxistrobina, cresoxim-metil e piraclostrobina), com em média 8 aplicações por safra (HAMADA; MAY DE MIO, 2017).

O período mais crítico para o controle de *Colletotrichum* spp. é o período que antecede a colheita, principalmente para maçãs da cultivar ‘Gala’. Condições climáticas favoráveis para o desenvolvimento do patógeno, como temperaturas elevadas e maior precipitação, associadas ao inóculo na área, requer aplicação intensiva de fungicidas, aumentando resíduos nos frutos (KATSURAYAMA e BONETTI, 2009). O uso de produtos no controle alternativo nesse período seria uma alternativa para controle de doenças causadas por *Colletotrichum* spp. na cultura da

macieira, porém ainda não é muito difundido. Produtos biológicos, indutores de resistência e bioestimulantes estão sendo cada vez mais utilizados em diversas culturas para complementar o controle fornecido pelos clássicos fungicidas (LIMA et al., 2018) e sendo utilizado em estudos para a cultura da macieira. Na figura 4, pode ser observado um esquema com as principais etapas e formas de controle de *Colletotrichum* spp. na cultura da macieira, onde está inserido o controle biológico. Nesta revisão serão apresentados em maior aprofundamento o que se tem relatado na literatura no tema de controle biológico com ênfase em espécies de *Bacillus* para controle de doenças ocasionadas por espécies de *Colletotrichum*.

FIGURA 4 – CONTROLE DE *Colletotrichum* spp. NA CULTURA DA MACIEIRA.



Fonte: o autor (2022).

4. CONTROLE BIOLÓGICO

O controle biológico de doenças de plantas tem por definição: “a redução de inóculo ou das atividades determinantes da doença provocadas por um patógeno, realizada por ou através de um ou mais microrganismos que não o homem” (COOK e BAKER, 1983). Esses microrganismos, possuem mecanismos de ação que vão atuar no controle biológico de doenças de plantas, esses mecanismos são: i) antibiose: atua através da produção de moléculas com ação direta sobre o crescimento ou fisiologia dos fitopatógenos; ii) indução de resistência: possui ação indireta sobre o patógeno, onde o microrganismo produz moléculas que são reconhecidas por receptores específicos ou se ligam a sítios específicos da planta; iii) competição: está relacionada com velocidade de crescimento do agente de controle biológico em relação ao patógeno, quando ambos estão associados ao tecido da planta hospedeira; iv) parasitismo e predação: capacidade que o agente de controle biológico tem de parasitar estruturas do patógeno por penetração ou colonização de hifas, produção de hifas hidrolíticas, como a quitinase e v) promoção de crescimento: mecanismo que não atua diretamente sobre o patógeno, mas auxilia o hospedeiro como um mecanismo compensatório. (MEDEIROS; SILVA; PASCHOLATI, 2018).

Dentre os microrganismos utilizados, as bactérias vêm se destacando como promissoras no uso para o controle biológico (ANGELO; VILAS-BÔAS; CASTRO-GÓMEZ, 2010). A seleção de microrganismos, começa a partir do seu isolamento em amostras, como de solo ou de qualquer parte da planta. Após o isolamento é verificado o potencial desses microrganismos, e realizada a identificação, geralmente por métodos de biologia molecular, caracterizam-se seus mecanismos antagônicos aos fitopatógenos e vários testes são realizados para determinar se são atóxicos para o meio ambiente, plantas e saúde humana e animal (LIU et al., 2013).

Para o controle biológico de doenças de plantas estão disponíveis 113 produtos comerciais à base de microrganismos. Esses, são registrados na plataforma AGROFIT, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento como “produtos microbiológicos”. As espécies que compõem esses produtos são: *Bacillus thuringiensis*, *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *Paecilomyces lilacinus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. firmus*, *B. velezensis*, *Trichoderma asperellum*, *T. harzianum*, *B. pumilus* e *B. methylotrophicus*. Para o controle de *Colletotrichum acutatum* e *C. gloeosporioides*,

agentes causais de doenças na cultura da macieira, estão registrados 12 produtos comerciais, produzidos à base de *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *B. pumilus* e *B. velezensis* (AGROFIT, 2022).

Pesquisas visando o controle biológico de *Colletotrichum* spp., principalmente com o uso de bactérias, vêm aumentando nos últimos anos. Ensaio *in vitro* utilizando *Paenibacillus polymixa* cepas APEC128 e APEC136, mostraram-se eficientes, reduzindo o crescimento micelial de *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* e o diâmetro da lesão de podridão amarga em frutos de macieira (KIM; BALARAJU; JEON, 2016b; KIM; BALARAJU; JEON, 2016a). *Pseudomonas putida*, isolada do filoplano da macieira, inibiu a germinação de conídios de *C. acutatum* na concentração $2,5 \times 10^5$ UFC/mL (MOREIRA; NESI; MAY DE MIO, 2014). As espécies *B. cereus*, *B. megaterium* e *B. mucoides* reduzem o tamanho da lesão de podridão amarga em frutos de macieira da cultivar “Golden Delicious” (POLEATEWICH; NGUGI; BACKMAN, 2012).

A bactéria *B. subtilis* inibe o crescimento micelial *in vitro* de *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* e reduz o diâmetro da lesão de podridão amarga em frutos de macieira (KIM; BALARAJU; JEON, 2016a). Em pós-colheita, células bacterianas ou somente o sobrenadante livre de células, tem potencial de reduzir a severidade de podridão amarga em frutos de macieira em 80,7 e 69,7%, respectivamente, quando comparado com frutos sem tratamento. (KIM; LEE; CHAE, 2015). *Bacillus* sp. e *B. alcalophilus* inibem a germinação dos conídios de *Colletotrichum* do complexo *acutatum* e produzem compostos fixos e voláteis, que inibem o crescimento micelial do patógeno, isolado da mesma cultura (MOREIRA; NESI; MAY DE MIO, 2014). Rollemberg (2008), a partir de uma prospecção, isolou 142 bactérias residentes no filoplano da cultura da macieira, capazes de produzir compostos com efeito inibitório ao crescimento micelial e germinação de conídios de *Colletotrichum*.

O gênero *Bacillus* spp. é um dos principais gêneros bacterianos estudados para atuar no controle biológico de doenças de parte aérea e de solo. Esse gênero engloba bactérias gram-positivas em formato de bastonetes que são capazes de formar endósporos mais resistentes ao calor, à secagem e à agentes destrutivos do que as células vegetativas (GORDON, HAYNES e PANG, 1973). Esses endósporos, devido a sua capacidade de resistência a diferentes condições, podem compor uma formulação eficaz para agente de controle biológico (KIM et al., 2021).

Suspensões de células de *B. velezensis* cepa AK-0 ajustada para 1×10^8 UFC/ml, *in vitro* apresenta atividade antagônica contra *C. gloeosporioides* isolado da macieira. Em frutos, tem potencial de atividade de biocontrole contra a podridão amarga causada por *C. gloeosporioides*,

reduzindo o diâmetro de lesão em até quatro vezes, quando comparado com frutos sem tratamento em condições de campo. Quando aplicado em frutos antes da inoculação com suspensão de conídios de *C. gloeosporioides*, *B. velezensis* reduziu em 80,7% os sintomas de podridão amarga. Para frutos tratados após a inoculação, a redução nos sintomas da doença foi de 54,9%. Na análise de antibióticos e metabólitos secundários do genoma de *B. velezensis* cepa AK-0, mostrou que podem estar envolvidos no controle a síntese de lipopeptídios cíclicos: surfactina, fengicina e bacilomicina, que atuam em atividades antifúngicas (KIM et al., 2021).

B. subtilis, é outra espécie que já se mostrou promissora e vem sendo utilizada e estudada para atuar no controle biológico de inúmeras doenças de plantas (ONGENA; JACQUES, 2008). Seu potencial em produzir diversos antibióticos é reconhecido há 50 anos (STEIN, 2005). Em média de 4 a 5% do seu genoma é voltado para a síntese de antibióticos, além de ter o potencial de produzir diversos compostos antimicrobianos (ONGENA; JACQUES, 2008). *B. subtilis* produz compostos orgânicos voláteis, que inibem o crescimento micelial de *Mucor circinelloides*, *Fusarium arcuatisporum*, *Alternaria iridialustralis* e *Colletotrichum fioriniae*. Esses compostos voláteis causaram deformações na morfologia do micélio. Para Goji berry, os compostos voláteis reduziram a incidência de podridão causadas pelos fungos patogênicos *F. arcuatisporum*, *A. iridialustralis* e *C. fioriniae* em experimentos *in vivo* (LING et al., 2021). *B. subtilis* quando aplicado em frutos destacados de manga, em condições de laboratório, controlou em até 77,78% a antracnose causada por *C. gloeosporioides*. Quando aplicado nos frutos *B. subtilis* (5%) em mistura com *Trichoderma harzianum* (5%) o controle da doença aumentou para 91,72% (SHARMA et al., 2021). Para antracnose em morango, a aplicação em folhas da suspensão bacteriana de *B. subtilis*, bactéria endofítica do morangueiro, foi observado redução da severidade da doença em 88,88%. Pelo método de amplificação por PCR, os genes lipopeptídicos deste isolado indicou a presença de iturina e surfactina responsáveis pela atividade antifúngica da bactéria, e não houve amplificação para a fengicinav (ALIJANI et al., 2022).

Outras espécies do gênero *Bacillus* vêm sendo estudadas. *B. amyloliquefaciens* foi relatada como inibidora do crescimento e da esporulação de *Streptomyces scabies*, sarna em batata (LIN et al., 1993). Em citros, essa espécie mostrou-se eficiente na inibição da germinação de conídios e no desenvolvimento do tubo germinativo de espécies de fungos em pós-colheita, como *Alternaria citri*, *Botryosphaeria* sp., *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusicoccum aromaticum*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Penicillium crustosum* e *Phomopsis persea* (ARREBOLA; JACOBS; KORSTEN,

2010). Em morango, foi observada atividade antagônica, inibindo a germinação de conídios e o crescimento micelial de *C. gloeosporioides* (30%), agente causal da antracnose do morangueiro em 83,1% e 30%, respectivamente. Em frutos, o controle da antracnose foi superior a 56,7% (WU et al., 2021). Por meio de espectrometria de massa foi observado no sobrenadante de *B. alcalophilus* a produção do lipopeptídeo iturina A, o qual possui atividade antifúngica que inibe a germinação de conídios de *C. gloeosporioides* e reduz o crescimento micelial desse fungo, induzindo um aumento da permeabilidade da membrana e redução no teor de proteína na célula fúngica (YAN et al., 2020). Os mesmos autores observaram redução no diâmetro da lesão de antracnose, em frutos de nêspera tratados com a iturina A. Esses resultados indicam que esse lipopeptídeo isolado de *B. amyloliquefaciens* pode ser um potencial agente de controle biológico para pós-colheita de frutos de nêspera.

Ademais, as bactérias do gênero *Bacillus* possuem a capacidade de produzir uma ampla variedade de compostos antagônicos com diferentes estruturas, permitindo grande atividade antifúngica (SIAHMOSHTEH et al., 2018). Na maioria das vezes, os lipopeptídeos desempenham um papel fundamental na atividade antimicrobiana (MNIF et al., 2016). São constituídos por cadeias de ácidos graxos hidrofóbicos e peptídeos cíclicos hidrofílicos e podem ser divididos em três principais famílias: surfactina, iturina e fengicina (ONGENA; JACQUES, 2008). Fengicina e iturina são conhecidas por apresentarem atividades antifúngicas contra vários fitopatógenos, enquanto a surfactina exibe fortes atividades antibacterianas e antivirais (SONG et al., 2013).

Essas três famílias podem afetar as células-alvo no nível de membrana (FIRA et al., 2018). Em altas concentrações podem provocar a formação de poros na membrana celular e, quando em baixas concentrações podem induzir a apoptose (ZHAO et al., 2017). Em *B. subtilis* por exemplo, foram indentificados três compostos produzidos, fengicina, iturina e surfactina, que são lipopeptídios e podem estar relacionados com a redução da severidade de podridão amarga em frutos de macieira (KIM, LEE e CHAE, 2015). *B. amyloliquefaciens* também produz lipopeptídeo da família das iturinas, bacilomicina D, que inibe a germinação e o crescimento micelial *in vitro* de *C. gloeosporioides* (LUNA-BULBARELA et al., 2018).

A surfactina foi isolada e caracterizada pela primeira vez em 1968 a partir de *B. subtilis* (ARIMA; KAKINUMA; TAMURA, 1968), é considerada um surfactante muito poderoso (ZHAO et al., 2017). A surfactina isoladamente não possui potencial fitotóxico, porém possui um efeito sinérgico com a atividade antifúngica da iturina A, ou seja, é necessário que ocorra um efeito

sinérgico entre as duas famílias para ocorrer ação fungicida, eficaz contra os patógenos (RAGAZZO-SÁNCHEZ et al., 2011). Kim et al., (2010) verificaram que as substâncias antifúngicas produzidas por *B. subtilis* cepa CMB 32 foram iturina A, fengicina e surfactina A. A surfatina A reteve o efeito antifúngico da iturina A, onde foi verificado o efeito sinérgico. Esse efeito sinérgico, foi também observado por Kupper, Moretto e Fujimoto (2020); neste caso, os autores verificaram redução na produção de iturina e aumento na produção de surfactina pela cepa ACB-83 de *B. subtilis*, quando em cultivo pareado com *Phyllosticta citricarpa*.

Iturina e fengicina se caracterizam por possuir fortes propriedades de biocontrole, por inibir uma ampla gama de patógenos (RAGAZZO-SÁNCHEZ et al., 2011). Para *B. amyloliquefaciens* cepa PG12, a atividade antifúngica contra *Botryosphaeria dothidea* foi atribuída à ação do lipopeptídeo iturina A, reduzindo a podridão branca da maçã em aproximadamente 60% (CHEN et al., 2016). A iturina proveniente de *B. pumilus* foi eficaz no controle de *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*, ambos patógenos produtores de aflatoxinas (CHO et al., 2009). A iturina A produzida por *B. amyloliquefaciens* cepa BUZ-14 é a principal família de lipopeptídeos, responsável pela inibição fúngica, que em baixos níveis proporciona controle efetivo da podridão parda em pêssegos e mofo azul em maçãs (CALVO et al., 2019). Quando utilizadas para controle de *Verticillium dahliae*, agente causal da murcha de *Verticillium* em algodão, a iturina purificada foi responsável por 50% do biocontrole do patógeno. As moléculas lipopeptídicas da família iturina são capazes de penetrar na membrana plástica do alvo e dentro delas, formam estruturas oligoméricas que são condutoras de íons (MAGET-DANA et al., 1992).

A fengicina, altera a estrutura e a permeabilidade da membrana celular fúngica (DELEU et al. 2005). Quando produzida por *B. subtilis*, tem a capacidade de inibir o crescimento de fungos filamentosos (TANG et al., 2014). Em maçã, é eficiente no controle de mofo cinzento (TOURÉ et al. 2004; ONGENA et al. 2005). Para o fungo de pós-colheita, *Rhizopus stolonifer*, a fengicina inibe a síntese de DNA (TAO et al., 2011). Para a cepa CPA-8 de *B. subtilis* foi observado efeito antifúngico devido a produção de fengicina, verificando-se redução de podridão parda do pessegueiro, causada por *Monilinia* spp. (YÁNEZ-MENDIZÁBAL et al., 2012). A fenginica induz danos à membrana e disfunção das organelas, interrompendo o potencial da membrana mitocondrial, levando ao estresse oxidativo e à condensação da cromatina, tendo como resultado a morte celular da hifa do patógeno (ZHANG e SUN, 2018). Esses resultados sugerem que a fenginica produzida por *Bacillus* spp. é promissora para aplicações no controle biológico em doenças de frutos e pode

ser utilizada para o desenvolvimento de formulações comerciais (YÁNEZ-MENDIZÁBAL et al., 2012).

A cepa SL-6 de *B. velezensis* controla podridões de pós-colheita produzindo lipopeptídeos antagonistas pertencentes à família fengicina. Estes lipopeptídeos tiveram potencial para tratamento alternativo contra doenças pós-colheita causadas por *A. alternata* e *B. cinerea* em macieira. A atividade desse metabólito foi observada em temperatura ambiente e em condições de armazenamento refrigerado, indicando que podem ajudar a prevenir perdas e preservar a qualidade dos frutos (COZZOLINO et al., 2020). Assim, um agente de controle biológico que pode produzir um metabólito suficientemente ativo pode ser o caminho mais adequado para uma aplicação comercial (CALVO et al., 2019).

Desenvolver um produto biológico é um processo complexo, longo e de alto custo. Apesar da grande quantidade de pesquisas investidas no estudo e a comprovação da eficiência em condições experimentais, o seu uso comercial tem sido muito limitado. Uma das maiores limitações para que esses produtos atinjam um alto nível de consumo comercial é a eficiência em condições de campo. Essas condições dependem de fatores ambientais que não são possíveis de controlar, como temperatura, umidade, precipitação e radiação. Fatores esses que os fungicidas sintéticos superaram e permaneceram como ferramenta essencial para o controle de fitopatógenos (NUNES, 2012).

Uma alternativa à adaptabilidade dos biológicos ao ambiente é investir no uso de microrganismos isolados do ambiente onde serão inseridos, pois já estão adaptados à sobreviver e crescer nestas condições (BLAKEMAN e FOKKEMA, 1982; ANDREWS, 1992). Isolar os microrganismos do filoplano, onde vivem na superfície das plantas e dividem o mesmo espaço com os patógenos de parte aérea, pode ser promissor como potenciais agentes de biocontrole desses patógenos (AZEVEDO, SERAFINE e BARROS, 2002).

Para colonizar a superfície dos frutos com sucesso, as bactérias antagônicas devem ter características específicas que facilitem sua adesão, colonização e multiplicação. Na maioria dos casos, essas características estão associadas à formação de biofilmes (ANNOUS; FRATAMICO; SMITH, 2009). A formação do biofilme é medida por *quorum sensing*, sendo uma via de sinalização bacteriana que controla fenótipos dependentes da densidade celular, como virulência, simbiose, conjugação, motilidade, esporulação e formação de biofilme (VOGEL; QUAX, 2019). No controle biológico, os biofilmes formados atuam como barreiras entre a superfície do hospedeiro e o fitopatógeno. No entanto, pouco se sabe sobre as principais funções e mecanismos envolvidos na

formação dos biofilmes (CARMONA-HERNANDEZ et al., 2019). Em ambientes agrícolas, é crescente o número de estudos sobre a formação de biofilmes (BEAUREGARD et al., 2013; CHEN et al., 2013).

Muitos estudos já foram conduzidos e demonstraram que o controle biológico de *Colletotrichum* spp. com uso de bactérias à base de *Bacillus* spp. é promissor. Porém, ainda é necessário avançar em estudos, principalmente com relação aos mecanismos de ação envolvidos no controle. Além disso, desenvolver formulações que visem potencializar os microrganismos e melhorar a formação do biofilme, sendo com o uso de adjuvantes ou pela associação de microrganismos, isolar novas espécies de microrganismos que possam ser promissoras no controle. para assim disponibilizar novos produtos comerciais que sejam eficientes.

5. FORMULAÇÃO DE PRODUTOS À BASE DE *Bacillus* spp.

As formulações à base de *Bacillus* spp. mais comuns e disponíveis para comercialização são pó ou grânulos dispersíveis em água e concentrado em emulsão. As formulações secas são geralmente compostas por alguns adjuvantes como agentes ligantes, agentes umectantes, agentes de suspensão e carreadores solúveis. Ingredientes adesivos também podem ser indispensáveis para garantir aplicações de pulverização eficazes em folhas e frutos, e fontes de carbono podem ser incorporadas em formulações secas e líquidas para manter a viabilidade celular e alcançar maior vida útil.

Melhorar o desempenho do biocontrole e proporcionar vida útil satisfatória são os principais papéis dos adjuvantes no desenvolvimento de formulações. Uma formulação robusta aumenta a eficiência do produto, preserva os ingredientes ativos, facilita o armazenamento e o transporte e melhora a aplicação do produto e os efeitos residuais.

Bacillus spp. em associação com substratos, como a quitina, podem estimular e aumentar a atividade de biocontrole (SID AHMED et al., 2003; DEBODE et al., 2016; WIECZOREK et al., 2019). Produtos visando a interação de diferentes microrganismos (ROBLES MONTOYA et al., 2020; YANTI et al., 2021; WIN et al., 2021; PRAKASH et al., 2022) também podem ter melhor desempenho e espectro amplificado, desenvolvendo relações sinérgicas (WANG et al., 2022).

Capítulo 2 – *Bacillus subtilis*, *B. alcalophilus* e *B. amyloliquefaciens* ATUAM REDUZINDO ESTRUTURAS INFECTIVAS DE ESPÉCIES DE *Colletotrichum* E POSSUEM POTENCIAL PARA CONTROLE DA PODRIDÃO AMARGA EM MACIEIRA

RESUMO

Colletotrichum spp. é agente causal da Podridão Amarga (PA), doença importante para a cultura da macieira, podendo causar perdas de até 50%. O controle químico de *Colletotrichum* spp. deve ser suspenso na colheita para evitar resíduos em frutos. Esta lacuna de pulverização representa risco para infecções em frutos e em folhas. Para este período e, para o período de armazenamento dos frutos, novas alternativas devem ser estudadas para garantir um bom manejo da PA, como o uso de produtos à base de *Bacillus*, indicado tanto para cultivo orgânico como para manejo combinado com fungicidas. O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito de *Bacillus subtilis*, *B. alcalophilus* e *B. amyloliquefaciens*, na germinação de conídios e crescimento micelial de *Colletotrichum* spp. e no controle de PA em frutos de macieira, verificando: i) a eficiência de diferentes tempos de cultivos e frações, biomassa e sobrenadante de *B. alcalophilus* na germinação de conídios e crescimento micelial de *Colletotrichum* spp.; ii) a eficiência dos produtos comerciais Serenade® (*B. subtilis*) e Duravel® (*B. amyloliquefaciens*) na germinação de conídios e crescimento micelial de *Colletotrichum* spp; iii) a produção de compostos antifúngicos termoestáveis dos *Bacillus* spp. no crescimento micelial de *Colletotrichum* spp.; iv) o efeito das bactérias no crescimento micelial de *C. nymphaeae*, *C. chrysophilum*, *C. melonis*, *C. siamense* e *C. limeticola*; e, v) o potencial das diferentes espécies de bactéria no controle da PA em frutos de macieira pela metodologia *ex vivo*. Foram conduzidos experimentos com *B. alcalophilus* (Lemid), *B. amyloliquefaciens* (Duravel®) e *B. subtilis* (Serenade®) em comparação com fungicidas CabrioTop® (piraclostrobina + metiram) e Delan® (ditianona), para controle de *C. nymphaeae* e *C. chrysophilum* com diferentes níveis de sensibilidade a mancozebe e tiofanato-metílico em experimentos *in vitro*. O controle de PA foi verificado em frutos destacados de macieira (*ex vivo*). Frutos cv. ‘Gala’ foram imersos nos produtos e inoculados com suspensão combinada de conídios de *C. nymphaeae* e *C. chrysophilum* com diferentes níveis de sensibilidade a tiofanato-metílico e mancozebe. Como resultados, o cultivo 24 horas na fração biomassa foi eficiente na redução da germinação de conídios e a fração sobrenadante no crescimento micelial de *C. nymphaeae* e *C. chrysophilum*. *B. alcalophilus* (Lemid), Duravel® e Serenade® reduziram o crescimento micelial de *C. melonis*, *C. limeticola*, *C. siamense*, *C. nymphaeae* e *C. chrysophilum*. O produto comercial CabrioTop® reduziu a germinação de conídios de *Colletotrichum* spp. em mais de 98,2% e o produto biológico Duravel® 0,5g/L inibiu até 64,4% a germinação de conídios de *C. chrysophilum* com sensibilidade reduzida a tiofanato-metílico (MdCc-55PR). Conídios de *Colletotrichum* spp. germinaram quando em contato com Duravel® e Serenade®, mas não formaram colônias quando plaqueados em meio de cultura. Serenade® produziu metabólitos termoestáveis capazes de inibir completamente o crescimento micelial de *Colletotrichum* spp. Duravel®, Serenade® autoclavado e o fungicida Delan® reduziram o risco de aparecimento de sintomas de PA sob alta pressão de inóculo em relação à frutos não tratados.

Palavras-chave: Controle Biológico, Bactérias Antagônicas, Filoplano, Controle Alternativo

ABSTRACT

Colletotrichum spp. are causal agents of bitter rot (BR), an important disease of apples that can cause up to 50% of yield losses. Chemical control of *Colletotrichum* spp. must be interrupted on harvest to avoid residues on fruits. This gap of spraying brings a risk of infection in fruits and leaves. During harvest and fruit storage, new alternatives should be investigated to guarantee good management of BR, such as the use of *Bacillus*-based products that are indicated either for organic farming or management programs combined with fungicides. The objective of this work was to evaluate the effect of *Bacillus subtilis*, *B. alcalophilus* and *B. amyloliquefaciens* on conidia germination and mycelial growth of *Colletotrichum* spp. and on the control of BR on apples by verifying: i) the efficiency of different cultivation times and fractions, biomass and supernatant of *B. alcalophilus* on conidia germination and mycelial growth of *Colletotrichum* spp.; ii) the efficiency of commercial products Serenade® (*B. subtilis*) and Duravel® (*B. amyloliquefaciens*) on conidia germination and mycelial growth of *Colletotrichum* spp.; iii) the production of antifungal thermostable compounds by *Bacillus* spp. on mycelial growth of *Colletotrichum* spp.; iv) the bacterial effect on mycelial growth of *C. nymphaeae*, *C. chrysophilum*, *C. melonis*, *C. siamense*, and *C. limetticola*; and v) the potential of different bacterial species on BR control on apples through *ex vivo* methodology. Experiments comparing *B. alcalophilus* (Lemid), *B. amyloliquefaciens* (Duravel®) and *B. subtilis* (Serenade®) with the fungicides CabrioTop® (pyraclostrobin + methiram) and Delan® (ditianone) were performed to control *C. nymphaeae* and *C. chrysophilum* with different levels of sensitivity to mancozeb and thiophanate-methyl *in vitro*. The control of BR was verified on detached fruits from apple trees (*ex vivo*). Fruits cv. ‘Gala’ were immersed in the products and inoculated with a combined suspension of conidia from *C. nymphaeae* and *C. chrysophilum*, with different levels of sensitivity to thiophanate-methyl and mancozeb. As a result, 24-hour cultivation on the biomass fraction was efficient to reduce conidia germination, and on the supernatant fraction was efficient over mycelial growth of *C. nymphaeae* and *C. chrysophilum*. *B. alcalophilus* (Lemid), Duravel® and Serenade® reduced mycelial growth of *C. melonis*, *C. limetticola*, *C. siamense*, *C. nymphaeae* and *C. chrysophilum*. The commercial product CabrioTop® reduced more than 98,2% of conidia germination of *Colletotrichum* spp. and the biological product Duravel® 0,5 g/L inhibited up to 64,4% of conidia germination of *C. chrysophilum* with reduced sensitivity to thiophanate-methyl (MdCc-55PR). Conidia from *Colletotrichum* spp. germinated while in contact with Duravel® and Serenade®, however they did not form colonies when plated on culture media. Serenade® produced thermostable metabolites that were able to completely inhibit mycelial growth of *Colletotrichum* spp. Autoclaved Duravel® and Serenade® and the fungicide Delan® reduced the risk of appearance of symptoms of BR under high inoculum pressure with respect to non-treated fruits.

Keywords: Biological control, bacterial antagonists, phylloplane, alternative control.

1. INTRODUÇÃO

A podridão amarga (PA) é uma doença comum em frutos de macieira (*Malus domestica* Borkh) e foi identificada nos Estados Unidos em 1867 (SUTTON, 1990). No Brasil, a doença foi relatada na década de 1970, quando a produção comercial de maçã foi iniciada no país (DENARDI; BERTON; SPENGLER, 2003). Todas as cultivares de macieira são suscetíveis a podridão amarga, porém as cultivares que pertencem ao grupo de colheita tardia são particularmente mais suscetíveis (DENARDI; BERTON; SPENGLER, 2003). É uma doença importante para a cultura, podendo causar perdas de até 50% em regiões temperadas com alta pluviosidade (SHI et al., 1996). No Brasil, essas condições são observadas predominante na região sul do país (IBGE, 2022), onde se concentra a produção nacional de maçã. *Colletotrichum* spp. é o agente causal da PA e diversas espécies já foram relatadas causando sintomas em frutos.

O controle de doenças causadas por *Colletotrichum* spp. na cultura da macieira é realizado principalmente com o uso intensivo de fungicidas (KATSURAYAMA; BONETI; BECKER, 2000; KATSURAYAMA e BONETI, 2012). O uso frequente de defensivos é eficaz, mas principalmente em condições de alta pressão de inóculo, pode selecionar populações resistentes, reduzindo a eficiência dos produtos resultando, em falhas no controle (STADNIK; ARAÚJO; VALDEBENITO-SANHUEZA, 2009). Moreira et al. (2019) comprovaram diferenças na sensibilidade de isolados do complexo de espécies *C. acutatum* aos fungicidas mancozebe, tiofanato-metílico e azoxistrobina. Diante disso, o controle biológico pode ser uma alternativa para reduzir impacto dos fungicidas químicos no ambiente e em especial para serem utilizados durante a colheita e na fase de comercialização dos frutos, evitando assim, resíduos em frutos.

Formulações comerciais à base de bactérias, como do gênero *Bacillus* spp., estão disponíveis no mercado para controle de diversas doenças de plantas. Para controle dos agentes causais de podridão amarga há registro de 12 produtos comerciais, produzidos à base de *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *B. pumilus* e *B. velezensis* (AGROFIT, 2022). Contudo, não foram encontrados estudos na literatura para o controle de PA com esses produtos comerciais, e em especial, comparando o efeito entre espécies e entre isolados com diferente sensibilidade à fungicidas. Além disso, os produtos disponíveis no mercado têm origem diversa e nenhum deles foi desenvolvido ou adaptado especificamente para a cultura da macieira.

Isolados selecionados especificamente do filoplano da macieira foram prospectados por Rollemberg (2008). Neste estudo foram obtidas 142 bactérias com diferentes capacidades de produzir compostos com efeito inibitório ao crescimento micelial e germinação de conídios de *Colletotrichum*. A partir desses, Moreira et al. (2014) selecionou 3 isolados promissores identificados como *Bacillus* sp., *B. alcalophilus* e *Pseudomonas putida*. Em campo esses isolados bacterianos não foram eficientes no controle de mancha foliar de *Glomerella* e essa falha no controle foi atribuída à formulação e à tecnologia de aplicação empregada (MOREIRA; MAY DE MIO, 2015). Tentando solucionar esse problema e dessa forma melhorar a eficiência, o isolado bacteriano *B. alcalophilus* foi selecionado e sua aplicação foi realizada por tecnologia eletrostática e em associação com fungicidas em campo, mostrando ser um método promissor para controle de mancha foliar de *Glomerella* (CASTELLAR, 2019). O efeito deste isolado não foi testado para controle da PA em macieira e esta é uma lacuna para estudos.

O uso do sobrenadante livres de células bacterianas com a concentração máxima de metabólitos ativos produzidos pelo microrganismo pode ter mais vantagens do que utilizar a própria bactéria para o controle (CALVO et al., 2019). Com isso, conhecer o potencial das frações biomassa e sobrenadante livres de células bacterianas de *B. alcalophilus* pode ser uma alternativa para melhorar ou entender o potencial de controle do isolado bacteriano no controle de podridão amarga em frutos de macieira.

Sendo assim, o objetivo do trabalho foi avaliar o efeito de diferentes espécies de *Bacillus* spp. (*B. subtilis*, *B. alcalophilus* e *B. amyloliquefaciens*) na germinação de conídios e crescimento micelial de *Colletotrichum* spp. e no controle de podridão amarga em frutos de macieira. Os objetivos específicos foram verificar: i) a eficiência de diferentes tempos de cultivos e frações, biomassa e sobrenadante de *Bacillus alcalophilus* na germinação de conídios e crescimento micelial de *Colletotrichum* spp.; ii) a eficiência dos produtos comerciais Serenade® (*B. subtilis*) e Duravel® (*B. amyloliquefaciens*) na germinação de conídios e crescimento micelial de *Colletotrichum* spp; iii) a produção de compostos antifúngicos termoestáveis dos *Bacillus* spp. no crescimento micelial de *Colletotrichum* spp. iv) o efeito das bactérias no crescimento micelial de *C. nymphaeae*, *C. chrysophilum*, *C. melonis*, *C. siamense* e *C. limeticola*; e, v) o potencial das diferentes espécies de bactéria no controle da podridão amarga em frutos de macieira pela metodologia *ex vivo*.

2. METODOLOGIA

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Epidemiologia para o Manejo Integrado de Doenças em Plantas (Lemid), localizado no Setor de Ciências Agrárias (UFPR), no município de Curitiba (PR).

2.1 Cultivo da bactéria *Bacillus alcalophilus* (Lemid)

O cultivo da bactéria *Bacillus alcalophilus* foi iniciado com a produção de um *starter* líquido, que consiste em um pequeno volume de meio de cultivo líquido (1% do volume do cultivo final), composto por extrato de bife (1,0g/L), extrato de levedura (2,0g/L), peptona (5,0g/L), cloreto de sódio (5,0g/L) com pH final de 6,8 (Nutrient Broth – KASVI). No *starter* foi depositado o crescimento bacteriano de uma placa de Petri em meio sólido. As condições de 30°C e 120rpm foram mantidas ao longo de todas as etapas de cultivo. Após o período de 24 horas de crescimento, o *starter* foi transferido assepticamente para o volume de inóculo (10% do volume do cultivo final) e permaneceu em agitação por mais um período de 24 horas de crescimento. Em seguida, o inóculo foi transferido para o volume de cultivo final (Nutrient Broth – KASVI) por um período de 24 horas nas mesmas condições iniciais de temperatura (30 °C) e agitação (120 rpm). Para os experimentos que avaliaram os diferentes tempos de cultivos (item 2.2 e 2.3), a metade do cultivo foi retirado após 24 horas e a outra metade se manteve por mais 24 horas. As duas coletas foram realizadas na fase estacionária (Anexo 1), que se caracteriza pela estabilidade da quantidade de células bacterianas na população.

Após as sequências de escalonamento do cultivo, a concentração foi padronizada para $2,5 \times 10^5$ UFC/ml. Em seguida, o cultivo foi submetido a separação da fração biomassa do sobrenadante, através de centrifugação por 20 minutos e rotação de 5.000rpm (HIMAC CR 21E-HITACH). Após a separação das frações, o sobrenadante e a biomassa passaram por processo de congelamento em temperatura de -17 a -25°C e, posterior processo de liofilização (Liofilizador LD 1500 – TERRONI), objetivando a eliminação da água em baixa temperatura (-50°C) para ambas as frações. No final desta etapa, foi determinada a massa de cada fração.

Para os experimentos com frutos de macieira destacados (*ex vivo*), item 2.4, o cultivo seguiu as mesmas etapas e condições de produção mencionados anteriormente. Iniciando com a produção do *starter* líquido, passando para o estágio de inóculo e posterior cultivo propriamente dito. Ao final do cultivo uma amostra do volume foi submetida a leitura em espectrofotômetro para calibração a $2,5 \times 10^5$ UFC/ml. Na sequência, no cultivo final foi adicionado ao volume total 0,5% de óleo mineral (Pirulim®), como função adjuvante e auxiliar na melhor cobertura dos frutos.

2.2 Descrição dos isolados

Para a condução do trabalho foram utilizados 11 isolados de *Colletotrichum* spp., que estão descritos na Tabela 1. Esses isolados estão armazenados na coleção do Laboratório de Epidemiologia para o Manejo Integrado de Doenças em Plantas (Lemid), localizado na Universidade Federal do Paraná/Setor de Ciências Agrárias, Curitiba (BR).

A classificação dos isolados quanto à sensibilidade aos ingredientes ativos tiofanato-metílico e mancozebe baseou-se nos trabalhos realizados por Moreira (2017) para os isolados MdCn-142, MdCn-181, MdCn-179, MdCc-55PR, MdCc-Col33, MdCc-134 e MdCl-180, por Gelain (2021) para o isolado MdCm-21 e por comunicação pessoal para o isolado MdCs-3R4E¹.

TABELA 1 – DESCRIÇÃO DOS ISOLADOS DE *Colletotrichum* spp. DE MACIEIRA DE ACORDO COM O CÓDIGO DE ARMAZINAMENTO, ESPÉCIE, PARTE DA PLANTA, ANO, ESTADO E NÍVEL DE SENSIBILIDADE AOS FUNGICIDAS TIOFANATO-METÍLICO E MANCOZEBE.

Código	Espécie	Cultivar	Órgão vegetal	Ano	Estado	Sensibilidade	
						⁸ TM	⁹ MCZ
MdCn-142	<i>C. nymphaeae</i>	Gala	Folha	2011	PR ¹	S ⁶	S
MdCn-181	<i>C. nymphaeae</i>	Gala	Flor	2011	PR	HR ³	LR
MsCn-CA32m	<i>C. nymphaeae</i>	Gala	Folha	2015	RS ²	S	S
MdCn-Col179	<i>C. nymphaeae</i>	Gala	Flor	2011	PR	HR	HR
MdCc-110	<i>C. chrysophilum</i>	Eva	Frutos de raleio	2017	PR	NI	NI
MdCc-55PR	<i>C. chrysophilum</i>	Gala	Brotação	2010	PR	HR	NI
MdCc-Col33	<i>C. chrysophilum</i>	Gala	Sintoma folhas	2010	RS	S	S
MdCc-134	<i>C. chrysophilum</i>	Gala	Brotação	2011	PR	HR	NI
MdCm-21	<i>C. melonis</i>	Eva	Fruto	2017	PR	⁷ NI	NI
MdCl-180	<i>C. limetticola</i>	Gala	Flor	2011	PR	HR	LR ⁴
MdCs-3R4E*	<i>C. siamense</i>	Eva	Fruto	2019	SP	R ⁵	LR

FONTE: o autor (2022).

¹PR – Paraná; ²RS – Rio Grande do Sul; ³HR - Altamente Resistente; ⁴LR - Pouco Resistente; ⁵R – Resistente; ⁶S – Sensível; ⁷NI – Não identificado. ⁸TM – Tiofanato Metílico; ⁹MCZ – Mancozeb.

2.3 Experimentos *in vitro*

2.3.1 Efeito das frações biomassa e sobrenadante de *Bacillus alcalophilus* cultivado em diferentes tempos na germinação de conídios de *Colletotrichum* spp.

Para avaliar o efeito das frações biomassa e sobrenadante de *B. alcalophilus* em diferentes tempos de cultivo na germinação de conídios de *Colletotrichum* spp., quatro discos de papel filtro

¹ Entrevista concedida pela engenheira agrônoma Rafaela Regina Moreira, do Fundo de Defesa da Citricultura-Fundecitrus, Araquara (SP), à engenheira agrônoma Débora Petermann, estudante de mestrado, bolsista UNIEDU, em 25.09.2022.

com diâmetro de 7 mm foram acondicionados de forma equidistante em placas de Petri com batata-dextrose-ágar (BDA) após a imersão por cinco segundos nos seguintes tratamentos: i) Fração biomassa cultivado por 24 horas (24hB); ii) Fração sobrenadante cultivado por 24 horas (24hS); iii) Fração biomassa cultivado por 48 horas (48hB); iv) Fração sobrenadante cultivado por 48 hora (48hS); e v) testemunha com água esterilizada.

Suspensões de esporos com concentração ajustada para 1×10^4 conídios/ml foram obtidas para os isolados MdCn-CA32M, MdCc-Col33, MdCn-Col179 e MdCC-Col134. Uma alíquota de 20 µL da suspensão foi depositada em cada um dos discos de papel de filtro previamente tratados. As placas foram incubadas em BOD (Demanda Bioquímica de Oxigênio) a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas por cinco dias. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, contendo cinco repetições por tratamento, cada placa correspondia uma unidade experimental, totalizando vinte e cinco placas de Petri. A avaliação foi realizada ao sexto dia após a implantação do experimento, por meio da mensuração do tamanho das colônias de micélio a partir de duas medidas diametralmente opostas com o auxílio de paquímetro digital (Kingtools®). O experimento foi conduzido em duplicata.

Para análise estatística adotou-se o modelo linear generalizado (GLM) pela distribuição Gaussiana, com arranjo fatorial 5x4 (5 tratamentos compostos por diferentes produtos x 4 isolados de *Colletotrichum* spp.). As médias quando diferentes estatisticamente foram comparadas pelo teste Tukey ao nível de 5% de significância. Para análise dos dados utilizou se o programa estatístico RStudio® (R CORE TEAM, 2022).

2.3.2 Efeito das frações biomassa e sobrenadante de *Bacillus alcalophilus* cultivado em diferentes tempos no crescimento micelial de *Colletotrichum* spp.

Para avaliar o efeito das frações biomassa e sobrenadante de *B. alcalophilus* em diferentes tempos de cultivo no crescimento micelial de *Colletotrichum* spp., papéis filtros em formato quadrado com 1x1cm foram imersos por cinco segundos nos seguintes tratamentos: i) Fração biomassa cultivado por 24 horas (24hB); ii) Fração sobrenadante cultivado por 24 horas (24hS); iii) Fração biomassa cultivado por 48 horas (48hB); iv) Fração sobrenadante cultivado por 48 horas

(48hS); e, v) testemunha com água esterilizada. Após imersos, os papéis foram depositados no centro de placas de Petri com BDA.

Discos de micélio (Ø 5mm) dos isolados MdCn-CA32M, MdCc-Col33, MdCn-Col179 e MdCC-Col134 foram retirados do bordo das colônias, e acondicionados nas placas de forma equidistante e paralela a ponta do papel filtro, somando quatro discos de micélio por placa, sendo que cada disco correspondia a um isolado. As placas foram incubadas em BOD em temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, contendo cinco repetições por tratamento. Cada repetição foi composta por uma placa, totalizando vinte e cinco placas de Petri. A avaliação foi realizada ao quinto dia após a implantação do experimento e consistiu na mensuração de duas medidas diametralmente opostas da colônia do fitopatógeno, com o auxílio de paquímetro digital (Kingtools®). O experimento foi conduzido em duplicata.

Para análise adotou-se o modelo linear generalizado (GLM) distribuição Gaussiana, com arranjo fatorial 5x4 (5 tratamentos compostos por diferentes produtos x 4 isolados de *Colletotrichum* spp.). As médias quando diferentes estatisticamente foram comparadas pelo teste Tukey ao nível de 5% de significância. Para análise dos dados utilizou-se o programa estatístico RStudio® (R CORE TEAM, 2022).

2.3.3 Influência de diferentes concentrações de *Bacillus amyloliquefaciens* no crescimento micelial de *Colletotrichum* spp.

Em placas de Petri contendo meio de cultura BDA, 4 discos de papéis de filtro (Ø 6mm) foram dispostos em pontos equidistantes da placa. Sobre os papéis filtros foi depositado uma alíquota de 5µL contendo os seguintes tratamentos: i) Duravel® (0,5g/L); ii) Duravel® (1,0g/L); iii) Duravel® (2,0g/L); iv) Serenade® (6,66ml/L); v) Delan® (2,5g/L); e vi) Testemunha composta por água esterilizada.

Na sequência, no centro da placa foi depositado um disco de micélio com 4mm de diâmetro dos isolados MdCc-110 e MdCn-142, classificados geneticamente como *C. chrysophilum* e *C. nymphaeae*, respectivamente. As placas foram incubadas em BOD, em temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, e fotoperíodo de 12 horas. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado com 3 repetições,

cada placa de Petri representada por uma unidade experimental. A avaliação foi realizada ao sétimo dia após a implantação do experimento e consistiu na mensuração de duas medidas diametralmente opostas da colônia do fitopatógeno, com o auxílio de paquímetro digital (Kingtools®). O experimento foi conduzido em duplicata.

Os dados foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para comparação múltipla de tratamentos usando R (R CORE TEAM, 2022) e depois adicionados ao pacote 'agricolae' (MENDIBURU, 2017), para teste adicional a fim de analisar os tratamentos que diferem entre si.

2.3.4 Influência de diferentes concentrações de *Bacillus alcalophilus* no crescimento micelial de *Colletotrichum* spp.

Em placas de Petri contendo meio de cultura BDA foram dispostos 4 discos de papéis de filtros (Ø 6mm) em pontos equidistantes da placa. Sobre os papéis filtros foi depositado uma alíquota de 5µL contendo os seguintes tratamentos: i) Sobrenadante (0,25g/L); ii) Sobrenadante (0,50g/L); iii) Sobrenadante (1,0g/L); iv) Biomassa (0,25g/L); v) Biomassa (0,50g/L); vi) Biomassa (1,0g/L); e vii) Testemunha somente água esterilizada. Na sequência, no centro da placa foi depositado um disco de micélio com 4mm de diâmetro dos isolados MdCc-110 e MdCn-142, classificados geneticamente como *C. chrysophilum* e *C. nymphaeae*, respectivamente. As placas foram incubadas em BOD, sob temperatura de 25±2°C, e fotoperíodo de 12 horas. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com 4 repetições, cada placa de Petri representada por uma unidade experimental. A avaliação foi realizada ao sétimo dia após a implantação do experimento e consistiu na mensuração de duas medidas diametralmente opostas da colônia do fitopatógeno, com o auxílio de paquímetro digital (Kingtools®). O experimento foi conduzido em duplicata.

Os dados foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para comparação múltipla de tratamentos usando R (R CORE TEAM, 2022) e depois adicionados ao pacote 'agricolae' (MENDIBURU, 2017) para um teste adicional para analisar os tratamentos que diferem entre si.

2.3.5 Eficiência de *Bacillus* spp. na germinação de conídios de *Colletotrichum* spp

Para avaliar o efeito dos tratamentos sobre a germinação de conídios de *Colletotrichum* spp. foram utilizados 4 isolados: 2 isolados de *Colletotrichum chrysophilum*, identificados como MdCc-110 e MdCc-55PR; e 2 isolados de *C. nymphaeae*, identificados como MdCn-142 e MdCn-181.

Os tratamentos utilizados no experimento foram: i) Duravel® (0,5g/L); ii) Duravel® (1,0g/L); iii) Duravel® (2,0g/L); iv) Serenade® (6,66ml/L); v) Fração sobrenadante *B. alcalophilus* (1g/L); vi) Fração biomassa *B. alcalophilus* (1g/L); vii) CabrioTop® (3,0g/L); e viii) Testemunha composta por água esterilizada.

Suspensões de conídios foram preparadas para os 4 isolados e ajustadas em 1×10^6 conídios/ml. Adicionou-se 50µL da suspensão de conídios de cada isolado em tubos do tipo Eppendorf® individualmente, e na sequência foi adicionado 50µL dos respectivos produtos em cada tubo. Os tubos foram incubados em BOD, em temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, no escuro por 12 horas e após esse período, efetuou-se a paralisação da germinação com adição de 20µL de lactofenol.

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, contendo 4 repetições, sendo que cada tubo representava uma unidade experimental. A avaliação foi realizada adicionando-se 10µL do volume de cada tubo em câmara de Neubauer. A porcentagem de germinação foi determinada mediante a contagem de 100 conídios do patógeno em microscópio de luz, (modelo Olympus CH30) em objetiva de 10 vezes, considerando-se como germinado os conídios com tudo germinativo maior que o próprio comprimento do conídio. O experimento foi realizado em duplicata.

Para análise estatística dos dados adotou-se o modelo linear generalizado (GLM) com arranjo fatorial 8×4 (8 tratamentos compostos por diferentes produtos x 4 isolados de *Colletotrichum* spp.). As médias quando diferentes estatisticamente foram comparadas pelo teste Tukey ao nível de 5% de significância. Para análise dos dados utilizou-se o programa estatístico RStudio® (R CORE TEAM, 2022).

2.3.6 Viabilidade dos conídios de *Colletotrichum* spp. em meio de cultura após experimento de germinação de conídios

A fim de avaliar se os conídios de *Colletotrichum* spp., que germinaram após 12 horas em contato com os tratamentos, ainda permaneciam viáveis e formariam colônia em meio de cultura, foi realizado o plaqueamento da suspensão de esporos obtida no experimento de germinação de

conídios. A metodologia, isolados e tratamentos utilizados para a condução desse experimento foram as mesmas descritas do item 2.2.5.

Antes de realizar a paralisação da germinação com a adição de lactofenol, duas alíquotas de 10µL foram retiradas dos tubos e, então depositas em placas de Petri contendo o meio BDA. As placas foram incubadas em BOD, sob temperatura de 25±2°C, e fotoperíodo de 12 horas. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, contendo 3 repetições, sendo que cada placa de Petri era composta por duas alíquotas. A avaliação foi realizada após quatro dias e consistiu na mensuração de duas medidas diametralmente opostas da colônia do fitopatógeno, com o auxílio de paquímetro digital (Kingtools®).

Para análise estatística dos dados, adotou-se o modelo linear generalizado (GLM) distribuição Gaussiana, com arranjo fatorial 8x4 (8 tratamentos compostos por diferentes produtos x 4 isolados de *Colletotrichum* spp.). As médias quando diferentes estatisticamente foram comparadas pelo teste Tukey ao nível de 5% de significância. Para análise dos dados utilizou se o programa estatístico RStudio® (R CORE TEAM, 2022).

2.3.7 Eficiência de *Bacillus* spp. no crescimento micelial de *Colletotrichum* spp. em meio de cultura fundente

Para avaliar o efeito dos tratamentos no crescimento micelial de *Colletotrichum* spp. foram utilizados 4 isolados: 2 isolados de *Colletotrichum chrysophilum*, identificados como MdCc-1110 e MdCc-55PR e 2 isolados de *C. nymphaeae*, identificados como MdCn-142 e MdCn-181.

Os tratamentos utilizados no experimento foram: i) Duravel® (0,5g/L); ii) Duravel® (1,0g/L); iii) Duravel® (2,0g/L); iv) Serenade® (6,66ml/L); v) Fração sobrenadante (1g/L); vi) Fração biomassa (1g/L); vii) CabrioTop® (3,0g/L); viii) Delan® (1,25g/L) e iv); Testemunha com água esterilizada.

Após a esterilização do meio de cultura BDA em autoclave, os produtos foram incorporados no meio fundente nas concentrações citadas anteriormente. Após incorporação dos produtos e solidificação do meio de cultura em placas de Petri, discos de micélio (Ø 4 mm) com sete dias de idade das diferentes espécies de *Colletotrichum* spp. foram transferidos para o centro das placas. As placas foram incubadas em BOD, sob temperatura de 25±2°C, e fotoperíodo de 12 horas. O

delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com 4 repetições, cada placa de Petri representando uma unidade experimental. A avaliação foi realizada ao sétimo dia após a implantação do experimento e consistiu na mensuração de duas medidas diametralmente opostas da colônia do fitopatógeno, com o auxílio de paquímetro digital (Kingtools®). O experimento foi conduzido em duplicata.

Para análise dos dados, adotou-se o modelo linear generalizado (GLM) distribuição Gaussiana, com arranjo fatorial 9x4 (9 tratamentos compostos por diferentes produtos x 4 isolados de *Colletotrichum* spp.). As médias quando diferentes estatisticamente foram comparadas pelo teste Tukey ao nível de 5% de significância. Para análise dos dados utilizou-se o programa estatístico RStudio® (R CORE TEAM, 2022).

2.3.8 Eficiência de *Bacillus* spp. no crescimento micelial de diferentes espécies de *Colletotrichum* spp.

Para avaliar o efeito de bactérias do gênero *Bacillus* spp. no crescimento micelial de diferentes espécies de *Colletotrichum* spp. foram utilizados os isolados: MdCn-142 (*C. nymphaeae*), MdCc-110 (*C. chrysophilum*), MdCs-3R4E (*C. siamense*), MdCm-21 (*C. melonis*) e MdCl-180 (*C. limetticola*).

Os tratamentos utilizados foram: i) Duravel® (1g/L); ii) Fração biomassa de *B. alcalophilus* (1g/L); iii) Fração sobrenadante *B. alcalophilus* (1g/L); iv) Serenade® (6,66ml/L); v) Delan® (1,25g/L) e vi) Testemunha com água esterilizada.

Em placas de Petri contendo meio de cultura BDA, 4 discos de papéis de filtros (Ø 6 mm) foram dispostos em pontos equidistantes da placa. Sobre os papéis de filtro foi depositado uma alíquota de 5µL contendo os respectivos tratamentos. Na sequência, no centro da placa foi depositado um disco de micélio com 4mm de diâmetro com sete dias de idade das diferentes espécies de *Colletotrichum* spp. As placas foram incubadas em BOD, sob temperatura de 25±2°C, e fotoperíodo de 12 horas. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com 3 repetições, cada placa de Petri representando uma unidade experimental. A avaliação foi realizada ao sétimo dia após a implantação do experimento e consistiu na mensuração de duas medidas diametralmente

opostas da colônia do fitopatógeno, com o auxílio de paquímetro digital (Kingtools®). O experimento foi conduzido em duplicata.

A análise estatística dos dados foi realizada pelo modelo linear generalizado (GLM) distribuição quase-poisson, com arranjo fatorial 6x5 (6 tratamentos compostos por diferentes produtos x 5 isolados de *Colletotrichum* spp.). As médias quando diferentes estatisticamente foram comparadas pelo teste Tukey ao nível de 5% de significância. Para análise dos dados utilizou-se o programa estatístico RStudio® (R CORE TEAM, 2022).

2.3.9 Ação de metabólitos termoe estáveis no crescimento micelial de *Colletotrichum* spp.

Para avaliar a ação de metabólitos termoe estáveis de bactérias do gênero *Bacillus* spp. no crescimento micelial de *Colletotrichum* spp., foram utilizados os seguintes tratamentos i) Duravel® (2g/L); ii) Serenade® (6,66ml/L); iii) Fração sobrenadante *B. alcalophilus* (1g/L); iv) Fração biomassa *B. alcalophilus* (1g/L) e v) Testemunha, constituída somente pelo meio de cultura BDA. Os produtos à base de *Bacillus* sp. foram preparados em frasco Erlenmeyer com 250ml de meio de cultura BDA, em suas respectivas doses, e posteriormente esterilizados em autoclave durante 20 minutos e temperatura de 120°C.

Os meios de cultura com os produtos foram vertidos em placas de Petri e após solidificado, transferiu-se um disco de micélio (Ø 4mm) com sete dias de idade de *C. chrysophilum* (MdCc-110) e *C. nymphaeae* (MdCn-142) para o centro da placa. As placas foram incubadas em BOD, sob temperatura de 25±2°C e fotoperíodo de 12 horas. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com 4 repetições, cada placa de Petri representando uma unidade experimental. A avaliação foi realizada ao sétimo dia após a implantação do experimento e consistiu na mensuração de duas medidas diametralmente opostas da colônia do fitopatógeno, com o auxílio de paquímetro digital (Kingtools®). O experimento foi conduzido em duplicata.

Os dados foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para comparação múltipla de tratamentos usando R (R Core Team, 2022) e depois adicionados ao pacote 'agricolae' (MENDIBURU, 2017) para teste adicional para analisar os tratamentos que diferem entre si.

2.4 EXPERIMENTO *ex vivo*

2.4.1 Eficiência de produtos à base de *Bacillus* spp. no controle de podridão amarga em frutos de macieira destacados (*ex vivo*) por metodologia de suspensão de conídios

Para avaliar o controle de podridão amarga foram utilizados quatro isolados, dois isolados da espécie *Colletotrichum nymphaeae* (MdCn-142 e MdCn-181) e dois isolados de *C. chrysophilum* (MdCc-110 e MdCc-55PR).

Frutos da cultivar ‘Gala’ foram previamente desinfestados com imersão em álcool 70% e solução de 0,5% de hipoclorito de sódio por 1 minuto, enxaguados três vezes em água destilada e submetidos à secagem natural. Posteriormente, os frutos foram tratados utilizando-se o método de imersão por aproximadamente 10 segundos. Os tratamentos utilizados foram: i) *B. alcalophilus* + óleo mineral Purulim® (2,5x10⁵UFC/ml); ii) Serenade® (6,66g/L); iii) Serenade® autoclavado (6,66g/L); iv) Duravel® (0,5g/L); v) Duravel® (1,0 g/L); vi) Duravel® (2,0g/L); vii) Delan® (2,5g/L); viii) CabrioTop® (3,0g/L) e iv) Testemunha, somente água.

Após o tratamento dos frutos, esses foram submetidos à secagem natural em temperatura ambiente por duas horas. Após secagem, os frutos foram inoculados com suspensão de conídios ajustada para 1x10⁵conídios/ml. As suspensões para os quatro isolados foram preparadas separadamente, e em seguida misturadas para um mesmo volume entre os isolados MdCn-142 e MdCc-110 e entre MdCn-181 e MdCc-55PR. Para a mistura de isolados, foi levado em consideração as características dos isolados quanto a sensibilidade à fungicidas. A inoculação foi realizada borrifando toda a superfície do fruto com a suspensão.

Após inoculados, os frutos foram acomodados em potes plásticos com tampa, previamente borrifados com água esterilizada para manutenção da umidade. Os frutos permaneceram em ambiente controlado sob temperatura de 25°C, umidade relativa do ambiente de 95% e fotoperíodo de 12 horas. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, sendo que cada tratamento/isolado era composto por 1 parcela com 1 fruto por parcela, totalizando 12 frutos. A avaliação foi realizada diariamente, observando-se o aparecimento dos sintomas e sinais típicos de *Colletotrichum* spp. até o 18º dia após a inoculação. O experimento foi conduzido em duplicata.

A partir dos dados coletados, foi realizada análise de sobrevivência considerando o aparecimento de sintomas de podridão amarga e sinais de *Colletotrichum* spp. ao longo do tempo.

Considerou-se a probabilidade dos frutos se manterem sem a ocorrência dos sintomas de podridão amarga ao longo do tempo. Foram construídas curvas de Kaplan-Meier para avaliar o risco de aparecimento de sintomas e ajuste ao modelo semi-paramétrico de Cox para comparar os tratamentos. As análises foram baseadas na teoria descrita em Carvalho et al. (2011). As análises dos dados foram realizadas com o ambiente R (R CORE TEAM, 2022) com o pacote 'Survival' (THERNEAU, 2012).

3. RESULTADOS

3.1 Experimentos *in vitro*

3.1.1 Efeito das frações biomassa e sobrenadante de *Bacillus alcalophilus* cultivado em diferentes tempos na germinação de conídios de *Colletotrichum* spp.

Para o experimento que avaliou o efeito do cultivo 24 e 48 horas de *Bacillus alcalophilus* nas frações biomassa e sobrenadante na germinação de conídios de *Colletotrichum* spp., o tratamento 24 horas na fração biomassa inibiu a germinação de *Colletotrichum nymphaeae* e *C. chrysophilum*, impedindo a formação de colônias em meio de cultura (Tabela 2).

No primeiro experimento, verificou-se que para os isolados de MdCn-CA32M e MdCc-Col33, sensíveis aos fungicidas tiofanato-metílico e mancozebe, não ocorreu formação de colônia, indicando a ação do sobrenadante na germinação dos conídios para esses isolados. Para os isolados de MdCn-Col179 (sensibilidade reduzida a mancozebe e tiofanato-metílico) e MdCc-Col134 (sensibilidade reduzida a mancozebe), o valor médio do diâmetro de colônia foi 30,1mm e 11,5mm, respectivamente, diferindo da testemunha.

No segundo experimento, os tratamentos 24 e 48 horas fração biomassa foram eficientes controle, não sendo observado a formação de colônia para os isolados utilizados.

3.1.2 Efeito das frações biomassa e sobrenadante de *Bacillus alcalophilus* cultivado em diferentes tempos no crescimento micelial de *Colletotrichum* spp.

O tratamento 24 horas na fração sobrenadante esteve entre os melhores tratamentos, reduzindo o crescimento micelial de *Colletotrichum* spp. (Tabela 3). O isolado MdCn-Col179 foi o que apresentou menor diâmetro médio da colônia para os dois experimentos, 22,42 e 25,22 mm, respectivamente. Para os demais isolados, MdCc-Col33, MdCn-CA32M e MdCc-134, os diâmetros médios da colônia ficaram próximos, não diferindo do tratamento 24 horas na fração sobrenadante.,

Outra característica evidente observada nas colônias onde os tratamentos à base de *B. alcalophilus* estavam presentes, foi a formação de halos de inibição de coloração escura na região de transição entre o micélio e a área de uma possível influência de metabólitos produzidos pela bactéria (Figura 1).

TABELA 2 – DIÂMETRO DA COLÔNIA (mm) DE ISOLADOS DE *Colletotrichum nymphaeae* E *C. chrysophilum* SENSÍVEIS E COM SENSIBILIDADE REDUZIDA AO FUNGICIDA MANCOZEBE, QUANDO SUBMETIDOS AOS TRATAMENTOS COM A BACTÉRIA *Bacillus alcalophilus* EM METODOLOGIA DE PAPEL DE FILTRO COM SUSPENSÃO DE CONÍDIOS.

TRATAMENTOS	EXPERIMENTO 1				EXPERIMENTO 2			
	Sensível		Sensibilidade reduzida		Sensível		Sensibilidade Reduzida	
	MdCn- CA32M ¹	MdCc- Col33 ²	MdCn- Col179 ³	MdCc- Col134 ⁴	MdCn- CA32M ¹	MdCc- Col33 ²	MdCn- Col179 ³	MdCc- Col134 ⁴
24h Biomassa ^a	0,0 aA	0,0 aC	30,13 aA	11,55 aB	0,0 aA	0,0 aA	0,0 aA	0,0 aA
24h Sobrenadante ^b	32,62 bB	25,35 bB	35,92 bA	34,85 cB	0,0 aA	31,8 cC	23,42 bB	32,08 dC
48h Biomassa ^c	36,82 bC	0,0 aB	31,02 aA	31,91 bB	0,0 aA	0,0 aA	0,0 aA	0,0 aA
48h Sobrenadante ^d	35,13 bB	0,0 aB	34,27 aA	34,91 cB	0,0 aA	26,0 bB	0,0 aA	26,22 bB
Testemunha	36,82 bB	27,5 bB	36,53 bA	36,38 cB	31,49 bC	30,0 cBC	23,97 bA	29,44 cB

Fonte: o autor (2022).

¹*Colletotrichum nymphaeae* sensível a mancozebe; ²*C. chrysophilum* sensível a mancozebe; ³*C. nymphaeae* com sensibilidade reduzida a mancozebe e tiofanato-metílico; ⁴*C. chrysophilum* com sensibilidade reduzida a mancozebe. ^aFração biomassa da bactéria *Bacillus alcalophilus* cultivada por 24 horas; ^bFração sobrenadante da bactéria *B. alcalophilus* cultivada por 24 horas; ^cFração biomassa da bactéria *B. alcalophilus* cultivada por 48 horas; ^dFração sobrenadante da bactéria *B. alcalophilus* cultivada por 48 horas; médias seguidas da mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas, não diferem significativamente entre pelo teste Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

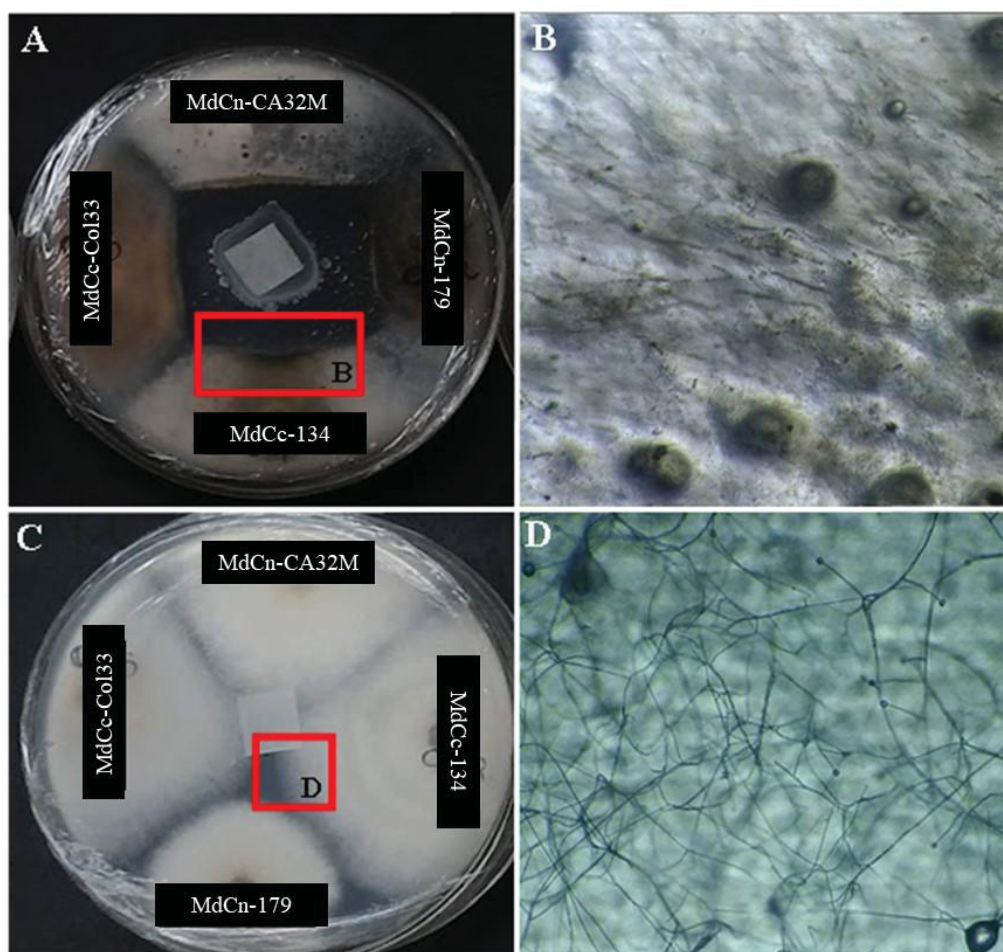
TABELA 3 - DIÂMETRO DA COLÔNIA (mm) DE ISOLADOS DE *Colletotrichum nymphaeae* E *C. chrysophilum* SENSÍVEIS E COM SENSIBILIDADE REDUZIDA AO FUNGICIDA MANCOZEBE, QUANDO SUBMETIDOS AOS TRATAMENTOS COM A BACTÉRIA *Bacillus alcalophilus* EM METODOLOGIA DE PAPEL DE FILTRO COM DISCO DE MICÉLIO.

TRATAMENTOS	EXPERIMENTO 1				EXPERIMENTO 2			
	Sensível		Sensibilidade reduzida		Sensível		Sensibilidade Reduzida	
	MdCn- CA32M ¹	MdCc- Col33 ²	MdCn- Col179 ³	MdCc- Col134 ⁴	MdCn- CA32M ¹	MdCc- Col33 ²	MdCn- Col179 ³	MdCc- Col134 ⁴
24h Biomassa ^a	28,95 abB	28,86 abB	23,96 abA	28,12 abB	33,07 bcB	33,24 bB	28,32 bA	32,17 abB
24h Sobrenadante ^b	27,75 aB	27,99 aB	22,42 aA	27,27 aB	28,75 aB	28,77 aB	25,22 aA	29,78 aB
48h Biomassa ^c	30,02 bC	27,95 aB	23,40 aA	28,35 abB	35,12 cC	30,2 aB	27,78 bA	34,83 cdC
48h Sobrenadante ^d	28,32 aB	27,63 aB	23,58 aA	29,04 bB	31,99 bB	30,69 aB	28,01 bA	32,95 bcB
Testemunha	33,53 cD	30,14 bB	25,26 bA	31,98 cC	35,38 cB	35,77 cB	29,21 bA	36,16 dB

Fonte: o autor (2022).

¹*Colletotrichum nymphaeae* sensível a mancozebe; ²*C. chrysophilum* sensível a mancozebe; ³*C. nymphaeae* com sensibilidade reduzida a mancozebe e tiofanato-metílico; ⁴*C. chrysophilum* com sensibilidade reduzida a mancozebe. ^aFração biomassa da bactéria *Bacillus alcalophilus* cultivada por 24 horas; ^bFração sobrenadante da bactéria *B. alcalophilus* cultivada por 24 horas; ^cFração biomassa da bactéria *B. alcalophilus* cultivada por 48 horas; ^dFração sobrenadante da bactéria *B. alcalophilus* cultivada por 48 horas. Médias seguidas da mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas, não diferem significativamente entre pelo teste Tukey, ao nível de 5% de probabilidade

FIGURA 1 – EFEITO DE *Bacillus alcalophilus* NO CRESCIMENTO MICELIAL DE *Colletotrichum* spp. A) EFEITO INIBITÓRIO DA FRAÇÃO SOBRENADANTE DE *Bacillus alcalophilus* CULTIVADA POR 24 HORAS, COM A FORMAÇÃO DE HALOS DE INIBIÇÃO; B) HIFAS DE *Colletotrichum* sp. INIBIDAS PELA FRAÇÃO SOBRENADANTE DE *B. alcalophilus* CULTIVADA POR 24 HORAS, VISUALIZADA EM MICROSCÓPIO DE LUZ (MODELO OLYMPUS CH30) EM OBJETIVA DE 10 VEZES; C) TRATAMENTO TESTEMUNHA; D) HIFAS DO TRATAMENTO TESTEMUNHA VISUALIZADA EM MICROSCÓPIO DE LUZ(MODELO OLYMPUS) CH30, EM OBJETIVA DE 10 VEZES.



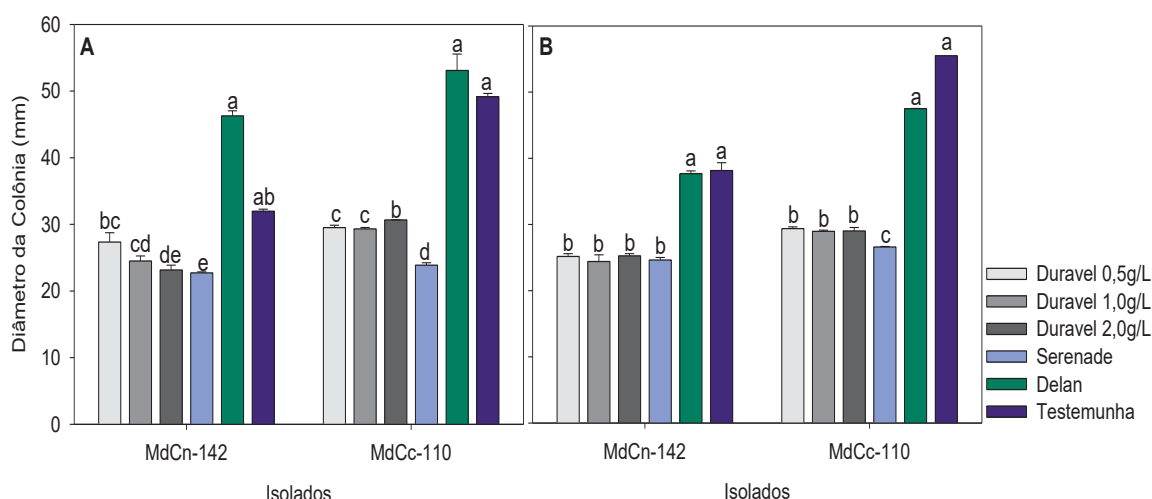
Fonte: o autor (2022).

3.1.3 Influência de diferentes concentrações de *Bacillus amyloliquefaciens* no crescimento micelial de *Colletotrichum* spp.

Todas as concentrações de *B. amyloliquefaciens* mostraram-se eficientes na redução do crescimento micelial de *Colletotrichum* spp., comparado com a testemunha (Figura 2). Entre as concentrações utilizadas, 0,5g/L, 1,0g/L e 2,0g/L, foi observado diferença estatística no primeiro experimento.

O tratamento à base de *B. subtilis* (Serenade®) apresentou os menores valores médios de diâmetro da colônia para o isolado MdCc-110, sendo de 23,8 e 26,6 cm para o primeiro e segundo experimentos, respectivamente. Para MdCn-142, a diferença foi observada somente no primeiro experimento, apresentando diâmetro médio da colônia de 22,7cm.

FIGURA 2 – DIÂMETRO MÉDIO DA COLÔNIA (cm) DE *Colletotrichum nymphaeae* (MdCn-142) E *C. chrysophilum* (MdCc-110) EM MEIO DE CULTURA EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO PRODUTO BIOLÓGICO À BASE DE *Bacillus amyloliquefaciens* (DURAVEL®) SENDO, A) PRIMEIRO EXPERIMENTO E B) SEGUNDO EXPERIMENTO.



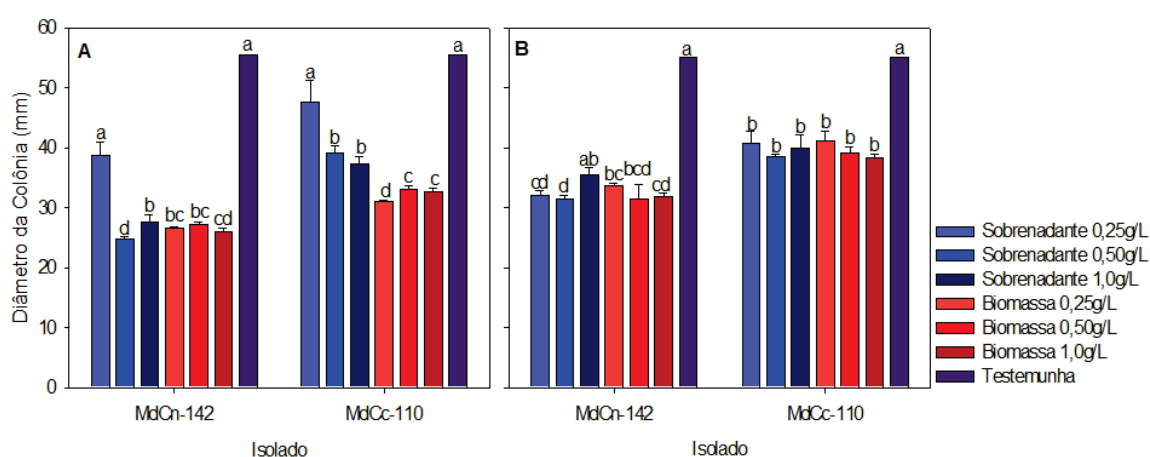
Fonte: o autor (2022).

1.4 Influência de diferentes concentrações de *Bacillus alcalophilus* no crescimento micelial e *Colletotrichum* spp.

Todas as concentrações de *B. alcalophilus* nas duas frações, biomassa e sobrenadante, foram eficientes e inibiram o crescimento micelial de *C. nymphaeae* e *C. chrysophilum*, quando comparados com a testemunha, exceto para a fração sobrenadante 0,25g/L no primeiro experimento. A diferença no diâmetro médio da colônia observada foi pequena entre os tratamentos que

apresentaram diferença estatística, com isso foi adotado para os demais experimentos as concentrações de 1,0g/L para a fração biomassa e sobrenadante, por se manterem constante nos dois experimentos (Figura 3).

FIGURA 3 – DIÂMETRO MÉDIO DA COLÔNIA (mm) DE *Colletotrichum nymphaeae* (MdCn-142) E *C. chrysophilum* (MdCc-110) EM MEIO DE CULTURA EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE *Bacillus alcalophilus* (Lemid) sendo: A) PRIMEIRO EXPERIMENTO E B) SEGUNDO EXPERIMENTO



Fonte: o autor (2022).

3.1.5 Eficiência de *Bacillus* spp. na germinação de conídios de *Colletotrichum* spp.

Para germinação de conídios, o fungicida CabrioTop® foi eficiente e inibiu a germinação de conídios de *C. nymphaeae* e *C. chrysophilum* (sensíveis e com sensibilidade reduzida à fungicidas) em mais de 98,3%. Para os produtos biológicos, menores porcentagens de germinação foram observadas para o isolado *C. chrysophilum* (MdCc-55PR com sensibilidade reduzida à tiofanato-metílico), quando em contato com *B. amyloliquefaciens* (Duravel®) nas concentrações 0,5g/L (26,5 e 51,2%) e 1,0g/L (46,5 e 32,7%) em comparação com a testemunha (74,5 e 84,0%) no primeiro e segundo experimento, respectivamente (Tabela 4).

TABELA 4 - PORCENTAGEM (%) DE GERMINAÇÃO DE CONÍDIOS DE *Colletotrichum* spp. APÓS 12 HORAS EM CONTATO COM OS PRODUTOS BIOLÓGICOS A BASE DE *Bacillus* spp. E O FUNGICIDA CABRIOTOP®

TRATAMENTOS	EXPERIMENTO 1				EXPERIMENTO 2			
	Sensível		Sensibilidade Reduzida		Sensível		Sensibilidade Reduzida	
	MdCn-142 ¹	MdCc-110 ²	MdCn-181 ³	MdCc-55PR ⁴	MdCn-142 ¹	MdCc-110 ²	MdCn-181 ³	MdCc-55PR ⁴
Fração biomassa	65,25 cdA	98,0 cdB	89,0 bcB	63,5 deA	90,0 bA	89,7 cA	89,2 cdeA	79,0 dA
Fração sobrenadante	56,5 bcA	97,25 cdC	85,75 bcB	56,5 cdA	86,5 bB	68,5 bcB	35,7 bA	67,2 cdB
Duravel® 0,5g/L	87,25 eB	91,25 bcdB	89,5 cB	26,5 bA	94,0 bB	72,0 bcB	73,7 cdeBC	51,2 bcA
Duravel® 1,0g/L	68,25 cdB	84,25 bC	85,75 bcC	46,5 cA	77,7 bB	58,0 bB	67,2 cdB	32,7 bA
Duravel® 2,0g/L	48,25 bA	91,0 bcdD	76,75 bC	65,25 deB	91,7 bC	57,0 bB	65,0 cB	31,7 bA
Serenade®	62,25 cdA	100 dC	96,0 cC	73,0 eB	90,0 bA	85,7 cA	96,7 eA	82,0 dA
CabrioTop®	0,0 aA	0,0 aA	0,0 aA	0,0 aA	1,7 aA	0,75 aA	0,0 aA	0,0 aA
Testemunha	73,0 dA	86,0 bcB	87,25 bcB	74,5 eA	91,7 bA	83,5 cA	90,5 deA	84,0 dA

Fonte: o autor (2022).

¹*Colletotrichum nymphaea*; ²*C. chrysophilum*; ³*C. nymphaeae* altamente resistente a tiofanato-metílico e pouco resistente a mancozebe; ⁴*C. chrysophilum* altamente resistente a tiofanato-metílico. 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. Biomassa e Sobrenadante: frações da bactéria *B. alcalophilus*; Duravel®: produto comercial à base de *B. alcalophilus*; Serenade®: produto comercial à base de *B. subtilis*; CabrioTop®: produto comercial, ingredientes ativos metiram e piraclostrobina;

3.1.6 Viabilidade dos conídios de *Colletotrichum* spp. em meio de cultura após experimento de germinação de conídios

B. amyloliquefaciens (Duravel®) e *B. subtilis* (Serenade®), mesmo com altas porcentagens de germinação após o plaqueamento em meio de cultura (Tabela 4), não formaram colônia, inibindo completamente o crescimento micelial de *Colletotrichum* spp. (0,0 mm). Isso foi observado para *B. alcalophilus* na fração sobrenadante para os isolados MdCn-181 com sensibilidade reduzida à tiofanato-metílico e mancozebe e MdCc-55PR somente à tiofanato-metílico (Tabela 5), onde não formaram colônia em meio de cultura (Figura 4).

TABELA 5 – DIÂMETRO DA COLÔNIA (mm) DE *Colletotrichum nymphaeae* E *C. chrysophilum* COM DIFERENTES NÍVEIS DE SENSIBILIDADE À FUNGICIDA, QUANDO COLOCADOS EM CONTATO COM OS PRODUTOS POR 12 HORAS E IMEDIATAMENTE PLAQUEADOS EM MEIO DE CULTURA.

TRATAMENTOS	Sensível		Sensibilidade Reduzida	
	MdCn-142 ¹	MdCc-110 ²	MdCn-181 ³	MdCc-55PR ⁴
Biomassa	19,69 bB	19,92 bcB	16,74 Ba	28,32 bC
Sobrenadante	19,27 bB	19,18 bB	0,0 aA	0,0 aA
Duravel® 0,5g/L	0,0 aA	0,0 aA	0,0 aA	0,0 aA
Duravel® 1,0g/L	0,0 aA	0,0 aA	0,0 aA	0,0 aA
Duravel® 2,0g/L	0,0 aA	0,0 aA	0,0 aA	0,0 aA
Serenade®	0,0 aA	0,0 aA	0,0 aA	0,0 aA
CabrioTop®	0,0 aA	0,0 aA	0,0 aA	0,0 aA
Testemunha	18,77 bA	21,60 cB	22,45 cB	28,02 bC

Fonte: o autor (2022).

¹*Colletotrichum nymphaeae*; ²*C. chrysophilum*; ³*Colletotrichum nymphaeae* altamente resistente a tiofanato-metílico e pouco resistente a mancozebe; ⁴*C. chrysophilum* altamente resistente a tiofanato-metílico. 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. Biomassa e Sobrenadante: frações da bactéria *B. alcalophilus*; Duravel®: produto comercial à base de *B. alcalophilus*; Serenade®: produto comercial à base de *B. subtilis*; CabrioTop®: produto comercial, ingredientes ativos metiram e piraclostrobina;

FIGURA 4 – PLAQUEAMENTO DA SUSPENSÃO DE CONÍDIOS DE *Colletotrichum nymphaeae* E *C. chrysophilum* APÓS 12 HORAS EM CONTATO COM OS PRODUTOS BIOLÓGICOS À BASE DE *Bacillus* spp. E O FUNGICIDA CABRIOTOP® EM MEIO DE CULTURA BDA.



Fonte: o autor (2022).
MdCc-142: *Colletotrichum nymphaeae*; MdCc-110: *C. chrysophilum*; MdCc-181: *C. nymphaeae* altamente resistente a tiofanato-metílico e pouco resistente a mancozebe; MdCc-55PR: *C. chrysophilum* altamente resistente a tiofanato-metílico; Biomassa e Sobrenadante: frações da bactéria *B. alcalophilus*; Duravel®: produto comercial à base de *B. subtilis*; Serenade®: produto comercial à base de *B. subtilis*; CabrioTop®: ingredientes ativos metiram e piraclostrobina;

3.1.7 Eficiência de *Bacillus* spp. no crescimento micelial de *Colletotrichum* spp. em meio de cultura fundente

B. subtilis (Serenade®), *B. alcalophilus* nas frações biomassa e sobrenadante e *B. amyloliquefaciens* (Duravel®) foram eficientes e reduziram o crescimento micelial de *C. nymphaeae* e *C. chrysophilum*. O mesmo foi observado para os fungicidas Delan® e CabrioTop® que reduziram o crescimento micelial dos patógenos (Tabela 6).

Para os produtos biológicos utilizados, *B. amyloliquefaciens* nas três concentrações, 0,5g/L, 1,0g/L e 2,0g/L tiveram menor diâmetro médio da colônia em relação aos demais produtos e em comparação com o tratamento testemunha. O crescimento da colônia foi observado somente no segundo experimento para o isolado MdCc-55PR nas concentrações de 0,5g/L e 1,0g/L, com diâmetro médio da colônia de 4,88 e 4,29 mm, respectivamente. Na testemunha o diâmetro médio da colônia no primeiro experimento foi de 20,7mm (MdCc-110) e 47,82mm (MdCc-55PR) para menor e maior diâmetro e para o segundo experimento de 40,20mm (MdCn-142) e 56,00mm (MdCc-110), respectivamente.

Entre os isolados utilizados, *C. chrysophilum*, menos sensível ao tiofanato-metilico, (MdCc-55PR) mostrou-se de difícil controle para os produtos à base de *B. alcalophilus* nas frações biomassa e sobrenadante, *B. subtilis* e CabrioTop®. Esses resultados podem ser observados na Figura 5.

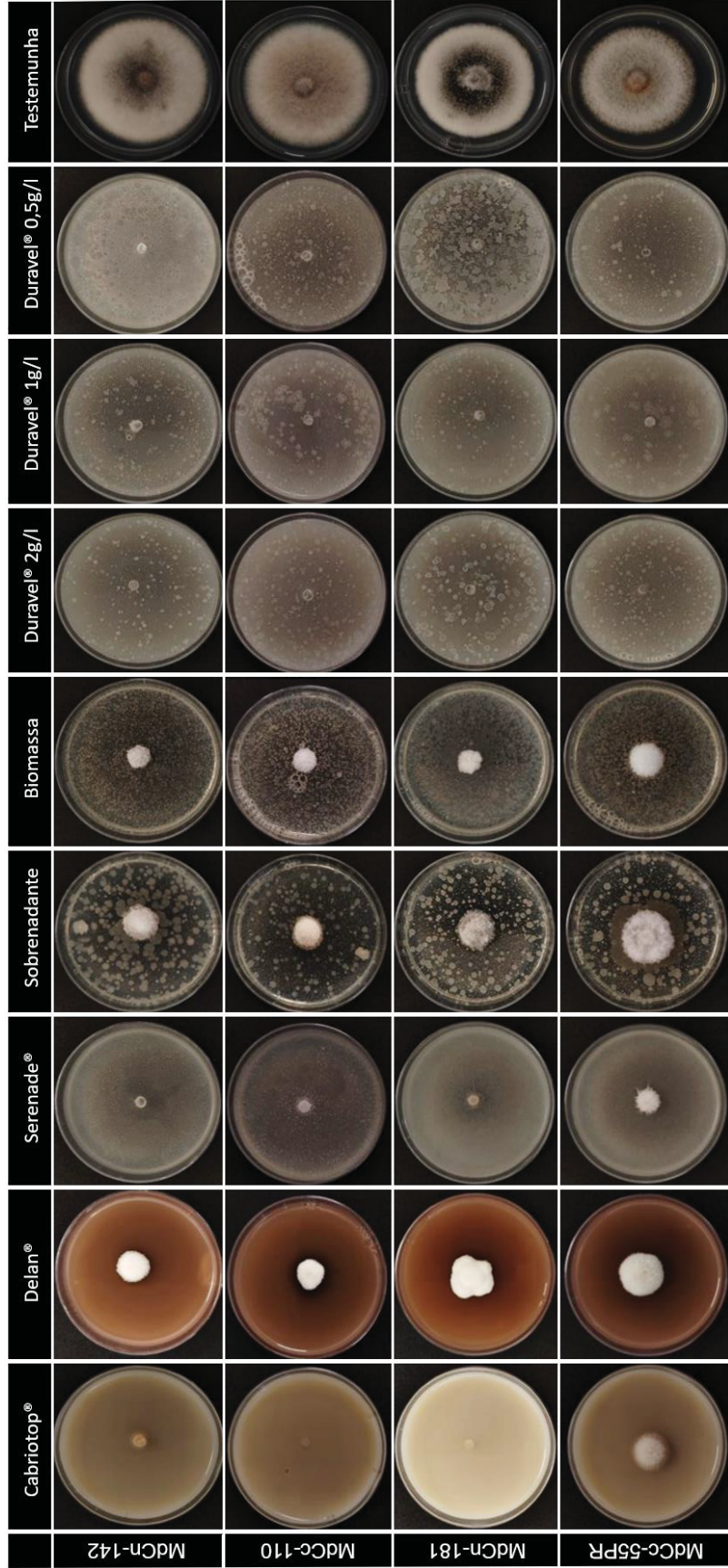
TABELA 6 – DIÂMETRO MÉDIO DA COLÔNIA (mm) DE *Colletotrichum nymphaeae* E *C. chrysophilum* CULTIVADOS EM MEIO DE CULTURA FUNDENTE COM OS PRODUTOS À BASE DE *Bacillus* spp. E OS FUNGICIDAS CABRIOTOP® E DELAN®.

TRATAMENTOS	EXPERIMENTO 1				EXPERIMENTO 2			
	Sensível		Sensibilidade Reduzida		Sensível		Sensibilidade Reduzida	
	MdCn-142 ¹	MdCc-110 ²	MdCn-181 ³	MdCc-55PR ⁴	MdCn-142 ¹	MdCc-110 ²	MdCn-181 ³	MdCc-55PR ⁴
Biomassa	7,85 bA	8,24 bA	7,46 bA	13,29 cB	0,0 aA	5,47 bB	4,06 abAB	16,10 bC
Sobrenadante	11,22 bA	11,90 bA	13,96 cA	20,70 dB	10,63 bA	8,95 bA	7,87 bcA	18,54 bcB
Duravel® 0,5g/L	0,0 aA	0,0 aA	0,0 aA	0,0 aA	0,0 aA	0,0 aA	0,0 aA	4,88 aB
Duravel® 1,0g/L	0,0 aA	0,0 aA	0,0 aA	0,0 aA	0,0 aA	0,0 aA	0,0 aA	4,29 aB
Duravel® 2,0g/L	0,0 aA	0,0 aA	0,0 aA	0,0 aA	0,0 aA	0,0 aA	0,0 aA	0,0 aA
Serenade®	0,0 aA	0,0 aA	2,75 abA	7,70 bB	0,0 aA	0,0 aA	0,0 aA	17,23 cdB
CabrioTop®	0,0 aA	0,0 aA	0,0 aA	15,12 cB	0,0 aA	0,0 aA	0,0 aA	21,30 cB
Delan®	11,7 bAB	10,94 bA	15,53 cB	15,82 cdB	11,18 bA	20,14 cA	12,62 cA	15,18 bA
Testemunha	45,06 cA	20,7 cA	44,86 dA	47,82 eA	40,20 cA	56,0 dB	43,44 dA	55,25 dB

Fonte: o autor (2022).

¹*Colletotrichum nymphaeae*; ²*C. chrysophilum*; ³*C. nymphaeae* altamente resistente a tiofanato-metílico e pouco resistente a mancozebe; ⁴*C. chrysophilum* altamente resistente a tiofanato-metílico. 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. Biomassa e Sobrenadante: frações da bactéria *B. alcalophilus*; Duravel®: produto comercial à base de *B. alcalophilus*; Serenade®: produto comercial à base de *B. subtilis*; CabrioTop®: produto comercial, ingredientes ativos metiram e piraclostrobina; Delan®: produto comercial, ingrediente ativo ditianona.

FIGURA 5 – CRESCIMENTO MICELIAL DE *Colletotrichum nymphaeae* E *C. chrysophilum* EM MEIO DE CULTURA CONTENDO PRODUTOS À BASE DE *Bacillus* spp. E OS FUNGICIDAS CABRIOTOP® E DELAN®.



Fonte: o autor (2022).

MdCn-142: *Colletotrichum nymphaeae*; MdCc-110: *C. chrysophilum*; MdCn-181: *C. nymphaeae* altamente resistente a tiofanato-metílico e pouco resistente a mancozebe; MdCc-55PR: *C. chrysophilum* altamente resistente a tiofanato-metílico; Biomassa e Sobrenadante: frações da bactéria *B. alcalophilus*; Duravel®: produto comercial à base de *B. subtilis*; Serenade®: produto comercial à base de *B. subtilis*; CabrioTop®: produto comercial, ingredientes ativos metiram e piraclostrobina; Delan®: produto comercial, ingrediente ativo ditianona.

3.1.8 Eficiência de *Bacillus* spp. no crescimento micelial de diferentes espécies de *Colletotrichum* spp.

O experimento visando o controle micelial de diferentes espécies de *Colletotrichum* spp. evidenciou que os produtos biológicos à base de *Bacillus subtilis* (Serenade®), *B. amyloliquefaciens* (Duravel®) e *B. alcalophilus* (Lemid) nas frações biomassa e sobrenadante agem no micélio do fungo, inibindo o crescimento das diferentes espécies de *Colletotrichum* spp. (Tabela 7). Os produtos *B. subtilis* (Serenade®) e *B. amyloliquefaciens* (Duravel®) foram mais eficientes quando comparados à testemunha. O valor médio de diâmetro da colônia entre os isolados esteve entre 14,3 (*C. melonis*) e 19,7 mm (*C. siamense*) para *B. subtilis* e entre 12,0 (*C. melonis*) e 19,2 mm (*C. siamense*) para *B. amyloliquefaciens* no primeiro experimento. No segundo experimento, o valor médio do diâmetro da colônia esteve entre 17,4 (*C. chrysophillum* e *C. limeticola*) e 23,1mm (*C. siamense*) e entre 16,3 e 23,5mm (*C. siamense*), respectivamente. O fungicida Delan® não foi eficiente, uma vez que o crescimento do patógeno não diferiu do tratamento testemunha. As características das colônias e o desempenho de cada produto podem ser observados na Figura 6.

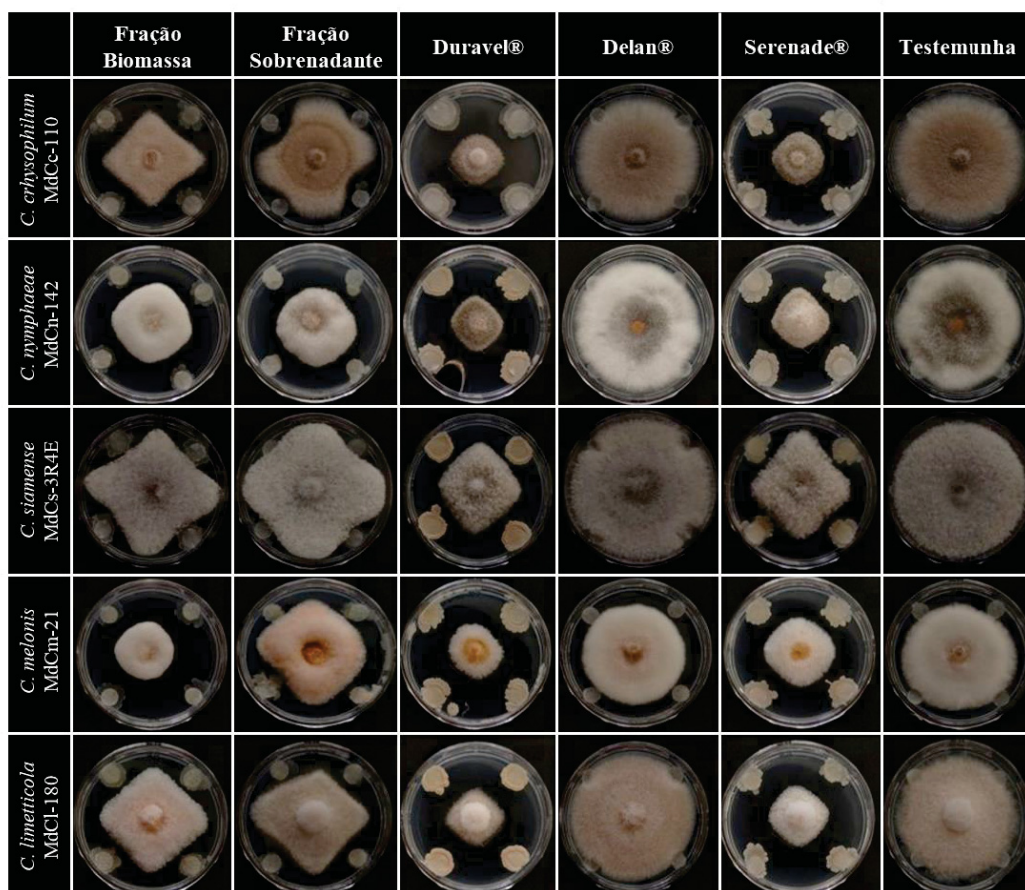
TABELA 7 – DIÂMETRO DA COLÔNIA DE DIFERENTES ESPÉCIES DE *Colletotrichum* spp. CULTIVADOS EM MEIO DE CULTURA PELO MÉTODO DE IMERSÃO EM PAPEL FILTRO NOS TRATAMENTOS A BASE DE *Bacillus* spp. E O FUNGICIDA DELAN®.

TRATAMENTOS	EXPERIMENTO 1 – Espécies					EXPERIMENTO 2 – Espécies				
	MdCn- 142 ¹	MdCc- 110 ²	MdCs- 3R4E ³	MdCm- 21 ⁴	MdCl- 180 ⁴	MdCn- 142 ¹	MdCc- 110 ²	MdCs- 3R4E ³	MdCm- 21 ⁴	MdCl- 180 ⁵
Biomassa	25,6 bB	24,6 bAB	25,7 bB	20,1 bA	23,8 bAB	25,3 bA	25,2 bA	34,0 bB	23,7 bA	24,9 bA
Sobrenadante	25,9 bA	26,8 bAB	31,4 cB	29,9 cAB	25,5 bA	30,0 cAB	30,2 cAB	37,9 cC	28,7 cA	32,4 cB
Duravel®	15,8 aB	15,5 aAB	19,2 aB	12,0 aA	17,0 aB	16,3 aA	18,2 aAB	23,5 aC	19,8 aB	17,2 aAB
Delan®	41,5 cB	44,2 cB	46,0 dB	33,0 cdA	43,8 cB	39,6 dB	43,2 dBC	46,0 dC	30,6 cA	44,3 dC
Serenade®	16,9 aAB	15,7 aAB	19,7 aB	14,3 aA	16,1 aAB	17,9 aA	17,4 aA	23,1 aB	19,4 aA	17,4 aA
Testemunha	41,6 cB	43,7 cB	46,0 dB	35,7 dA	43,0 cB	39,9 dA	46,0 dB	46,0 dB	39,9 dA	46,0 dB

Fonte: o autor (2022).

¹*Colletotrichum nymphaeae*; ²*C. chrysophilum*; ³*C. siamense*; ⁴*C. melonis*; ⁵*C. limeticola*. 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. Biomassa e Sobrenadante: frações da bactéria *B. alcalophilus*; Duravel®: produto comercial à base de *B. alcalophilus*; Serenade®: produto comercial à base de *B. subtilis*; Delan®: produto comercial, ingrediente ativo ditianona.

FIGURA 6 – CRESIMENTO MICELIAL DE DIFERENTES ESPÉCIES DE *Colletotrichum* spp. EM MEIO DE CULTURA POR METODOLOGIA DE PAPEL DE FILTRO, TRATADOS COM OS PRODUTOS À BASE DE *Bacillus* spp. COMPARADOS COM O FUNGICIDA DELAN®.



Fonte: o autor (2022).

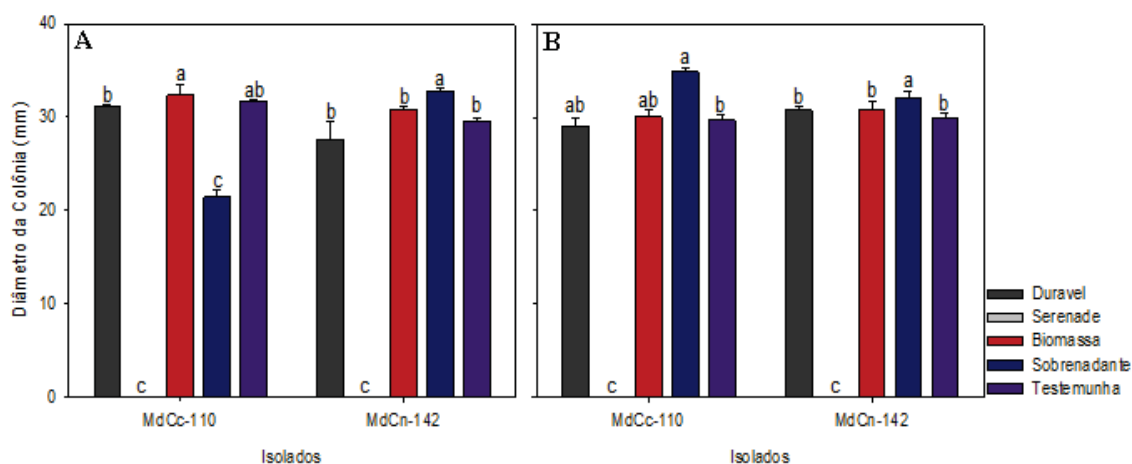
Biomassa e Sobrenadante: frações da bactéria *B. alcalophilus*; Duravel®: produto comercial à base de *B. alcalophilus*; Serenade®: produto comercial à base de *B. subtilis*; Delan®: produto comercial, ingrediente ativo ditianona;

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

Os resultados para o experimento que avaliou a presença de compostos termoestáveis antifúngicos no controle do crescimento micelial de *Colletotrichum* spp. podem ser observados no gráfico da Figura 7. Somente *Bacillus subtilis* (Serenade®) produziu esse tipo de composto inibindo completamente o crescimento micelial de *C. nymphaeae* (MdCn-142) e *C. chrysophilum* (MdCc-110). Para o tratamento *B. alcalophilus* na fração sobrenadante, *C. nymphaeae* e *C. chrysophilum*

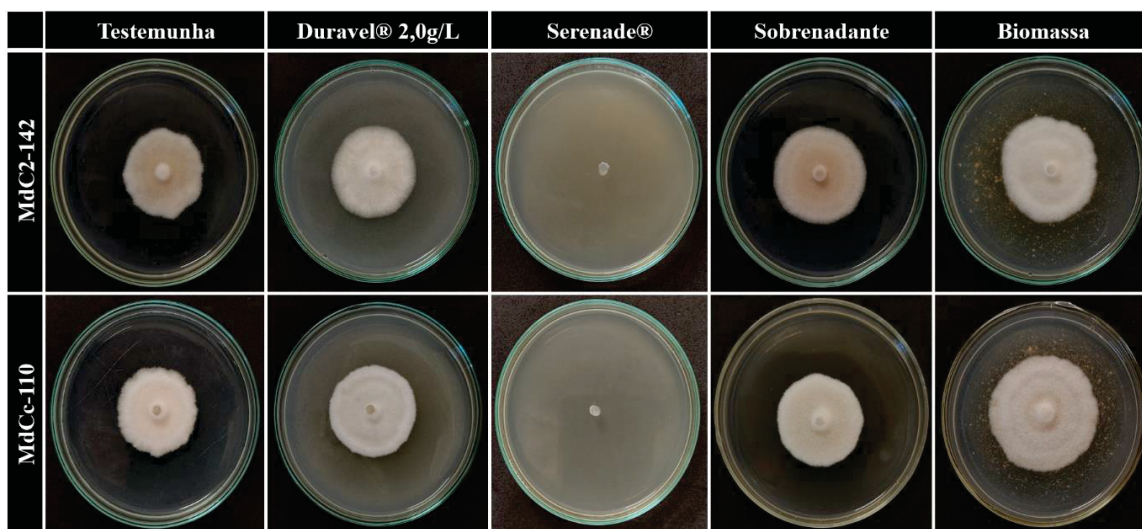
tiveram o seu crescimento micelial estimulado pela presença de termoestáveis produzidos pela bactéria (Figura 8).

FIGURA 7 – DIÂMETRO MÉDIO DA COLÔNIA (mm) DE *Colletotrichum nymphaeae* (MdCn-142) E *C. chrysophilum* (MdCc-110) CULTIVADO EM MEIO DE CULTURA CONTENDO METABÓLITOS TERMOESTÁVEIS DE ISOLADOS BACTERIANOS. A) PRIMEIRO EXPERIMENTO; B) SEGUNDO EXPERIMENTO.



Fonte: o autor (2022).

FIGURA 8 – CRESCIMENTO MICELIAL DE *Colletotrichum nymphaeae* (MdCn-142) E *C. chrysophilum* (MdCc-110) CULTIVADO EM MEIO DE CULTURA CONTENDO METABÓLITOS TERMOESTÁVEIS DE ISOLADOS BACTERIANOS.



Fonte: o autor (2022).

3.2 EXPERIMENTO *ex vivo*

3.2.1 Eficiência de produtos à base de *Bacillus* spp. no controle da podridão amarga em frutos de macieira destacados (*ex vivo*) por metodologia de suspensão de conídios

Na tabela 8, constam os resultados obtidos para período de incubação (PI) e período de latência (PL) de podridão amarga em frutos de macieira. Para isolados sensíveis à fungicida em mistura todos os tratamentos, exceto *B. alcalophilus* (Lemid), atrasaram o aparecimento dos sintomas de PA em frutos. Para os tratamentos Serenade® autoclavado e Delan® não foi determinado o período de incubação (PI), pois menos de 50% dos frutos apresentaram sintomas típicos de PA. Para isolados com sensibilidade reduzida à fungicida em mistura, os tratamentos que atrasaram o aparecimento dos sintomas foram: Duravel® 1,0g/L (13 dias), Serenade® autoclavado (16 dias), Serenade® (13 e 10 dias), CabrioTop® (13 dias) e Delan®. Para o fungicida Delan® não foi possível determinar o PI.

Para período latente (PL), o tratamento *B. alcalophilus* (Lemid), não se mostrou eficiente. O período latente dos isolados sensíveis em mistura foi determinado ao 16º dia e para os isolados menos sensíveis em mistura o PL foi determinado somente no segundo experimento, ao 16º dia.

A estimativa de risco relativo de expressar sintomas de PA e sinais de *Colletotrichum* spp., analisada pelo modelo semi-paramétrico de Cox, mostrou diferença entre os produtos utilizados em relação aos frutos sem controle (Tabela 9). Para os isolados com sensibilidade reduzida em mistura (MdCn-181 e MdCc-55PR), verificou-se que no primeiro experimento Duravel® 1,0g/L, Serenade® autoclavado e Delan® apresentaram 0,447, 0,496 e 0,217 vezes menor chance de expressar sintomas, respectivamente, em relação ao tratamento sem controle. No segundo experimento, os produtos Duravel® 0,5g/L, Serenade® autoclavado e Delan® apresentaram 0,576, 0,320 e 0,152 vezes menor chance de expressar sintomas de PA. Os produtos que tiveram menor chance de expressar sinais foram Duravel® 2,0g/L (0,209), Serenade® (0,321), Serenade® autoclavado (0,104), Delan® (0,157) e CabrioTop® (0,272).

Para isolados sensíveis em mistura (MdCn-142 e MdCc-110), os produtos que apresentaram menor chance de expressar sintomas de PA foram Duravel® 2,0g/L (0,514 e 0,507), Serenade® autoclavado (0,597 e 0,344), CabrioTop® (0,487 e 0,326) e Delan® (0,178 e 0,378) para o primeiro

e segundo experimento, respectivamente. Para o aparecimento de sinais, nenhum dos produtos teve menor chance de expressar sinais nos dois experimentos.

A bactéria *Bacillus alcalophilus* (Lemid) não se mostrou eficiente no controle de podridão amarga em frutos de macieira, tendo um desempenho inferior quando comparado aos frutos que não foram tratados.

Os frutos com sintomas típicos de PA podem ser observados na figura 9, para cada tratamento e mistura de isolado sensível ou com sensibilidade reduzida à fungicidas.

TABELA 8 – PERÍODO DE INCUBAÇÃO (PI) E PERÍODO LATENTE (PL) DE PODRIDÃO AMARGA CAUSADA POR *Colletotrichum* spp. COM DIFERENTES NÍVEIS DE SENSIBILIDADE À FUNGICIDA, TRATADOS COM *Bacillus* spp. E FUNGICIDA.

Isolado	Tratamentos	Experimento 1		Experimento 2	
		PI	PL	PI	PL
Isolados Sensíveis em mistura¹	Lemid	10	16	13	16
	Duravel® 0,5g/L	nd	nd	18	nd
	Duravel® 1,0g/L	nd	nd	18	nd
	Duravel® 2,0g/L	16	nd	18	nd
	Serenade® autoclavado	nd	nd	nd	nd
	Serenade®	16	nd	nd	nd
	CabrioTop®	18	nd	nd	nd
	Delan®	nd	nd	nd	nd
	Testemunha	10	18	13	nd
Isolados com Sensibilidade Reduzida em mistura²	Lemid	8	nd	8	16
	Duravel® 0,5g/L	8	nd	16	nd
	Duravel® 1,0g/L	13	nd	13	nd
	Duravel® 2,0g/L	8	nd	13	nd
	Serenade® autoclavado	16	nd	16	nd
	Serenade®	13	nd	10	nd
	CabrioTop®	13	nd	13	nd
	Delan®	nd	nd	nd	nd
	Testemunha	10	nd	8	nd

Fonte: o autor (2022).

¹Isolados com sensibilidade reduzida em mistura: MdCc-55PR: *C. chrysophilum* altamente resistente a tiofanato-metílico e MdCn-181: *C. nymphaeae* altamente resistente a tiofanato-metílico e pouco resistente a mancozebe; ²Isolados sensíveis em mistura: MdCc-110: *C. chrysophilum* e MdCn-142: *C. nymphaeae*; nd – não determinado, até o 18º dia de avaliação não foi observado sintoma ou sinal em 50% dos frutos avaliados.

Na Figura 10 constam as porcentagens de inibição dos tratamentos mais eficientes para o controle de *Colletotrichum* spp. dentro de cada experimento conduzido.

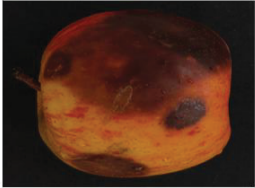
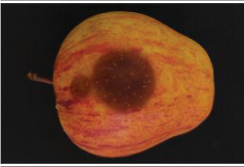
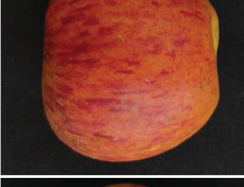
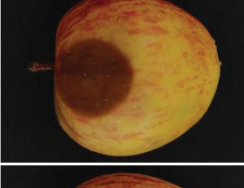
TABELA 9 – ESTIMATIVA DE RISCO RELATIVO PARA A EXPRESSÃO DE SINTOMAS DE PODRIDÃO AMARGA, CAUSADA POR *Colletotrichum* spp., ESTIMADAS PELO MODELO SEMI-PARAMÉTRICO DE COX, SEGUIDAS DOS INTERVALOS DE CONFIANÇA DE 95%.

Isolado	Tratamentos	Experimento 1 - Estimativa do Parâmetro					Experimento 2 - Estimativa do Parâmetro				
		Sintoma			Sinal		Sintoma			Sinal	
		Risco Relativo	IC 95%		Risco Relativo	IC 95%	Risco Relativo	IC 95%		Risco Relativo	IC 95%
			LI	LS				LI	LS		LS
Isolados com Sensibilidade Reduzida em mistura ¹	Testemunha	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Duravel® 0,5g/L	1,125	0,776	1,63	6,657*	1,489	0,576**	0,381	0,873	0,439	0,19
	Duravel® 1,0g/L	0,447***	0,283	0,704	0	0	0,706	0,473	1,055	0,446	0,193
	Duravel® 2,0g/L	1,105	0,761	1,603	5,532*	1,212	0,715	0,482	1,059	0,209**	0,07
	<i>Bacillus alcalophilus</i>	1,146	0,792	1,658	6,104*	1,353	1,097	0,766	1,572	1,407	0,747
	Serenade®	0,803	0,54	1,195	3,09	0,624	0,823	0,563	1,204	0,321*	0,127
	Serenade® Autoclavado	0,496**	0,317	0,777	2,054	0,376	0,32***	0,197	0,521	0,104**	0,024
	Delan®	0,217***	0,123	0,381	2,005	0,367	0,152***	0,081	0,285	0,157**	0,046
Isolados Sensíveis em mistura ²	CabrioTop®	0,803	0,537	1,201	1,0	0,141	0,677	0,452	1,014	0,272*	0,1
	Testemunha	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Duravel® 0,5g/L	0,24***	0,126	0,46	0,277**	0,118	0,929	0,547	1,576	2,11	0,903
	Duravel® 1,0g/L	0,276***	0,147	0,518	0,154***	0,053	0,611	0,338	1,104	1,888	0,792
	Duravel® 2,0g/L	0,514*	0,307	0,862	0,375*	0,172	0,507*	0,271	0,949	0,732	0,254
	<i>Bacillus alcalophilus</i>	1,022	0,659	1,585	0,88	0,473	1,798*	1,12	2,884	3,346**	1,496
	Serenade®	0,575*	0,348	0,95	0,619	0,315	0,648	0,365	1,151	1,516	0,62
	Serenade® Autoclavado	0,597*	0,367	0,971	0,409*	0,192	0,344**	0,171	0,69	0,483	0,146
	Delan®	0,178***	0,086	0,369	0,197**	0,074	0,378**	0,192	0,744	0,473	0,142
	CabrioTop®	0,487**	0,288	0,821	0,326**	0,144	0,494*	0,264	0,925	0,597	0,195

Fonte: o autor (2022).

Nível de significância: 0****; 0,001***; 0,01**; 0,05*; 0,1. 1Isolados com sensibilidade reduzida em mistura: MdCc-55PR; *C. chrysophilum* altamente resistente a tiofanato-metílico e MdCn-181; *C. nymphaeae* altamente resistente a tiofanato-metílico e pouco resistente a mancozebe; 2Isolados Sensíveis em mistura: MdCc-110; *C. chrysophilum* e MdCn-142; *C. nymphaeae*; PI – Período de Incubação; PL – Período de Latência; IC – Intervalo de Confiança; IC – Intervalo de confiança de 95%. LI e LS correspondem aos limites inferior e superior do intervalo de confiança para o risco relativo. (-) Não se aplica.

FIGURA 9 – SNTOMAS DE PODRIDÃO AMARGA EM FRUTOS DA CULTIVAR 'GALA' AOS 12 DIAS APÓS INOCULAÇÃO, TRATADOS COM PRODUTOS À BASE DE *Bacillus* spp. E OS FUNGICIDAS COM INGREDIENTE ATIVO DITIANONA (DELAN®) E PIRACLOSTROBINA+METIRAM (CABRIOTOP®) E INOCULADOS COM SUSPENSÃO DE CONÍDIOS DE *Colletotrichum chrysophilum* e *C. nymphaeae* EM MISTURA COM DIFERENTES NÍVEIS DE SENSIBILIDADE À FUNGICIDA.

Isolados com sensibilidade reduzida em mistura								
<i>B. alcalophilus</i> (Lemid)	Serenade®	Serenade® autoclavado	Duravel® 0,5g/L	Duravel® 1,0g/L	Duravel® 2,0g/L	Delan®	CabrioTop®	Testemunha
								
Isolados sensíveis em mistura								
<i>B. alcalophilus</i> (Lemid)	Serenade®	Serenade® autoclavado	Duravel® 0,5g/L	Duravel® 1,0g/L	Duravel® 2,0g/L	Delan®	CabrioTop®	Testemunha
								

Fonte: o autor (2022).

Isolados com sensibilidade reduzida em mistura: MdCc-55PR: *C. chrysophilum* altamente resistente a tiofanato-metílico; MdCn-142: *C. nymphaeae* pouco resistente a mancozebe; Isolados Sensíveis em mistura: MdCc-110: *C. chrysophilum*; MdCn-181 -*C. nymphaeae* altamente resistente a tiofanato-metílico e pouco resistente a mancozebe;

FIGURA 10 – PORCENTAGEM DE CONTROLE DOS PRINCIPAIS RESULTADOS OBTIDOS NA CONDUÇÃO DESSE TRABALHO VISANDO O CONTROLE DE DIFERENTES ESPÉCIES DE *Colletotrichum* spp. COM DIFERENTES NÍVEIS DE SENSIBILIDADE À FUNGICIDAS, UTILIZANDO PRODUTOS À BASE DE *Bacillus* spp. E OS PRODUTOS QUÍMICOS DELAN® E CABRIOTOP®.

Porcentagem de inibição para os melhores tratamentos dentro de cada experimento			
 Frações e Cultivo - <i>B. alcalophilus</i> Crescimento Micelial Germinação de Conídios 24h Biomassa Primeiro experimento Inibiu 100% o crescimento micelial MdCn-CA32M MdCc-Col33 Segundo experimento Inibiu 100% o crescimento micelial MdCn-CA32M MdCc-Col33 Todos os isolados		 Frações e Cultivo - <i>B. alcalophilus</i> Crescimento Micelial 24h Sobrenadante MdCn-CA32M 17,2 e 18,7% MdCc-Col133 7,1 e 15,6% MdCn-Col179 12,3 e 13,6% MdCc-Col134 14,7 e 17,6%	
 Germinação de Conídios de <i>Colletotrichum</i> spp. MdCc-55PR Primeiro experimento Duravel® 0,5g/L - 64,0% Segundo experimento Duravel® 1,0g/L - 61,0% Duravel® 2,0g/L - 62,3% CabrioTop® - 98,1 à 100%		 Diferentes concentrações <i>B. amyloliquefaciens</i> (Duravel®) Crescimento Micelial MdCn-142 Duravel® 0,5g/L 14,5 e 34,0% Duravel® 1,0g/L 23,4 e 36,0% Duravel® 2,0g/L 27,6 e 33,8% MdCc-110 40,0 e 47,1% 40,4 e 47,8% 37,6 e 47,7%	
 Crescimento micelial em meio de cultura fundente Biomassa - 60 à 100% Sobrenadante - 42,5 à 75% Duravel® - 68 à 100% Serenade® - 68,8 à 100% CabrioTop® - 61 à 100% Delan® - 47 à 74%		 Termoestabilidade de <i>Bacillus</i> spp. Crescimento Micelial Serenade® - Inibiu em 100% o crescimento micelial MdCc-110 e MdCn-142	
 Diferentes espécies de <i>Colletotrichum</i> spp. Crescimento Micelial Primeiro experimento Serenade® - 57,1 à 64% Duravel® - 58,2 à 66,3% Segundo experimento Serenade® - 49,7 à 62,1% Duravel® - 48,9 à 62,6%		 Diferentes concentrações <i>B. alcalophilus</i> (Lemid) Crescimento Micelial Primeiro experimento MdCn-142 Sobrenadante 0,5g/L - 55,4% MdCc-110 Biomassa 0,25g/L - 43,9% Segundo experimento MdCn-142 Sobrenadante 0,5g/L - 42,8% MdCc-110 Biomassa 1,0g/L - 30,5%	
 Frutos sem ferimentos com suspensão (ex vivo) Produtos com menor risco relativo de expressar sintomas de Podridão Amarga MdCn-181 e MdCc-55PR Duravel® 0,5g/L Duravel® 1,0g/L Serenade® autoclavado Delan® MdCn-142 e MdCc-110 Duravel® 2,0g/L Serenade® autoclavado CabrioTop® Delan®		 Diferentes espécies de <i>Colletotrichum</i> spp. Crescimento Micelial Primeiro experimento Serenade® - 57,1 à 64% Duravel® - 58,2 à 66,3% Segundo experimento Serenade® - 49,7 à 62,1% Duravel® - 48,9 à 62,6%	

Fonte: o autor (2022).

MdCn-CA32M-*Colletotrichum nymphaeae* sensível a mancozebe; MdCc-Col33-*C. chrysophilum* sensível a mancozebe; MdCn-179-*C. nymphaeae* com sensibilidade reduzida a mancozebe e tiofanato-metílico; MdCc-134C. *chrysophilum* com sensibilidade reduzida a mancozebe. MdCn-142 - *Colletotrichum nymphaeae* pouco resistente a mancozebe; MdCc-110 - *C. chrysophilum*; MdCn-181 - *Colletotrichum nymphaeae* altamente resistente a tiofanato-metílico e pouco resistente a mancozebe; MdCc-55PR - *C. chrysophilum* altamente resistente a tiofanato-metílico; 24h Biomassa-Fração sobrenadante da bactéria *Bacillus alcalophilus* cultivada por 24 horas; 24h Sobrenadante-Fração sobrenadante da bactéria *B. alcalophilus* cultivada por 24 horas; Biomassa e Sobrenadante-frações da bactéria *B. alcalophilus*; Duravel®-produto comercial à base de *B. alcalophilus*; Serenade®-produto comercial à base de *B. subtilis*; Delan®-produto comercial, ingrediente ativo ditianona; CabrioTop®-produto comercial, ingredientes ativos metiram e piraclostrobina.

4. DISCUSSÃO

O potencial de diferentes espécies de *Bacillus* spp. vem sendo explorado pela indústria de biológicos no controle biológico de doenças em plantas. Nos experimentos conduzidos nesse trabalho, a bactéria *Bacillus alcalophilus* cultivada por 24 horas mostrou-se promissora no controle *in vitro* de diferentes espécies de *Colletotrichum* associadas tanto à MFG, como à PA. Para as espécies testadas de *C. nymphaeae* e *C. chrysophilum* foi observado inibição na germinação de conídios na fração biomassa e redução no crescimento micelial na fração sobrenadante, formando halos de inibição entre o crescimento fúngico. Seguindo a hipótese de que quanto menor a colônia, menor o número de conídios germinados, o tratamento 24 horas biomassa teve potencial de inibir a germinação de conídios de *Colletotrichum* spp. Em teste com produtos incorporados ao meio de cultura fundente, as frações biomassa e sobrenadante foram eficientes e reduziram o crescimento micelial de *C. nymphaeae* e *C. chrysophilum* sensíveis e com sensibilidade reduzida à fungicidas.

Na literatura são poucos os trabalhos utilizando *B. alcalophilus* no controle biológico de doenças em plantas, assim como a eficiência das frações. Para outras espécies, como *B. subtilis*, as frações biomassa e sobrenadante apresentaram atividades antagônicas sob o desenvolvimento de patógenos, e inibiram o crescimento micelial de fungos de importância para a produção agrícola, como *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum acutatum*, *Colletotrichum coccodes*, *Diaporthe citri*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium digitatum* e *P. expansum* (KIM; LEE; CHAE, 2015). A fração sobrenadante de 15 isolados de *Bacillus*, distribuídos entre *B. subtilis*, *B. methylotrophicus* e *Bacillus* sp., reduziram o crescimento micelial de *Phyllosticta citricarpa*, agente causal da pinta preta no citros em mais de 60% (KUPPER; MORETTO; FUJIMOTO, 2020). Não foi observado efeito satisfatório nas frações biomassa e sobrenadante de *B. alcalophilus* para a variável número de conídios germinados de *Colletotrichum* spp. Em contraponto, Moreira et al. (2014) verificaram baixa porcentagem de controle na germinação de conídios (22,5%) de *Colletotrichum* do complexo *acutatum*, quando utilizada essa bactéria sem separação das frações.

Na fração sobrenadante para os isolados MdCn-181 e MdCc-55PR (isolados menos sensíveis), com porcentagem de germinação de 35,7 e 51,2%, respectivamente, não houve formação de colônia no meio de cultura após depositar a suspensão de conídios que ficou em contato com o sobrenadante por 12 horas. Kupper et al. (2007) ao filtrarem o cultivo de *Bacillus* spp. obtiveram 47,51% de conídios germinados de *C. acutatum*, isolado de morangueiro, que quando plaqueados

também não formaram colônia. Estes resultados, juntamente com os deste trabalho, indicam que a bactéria pode não inibir inicialmente a germinação de conídios, mas logo após interrompe o desenvolvimento das hifas e devido a isso, não se observa crescimento de colônias.

Um outro resultado interessante observado nesse estudo foi que o melhor efeito de controle do *Bacillus* sp. foi obtido contra isolados com sensibilidade reduzida à fungicidas (MdCc-55PR e MdCn-181). Uma hipótese para este resultado seria relacionada com a perda de adaptabilidade desses isolados, fazendo com que o controle atue de forma mais eficiente nesses isolados do que em isolados sensíveis. Para confirmar essa hipótese, novos experimentos devem ser conduzidos.

Bacillus spp. pode atuar no controle biológico de doença por meio de diferentes mecanismos, sendo por competição de espaço e nutrientes, indução de resistência da planta, produção de sideróforos e ação por antibiose (THOMASHOW e WELLER, 1996). A antibiose é a principal forma de ação dos microrganismos utilizados no controle biológico, onde um metabólito produzido por um deles tem efeito prejudicial sobre o outro, havendo ou não contato físico entre microrganismos (JUNIOR et al., 2017). Isso foi observado com a utilização da fração sobrenadante de *B. alcalophilus*, em que mesmo sem a presença das células bacterianas, os metabólitos produzidos pela bactéria foram eficientes, e indicam um possível potencial de controle de *Colletotrichum* spp.

Os produtos biológicos comerciais *B. subtilis* (Serenade®) e *B. amyloliquefaciens* (Duravel®) reduziram o crescimento micelial de *Colletotrichum* spp. em meio de cultura fundente e papel filtro e impediram a formação de colônia de *Colletotrichum* spp. no plaqueamento da suspensão de conídios. *B. amyloliquefaciens* HG01 apresentou forte efeito inibitório no crescimento micelial de *C. acutatum* com taxa de inibição de 58,9% pela metodologia de papel filtro, criando um halo de inibição entre o crescimento micelial do fungo e o efeito da bactéria (WANG et al., 2020). Em menores concentrações Duravel® inibiu a germinação de conídios de *C. chrysophilum* (MdCc-55PR) menos sensível a tiofanato-metílico. Wu et al. (2021) verificaram a eficiência de duas cepas de *B. amyloliquefaciens* na fração sobrenadante na germinação de conídios de *C. gloeosporioides*, PM04 e PM05, a taxa de germinação foi de 0,6% e 96,3% de conídios germinados, respectivamente.

Para Serenade®, a principal forma de controle foi a produção de compostos termoestáveis, a qual inibiu completamente o crescimento micelial de *C. nymphaeae* e *C. chrysophilum*. O mesmo foi observado *in vitro* por Moreira et al. (2014), em que Serenade® produziu compostos termoestáveis e inibiu completamente o crescimento micelial de *Colletotrichum* sp. do complexo *acutatum*, agente causal da macha foliar de *Glomerella* em macieira. Corroborando estes resultados,

Kupper et al. (2003) avaliaram o efeito termoe estável de 53 isolados de *B. subtilis* obtidos de flores e folhas de plantas cítricas, 52 destes isolados produziram compostos termoe estáveis e inibiram o crescimento micelial de *C. acutatum*, agente causal da queda prematura do citros. Isso indica que os metabólitos produzidos *B. subtilis*, mesmo quando submetidos à altas temperaturas, possuem potencial antifúngico, tornando-se um organismo de interesse para estudos de controle biológico em diferentes condições ambientais. A produção de compostos termoe estáveis antifúngicos não foi observada para *B. alcalophilus* e *B. amyloliquefaciens*, verificado pela não redução no crescimento micelial de *Colletotrichum* spp. nessas condições. Portanto, diferentes espécies de *Bacillus* spp. podem produzir metabólitos com modos de ação específicos.

No experimento de controle em frutos, a análise de risco relativo mostrou que os produtos biológicos *B. amyloliquefaciens* (Duravel®) e *B. subtilis* (Serenade®) autoclavado apresentaram menor risco de expressar sintomas em relação à frutos sem controle (testemunha). Porém, para *B. amyloliquefaciens* foi observado variação entre as concentrações utilizadas entre experimentos e isolados, sendo necessário um ajuste nas concentrações a fim de se obter uma eficiência constante no controle. Lyousfi et al. (2022) observaram redução de 73,4% na severidade de podridão parda de frutos de pessegueiro causada por *Monilinia fructigena* após tratados com *B. amyloliquefaciens*. Frutos de nêspera tratados com o lipopeptídeo isolado iturina A, extraído de *B. amyloliquefaciens*, inibiu de forma eficaz a infecção de *C. gloeosporioides* em frutos e reduziu o diâmetro das lesões após a infecção, indicando que o lipopeptídeo iturina A pode ser o componente ativo de *B. amyloliquefaciens* que atua no controle (YAN et al., 2020). Em frutos de morango tratados com *B. amyloliquefaciens* PMB04 e inoculados com *C. gloeosporioides*, agente causal da antracnose no morango, foi observada eficácia no controle da doença superior a 56,7% (WU et al., 2021). Ye et al., (2021) observaram que a biomassa de *B. amyloliquefaciens* cepa B4 para controle de *Penicillium expansum*, agente causal do bolor azul, reduziu a incidência da doença em frutos de maçã (33,33%), pera cristal (22,23%) e tomate cereja (15%). Os autores indicaram que a própria bactéria atua no controle de *P. expansum* em vez de seus metabólitos produzidos.

A eficiência da bactéria *B. subtilis* e dos seus metabólitos vem sendo comprovada como forma de controle biológico de *Colletotrichum* spp. em frutos em pós-colheita. A redução na incidência de doenças causadas por *C. acutatum* com o uso dessa bactéria foi observado em maçã (78-83%), nectarina (78-83%), pêssego (78-83%) (LEE et al., 2012) e tomate arbóreo (76%) (ARROYAVE-TORO; MOSQUERA; VILLEGAS-ESCOBAR, 2017). Para *C. gloeosporioides*, a

redução na incidência de doenças causada por essa espécie foi observada em maçã (80%) (RODRÍGUEZ-CHÁVEZ et al., 2019) e manga (80%) (REYES-ESTEBANEZ et al., 2020). Na literatura, não constam estudos utilizando *B. subtilis* autoclavado para o controle de doenças em frutos, somente sua eficiência *in vitro*. Os resultados obtidos no presente trabalho, em que *B. subtilis* (Serenade®) após o processo de autoclavagem apresentou menor risco de expressar sintomas da doença, indicam um potencial de pesquisa.

B. alcalophilus mostrou-se promissor para o controle de *C. nymphaeae* e *C. chrysophilum* em experimentos *in vitro*, mesmo em baixa concentração de unidades formadoras de colônias ($2,5 \times 10^5$ UFC/ml), comparado aos produtos já disponíveis no mercado, como Serenade® (1×10^9 UFC/g) e Duravel® ($5,5 \times 10^{10}$ esporos viáveis/ml). A composição final do produto Lemid era composta pelo cultivo sem a separação das frações biomassa e sobrenadante, o óleo mineral e o meio de cultura para o cultivo da bactéria. Esse meio de cultura rico em nutrientes, que permaneceu no produto, pode ter estimulado o desenvolvimento de *Colletotrichum* spp., e ocasionado os resultados não satisfatórios no controle. Recomenda-se realizar novos experimentos com objetivo de ajustar as UFCs e melhorar a eficiência do cultivo. O próximo passo será identificar as substâncias responsáveis por inibir *Colletotrichum* spp., sendo importante entender o mecanismo de ação de *B. alcalophilus*, possibilitando o controle da doença pelo uso das substâncias produzidas e, não apenas pela introdução massal do agente de biocontrole.

B. amyloliquefaciens (Duravel®) é um produto comercial, registrado pra o controle de *Cryptosporiopsis perennans*, *Botrytis squamosa*, *Phyllosticta citricarpa*, *Xanthomonas campestris*, *B. cinerea*, *Pythium ultimum* e *Rhizoctonia solani*. Esse produto não possui registro para *Colletotrichum* spp, porém os resultados obtidos nesse trabalho mostraram-se promissores para o controle de *Colletotrichum* spp. e da podridão amarga em frutos. Novos estudos devem ser realizados para comprovar a eficiência também em mancha foliar de *Glomerella* em macieira e, melhorar a eficiência para controle de podridão amarga, testando seu efeito em condições de menor pressão de inóculo.

O fungicida Delan® mostrou-se eficiente na redução do risco de expressar sintomas de podridão amarga em frutos de macieira, porém sua aplicação deve ser realizada e no mínimo 21 dias antes da colheita do fruto, devido ao intervalo de segurança entre a aplicação e a colheita. Ditianona ingrediente ativo do produto comercial Delan®, em 500ppm *in vitro* inibe o crescimento micelial de *C. aenigma*, *C. fructicola* e *C. gloeosporioides* em aproximadamente 80% e o crescimento de *C.*

fiorinae e *C. nymphaeae* em cerca de 60%, agentes causais da antracnose em mirtilo (CHO et al., 2021). Para Goji berry (*Lycium barbarum*) com aplicações no campo, ditianona controlou em 90% a antracnose causado por *Colletotrichum* spp. (KOO, 2008). Para *Venturia inaequalis* agente causal da sarna da macieira, a aplicação de Delan® em plantas da cultivar ‘Gala’ em ambiente protegido e precipitação artificial de 60mm após 24 horas, promoveu o controle de 52% quando comparado com a testemunha (ARAÚJO et al., 2019).

O estudo com objetivo de avaliar a interação entre os produtos utilizados, biológicos e químicos, não foi o alvo desse trabalho, mas o uso em associação pode possibilitar uma interação positiva quando comparado ao método isolado de cada produto, obtendo efeito aditivos ou sinérgicos.

5. CONCLUSÕES

- i) O cultivo de 24 horas na fração biomassa reduz a germinação de conídios e a fração sobrenadante reduz o crescimento micelial de *Colletotrichum nymphaeae* e *C. chrysophilum*;
- ii) *B. alcalophilus* (Lemid), *B. amyloliquefaciens* (Duravel®) e *B. subtilis* (Serenade®) reduzem o crescimento micelial de *C. melonis*, *C. limeticola*, *C. siamense*, *C. nymphaeae* e *C. chrysophilum*;
- iii) O produto comercial CabrioTop® reduz a germinação de conídios de *Colletotrichum* spp. em mais de 98,2% e o produto biológico Duravel® 0,5g/L pode inibir em até 64,4% a germinação de conídios de *C. chrysophilum* com sensibilidade reduzida a tiofanato-metílico (MdCc-55PR);
- iv) Conídios de *Colletotrichum* spp. germinam quando em contato com *B. amyloliquefaciens* (Duravel®) e *B. subtilis* (Serenade®), mas não formam colônia quando plaqueados em meio de cultura;
- v) O produto comercial Serenade® à base de *Bacillus subtilis*, produz metabólitos termoestáveis capazes de inibir o crescimento micelial de *Colletotrichum* spp. em 100%;
- vi) *B. alcalophilus* (Duravel®), *B. subtilis* (Serenade®) autoclavado e o fungicida Delan®, possuem menores chances de expressar sintomas de podridão amarga causada por *Colletotrichum* spp., em relação à frutos não tratados.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base no exposto, o uso de produtos biológicos à base de *Bacillus*, pode ser uma alternativa para o manejo integrado de *Colletotrichum* spp. na cultura da macieira. A introdução dos produtos para controle pode ser realizada em associação com produtos químicos em baixa pressão de inoculo na área, em períodos como a floração visando reduzir impactos contra o agente polinizador, em área com histórico de populações com sensibilidade reduzida à fungicidas e na pré e pós-colheita para evitar resíduos de produtos químicos em frutos.

Bacillus amyloliquefaciens (Duravel®) na concentração de 1,0g/L mostrou-se promissor nos experimentos *in vitro* e em frutos destacados (*ex vivo*) em alta pressão de inoculo. Posicionar o

produto em pós-colheita pode ser uma alternativa para o controle de podridão amarga em frutos, porém seu registro ainda não é liberado para *Colletotrichum* spp.

B. subtilis (Serenade®) nas concentrações indicadas na bula, também se mostrou promissor, principalmente em condições adversas, como de alta temperatura. Assim como o Duravel®, posicionar o produto em pós-colheita pode ser uma alternativa para o controle de podridão amarga.

Delan® e CabrioTop® mostraram-se eficientes para controle de *Colletotrichum* spp. e podridão amarga, sendo que a aplicação dos produtos pode ser realizada desde a brotação da cultura até 21 dias antes da colheita, sendo uma alternativa para evitar a infecção de *Colletotrichum* spp. nos pomares.

7. REFERÊNCIAS

- ABPM, Associação Brasileira de Produtores de Maçã. **Anuário Brasileiro de Maçã 2019**. 2019. Disponível em: <https://www.abpm.org.br/maca-e-tudo-de-bom/anuario-brasileiro-da-maca-2019>. Acesso em: 10 jan. 2022.
- ADASKAVEG, J. E.; HARTIN, R. J. Characterization of *Colletotrichum acutatum* isolates causing anthracnose of almond and peach in California. **Phytopathology**, v. 87, n. 9, p. 979–987, 1997.
- ALIJANI, Z. et al. Biocontrol of strawberry anthracnose disease caused by *Colletotrichum nymphaeae* using *Bacillus atrophaeus* strain DM6120 with multiple mechanisms. **Tropical Plant Pathology**, v. 47, n. 2, p. 245–259, 2022.
- AMARAL CARNEIRO, G.; STORTI, A.; BARIC, S. First report of *Colletotrichum salicis* causing bitter rot of apple in Italy. **Plant Disease**, v. 105, n. 1, p. 224, 2021.
- ANDREWS, J. H. Biological control in the phyllosphere. **Annual Review of Phytopathology**, v.30, p.603-635, 1992.
- ANGELO, E. A.; VILAS-BÔAS, G. T.; CASTRO-GÓMEZ, R. J. H. *Bacillus thuringiensis*: Características gerais e fermentação. **Semina:Ciencias Agrarias**, v. 31, n. 4, p. 945–958, 2010.
- ANNOUS, B. A.; FRATAMICO, P. M.; SMITH, J. L. Scientific status summary: Quorum sensing in biofilms: Why bacteria behave the way they do. **Journal of Food Science**, v. 74, n. 1, 2009.
- ARAÚJO, L. et al. Resistência dos fungicidas ditianona, fluazinam e clorotalonil à lavagem pela precipitação no controle de Sarna da Macieira. In: FRUSUL: SIMPÓSIO DE FRUTICULTURA DA REGIÃO SUL, 2., 2019, Chapecó. **Anais [...]**. Chapecó: Frusul, 2019. v. 2, p. 1-1. Disponível em: <https://portaleventos.uffs.edu.br/index.php/FRUSUL/article/view/10740>. Acesso em: 17 out. 2022.
- ARAÚJO, L. et al. Doenças da Macieira e Pereira. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 37, n. 290, p. 61-74, 2016. ARAÚJO, L. et al. Fosfito de potássio e ulvana no controle da mancha foliar da gala em macieira. **Tropical Plant Pathology**, [S.L.], v. 33, n. 2, p. 148-152, abr. 2008.
- ARAÚJO, L. et al. Podridão amarga e Mancha Foliar de *Glomerella* em macieira: etiologia e manejo.

VII Simpósio Internacional de Fruticultura Temperada em região subtropical, n. October 2018, 2017.

ARAÚJO, L.; GONÇALVES, A. E.; STADNIK, M. J. Ulvan effect on conidial germination and appressoria formation of *Colletotrichum gloeosporioides*. **Phytoparasitica**, [S.L.], v. 42, n. 5, p. 631-640, 24 abr. 2014. Springer Science and Business Media LLC.

ARAÚJO, L.; VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M.; STADNIK, M. J. Avaliação de formulações de fosfito de potássio sobre *Colletotrichum gloeosporioides in vitro* e no controle pós-infeccional da mancha foliar de *Glomerella* em macieira. **Tropical Plant Pathology**, v. 35, n. 1, p. 054–059, 2010.

ARIMA, K.; KAKINUMA, A.; TAMURA, G. Surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: Isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 31, n. 3, p. 488–494, 1968.

ARREBOLA, E.; JACOBS, R.; KORSTEN, L. Iturin A is the principal inhibitor in the biocontrol activity of *Bacillus amyloliquefaciens* PPCB004 against postharvest fungal pathogens. **Journal of Applied Microbiology**, v. 108, n. 2, p. 386–395, 2010.

ARROYAVE-TORO, J. J.; MOSQUERA, S.; VILLEGAS-ESCOBAR, V. Biocontrol activity of *Bacillus subtilis* EA-CB0015 cells and lipopeptides against postharvest fungal pathogens. **Biological Control**, v. 114, n. 7, p. 195–200, 2017.

ASTOLFI, P. et al. Reclassification of the Main Causal Agent of *Glomerella* Leaf Spot on Apple into *Colletotrichum chrysophilum* in Southern Brazil and Uruguay. **Phytopathology®**, [S.L.], v. 112, n. 9, p. 1825-1832, set. 2022. Scientific Societies. <http://dx.doi.org/10.1094/phyto-12-21-0527-sc>.

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. **Biotecnologia: Avanços na Agricultura e na Indústria**. Editora Universidade de Caxias do Sul: Caxias do Sul, 2002. p.233-265.

BEAUREGARD, P. B. et al. *Bacillus subtilis* biofilm induction by plant polysaccharides. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n.

17, p. 1621–1630, 2013.

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.

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.

BONETI, J.I. da S.; RIBEIRO, L.G.; KATSURAYAMA, Y. Manual de identificação de doenças e pragas da macieira. Florianópolis: **Epagri**, 1999. 149p.

BROOK, P. J. *Glomerella cingulata* and bitter rot of apple. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, v. 20, n. 4, p. 547–555, 1977.

CALVO, H. et al. The role of iturin A from *B. amyloliquefaciens* BUZ-14 in the inhibition of the most common postharvest fruit rots. **Food Microbiology**, v. 82, n. December 2018, p. 62–69, 2019.

CAMARGO, L. E. A. Controle Genético. In: AMORIM, L. et al. **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. 5. ed. Ouro Fino: Agronômica Ceres, 2018. Cap. 15. p. 229-238.

CAMILO, A.P.; DENARDI, F. Cultivares: descrição e comportamento no sul do Brasil. In: **EPAGRI. A cultura da macieira**. Florianópolis: Epagri, p.113-168, 2002.

CARMONA-HERNANDEZ, S. et al. Biocontrol of postharvest fruit fungal diseases by bacterial antagonists: A review. **Agronomy**, v. 9, n. 3, 2019.

CAROLINE, A. et al. Atividade de células , filtrado e autoclavado de *Bacillus* spp . como bioagentes de controle de *Colletotrichum acutatum* biological control agents of *Colletotrichum acutatum*. p. 196–200, 2007.

CARRARO, T. DE A. et al. Etiology and epidemiology of diseases caused by *Colletotrichum* spp. in persimmon, apple, peach, and grapevine. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, n. March, p. 136–162, 2022.

CASTELLAR, C. **Estudos epidemiológicos visando a avaliação e o controle de manchas foliares de macieira**. 2019. 95 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Agronomia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2019.

- CHEN, X. et al. Isolation and characterization of *Bacillus amyloliquefaciens* PG12 for the biological control of apple ring rot. **Postharvest Biology and Technology**, v. 115, p. 113–121, 2016.
- CHEN, Y. et al. Biocontrol of tomato wilt disease by *Bacillus subtilis* isolates from natural environments depends on conserved genes mediating biofilm formation. **Environmental Microbiology**, v. 15, n. 3, p. 848–864, 2013.
- CHEN, Y. et al. Diversity of *Colletotrichum* Species Causing Apple Bitter Rot and Glomerella Leaf Spot in China. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 7, 2022.
- CHO, K. M. et al. Iturin produced by *Bacillus pumilus* HY1 from Korean soybean sauce (kanjang) inhibits growth of aflatoxin producing fungi. **Food Control**, v. 20, n. 4, p. 402–406, 2009.
- CHO, B. et al. *Colletotrichum* spp . Agents of Anthracnose on Blueberry Leaves in Gangwon Province, Korea. **Journal of Florest and Eviromental Science**, v. 37, n. 2, p. 154–162, 2021.
- COOK, R. J.; BAKER, K. F. The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens. Saint Paul. **APS Press**; 1983.
- COZZOLINO, M. E. et al. Control of postharvest fungal pathogens in pome fruits by lipopeptides from a *Bacillus* sp. isolate SL-6. **Scientia Horticulturae**, v. 261, n. October 2019, p. 108957, 2020.
- CRUSIUS, L. U. et al. Epidemiology of apple leaf spot. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, n. 1, p. 65–70, 2002.
- DELEU, M.; PAQUOT, M.; NYLANDER, T. Fengycin interaction with lipid monolayers at the air-aqueous interface -implications for the effect of fengycin on biological membranes. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 283, p. 358–365, 2005.
- DENARDI, F.; BERTON, O.; SPENGLER, M. M. Resistência genética à podridão amarga em maçãs, determinada pela taxa de desenvolvimento da doença em frutos com e sem fermentos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 25, n. 3, p. 494–497, 2003.
- DENARDI, F.; KVITSCHAL, M. V.; HAWERROTH, M. C. A brief history of the forty-five years of the epagri apple breeding program in Brazil. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 19, n. 3, p. 347–355, 2019.
- DEBODE, J. et al. Chitin mixed in potting soil alters lettuce growth, the survival of zoonotic bacteria

- on the leaves and associated rhizosphere microbiology. **Frontiers in Microbiology**, v.7, 2016.
- FACHINELLO, J. C. et al. Situação e perspectivas da fruticultura de clima temperado no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. esp., p. 109-120, 2011.
- FAORO, I.D. (Org.) **Maçãs do grupo 'Gala' no Brasil**. Florianópolis: Epagri, 2022. 304p.
- FAORO, I. D. et al. SC441 **Gala Gui: Novo cultivar dde macieira do grupo 'Gala' com resistência à mancha foliar de Glomerella e frutos vermelhos rajados**. Caçador/SC, 2019, p.2.
- FIRA, D. et al. Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. **Journal of Biotechnology**, v. 285, p. 44–55, 2018.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). FAOSTAT, 2022. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>. Acesso em: 11 junho 2022.
- GELAIN, J. **Apple diseases in Southern Brazil**: monocycle and quiescent infections of *Neonectria* fruit rot and fungicide sensitivity of *Colletotrichum* spp. from apple flowers and fruitlets. 2021. 115 f. Tese (Doutorado) - Curso de Agronomia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2021.
- GELAIN, J.; HAMADA, N. A.; DE MIO, L. L. M. Survival of pathogens after dormancy in apple tree twigs indicates potential risk as source of inoculum. **Acta Scientiarum - Agronomy**, v. 44, p. 1–11, 2022.
- GORDON, R. E.; HAYNES, W.; PANG, C. H.-N. **The Genus *Bacillus***. Washington: Agricultural Research Service, 1973. 283 p.
- HAMADA, N. A. et al. Fungicidas associados ou não a fosfitos no controle da mancha foliar de glomerela em macieira. **Revista Brasileira de Ciencias Agrarias**, v. 7, n. SUPPL, p. 831–837, 2012.
- HAMADA, N. A. Epidemiologia Da Mancha Foliar De Glomerella Em Macieira. p. 117, 2013.
- HAMADA, N. A. et al. Pathogen dispersal and Glomerella leaf spot progress within apple canopy in Brazil. **Plant Disease**, v. 103, n. 12, p. 3209–3217, 2019.
- HAMADA, N. A. et al. *Colletotrichum acutatum* complex isolated from apple flowers can cause bitter rot and glomerella leaf spot. **Bragantia**, v. 79, n. 3, p. 399–406, 2020.
- HAMADA, N. A.; MAY DE MIO, L. L. Survival of pathogenic *Colletotrichum* isolates on dormant

buds, twigs and fallen leaves of apple trees in commercial orchards. **Fruits**, v. 72, n. 3, p. 158–165, 2017.

HAWERROTH, F. J.; PETRI, J. L. Crescimento vegetativo de macieiras 'Fuji Suprema' sob influência da época de aplicação de proexadione cálcio. **Revista Brasileira de Fruticultura**, [S.L.], v. 36, n. 2, p. 373-380, jun. 2014. FapUNIFESP (SciELO).

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Levantamento sistemático da produção agrícola. Rio de Janeiro, v. 25, n. 2, p. 1-88, 2022. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_201202.pdf Acesso em 23 de junho de 2022.

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-permanente2011>. Acesso em 20 de junho de 2022.

JUNIOR, G. M. B. et al. Controle biológico de fitopatógenos por *Bacillus subtilis in vitro*. **Biota Amazônia**, v. 7, n. 3, p. 45–51, 2017.

KATSURAYAMA, Y.; BONETI, J. I. da S. Manejo da Mancha da Gala. **Agropecuaria Catarinense**, v.25, n.2, pp. 45 - 51, 2012.

KATSURAYAMA, Y.; BONETI, J.I. da S. Mancha da Gala. In: **Encontro nacional sobre fruticultura de clima temperado**, 11. 2009, Fraiburgo, SC. Anais [...] Caçador: Epagri, vol. I (Palestras), 2009. p.79-98.

KATSURAYAMA, Y.; BONETI, J. I. da 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. Cap. 4. p. 45-64.

KATSURAYAMA, Y.; BONETI, J. I. S.; BECKER, W. F. Prevenção e controle da Mancha da Gala. In: SEMINÁRIO SOBRE FRUTICULTURA DE CLIMA TEMPERADO, 5., 2004. São Joaquim-SC. **Anais. Epagri**, Florianópolis-SC. 2004,74p.

KHODADADI, F. et al. Identification and characterization of *Colletotrichum* species causing apple

bitter rot in New York and description of *C. noveboracense* sp. nov. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–19, 2020.

KIM, H. M.; LEE, K. J.; CHAE, J. C. Postharvest biological control of *Colletotrichum acutatum* on apple by *Bacillus subtilis* HM1 and the structural identification of antagonists. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 11, p. 1954–1959, 2015.

KIM, P. IL et al. Production of biosurfactant lipopeptides iturin A, fengycin, and surfactin A from *Bacillus subtilis* CMB32 for control of *Colletotrichum gloeosporioides*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 138–145, 2010.

KIM, Y. S. et al. Characterization of *Bacillus velezensis* AK-0 as a biocontrol agent against apple bitter rot caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1–14, 2021.

KIM, Y. S.; BALARAJU, K.; JEON, Y. Biological control of apple anthracnose by *Paenibacillus polymyxa* APEC128, an antagonistic rhizobacterium. **Plant Pathology Journal**, v. 32, n. 3, p. 251–259, 2016a.

KIM, Y. S.; BALARAJU, K.; JEON, Y. Effects of rhizobacteria *Paenibacillus polymyxa* APEC136 and *Bacillus subtilis* APEC170 on biocontrol of postharvest pathogens of apple fruits. **Journal of Zhejiang University: Science B**, v. 17, n. 12, p. 931–940, 2016b.

KRUTZELNIGG, H.; SILBEREISEN, R. Sortenkunde zu *Pyrus* und *Malis*. In: **Illustrierte Flora von Mitteleuropa**. 3ed. Berlin, Paul Parey, s.d. v.412.

CABREFIGA, J. et al. First Report of *Colletotrichum chrysophilum* Causing Apple Bitter Rot in Spain. **Plant Disease**, [S.L.], v. 106, n. 6, p. 1752, 1 jun. 2022. Scientific Societies.

KOO, H.-M. Fungicide Selection for Control of *Lycium chinense* Anthracnose Caused by *Colletotrichum* spp. **Research in Plant Disease**, v.14, n.1, p.26-31, 2008.

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, n. 3, p. 251–257, 2003.

KUPPER, K. C.; MORETTO, R. K.; FUJIMOTO, A. Production of antifungal compounds by *Bacillus* spp. isolates and its capacity for controlling citrus black spot under field conditions. **World**

Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 36, n. 1, p. 1–10, 2020.

LEE, G. W. et al. Biological control of postharvest diseases of apples, peaches and nectarines by *Bacillus subtilis* S16 isolated from halophytes rhizosphere. **Biocontrol Science and Technology**, v. 22, n. 3, p. 351–361, 2012.

LIAO, C. Y. et al. Characterization of three *Colletotrichum acutatum* isolates from *Capsicum* spp. **European Journal of Plant Pathology**, v. 133, n. 3, p. 599–608, 2012.

LIMA, I. DE M. et al. Tendências e realidades no manejo fitossanitário. **Incaper em Revista**, v. 9, p. 16–30, 2018.

LIN, Y. -S et al. The chromosomal DNA of *Streptomyces lividans* 66 is linear. **Molecular Microbiology**, v. 10, n. 5, p. 923–933, 1993.

LING, L. et al. The inhibitory effect of volatile organic compounds produced by *Bacillus subtilis* CL2 on pathogenic fungi of wolfberry. **Journal of Basic Microbiology**, v. 61, n. 2, p. 110–121, 2021.

LIU, J. et al. Review: Utilization of antagonistic yeasts to manage postharvest fungal diseases of fruit. **International Journal of Food Microbiology**, v. 167, n. 2, p. 153–160, 2013.

LUNA-BULBARELA, A. et al. Effects of bacillomycin D homologues produced by *Bacillus amyloliquefaciens* 83 on growth and viability of *Colletotrichum gloeosporioides* at different physiological stages. **Biological Control**, v. 127, n. February, p. 145–154, 2018.

LYOUSFI, N. et al. Combination of Sodium Bicarbonate (SBC) with Bacterial Antagonists for the Control of Brown Rot Disease of Fruit. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 6, p. 1–15, 2022.

MAGET-DANA, R. et al. Surfactin/iturin A interactions may explain the synergistic effect of surfactin on the biological properties of iturin A. **Biochimie**, v. 74, n. 12, p. 1047–1051, 1992.

MILES, T. D.; SCHILDER, A. C. Host Defenses Associated with Fruit Infection by *Colletotrichum* Species with an Emphasis on Anthracnose of Blueberries. **Plant Health Progress**, v. 14, n. 1, 2013.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **AGROFIT**: Sistema de Agrotóxico Fitossanitário. 2022. Disponível em: <https://agrofit.agricultura.gov.br/>. Acesso em: 15 set. 2022.

- MNIF, I. et al. Purification and identification of *Bacillus subtilis* SPB1 lipopeptide biosurfactant exhibiting antifungal activity against *Rhizoctonia bataticola* and *Rhizoctonia solani*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 7, p. 6690–6699, 2016.
- MONDINO, P. et al. Manual de identificación de enfermedades de manzana en poscosecha. **Udelar-Cyted**, 67p, 2009.
- MOREIRA, R. R. **Etiologia da mancha foliar de *Glomerella* em macieira e sensibilidade do patógeno a fungicida**. 2017. 118 f. Tese (Doutorado) - Curso de Agronomia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2018.
- MOREIRA, R. R. et al. Sensitivity of the *Colletotrichum acutatum* Species Complex from Apple Trees in Brazil to Dithiocarbamates, Methyl Benzimidazole Carbamates, and Quinone Outside Inhibitor Fungicides. **Plant Disease**, v. 103, n. 10, p. 2569–2576, 2019.
- MOREIRA, R. R. et al. Study of infection process of five species of *Colletotrichum* comparing symptoms of glomerella leaf spot and bitter rot in two apple cultivars. **European Journal of Plant Pathology**, v. 159, n. 1, p. 37–53, 2021.
- MOREIRA, R. R.; MAY DE MIO, L. L. Potential biological agents isolated from apple fail to control *Glomerella* leaf spot in the field. **Biological Control**, v. 87, p. 56–63, 2015.
- MOREIRA, R. R.; NESI, C. N.; MAY DE MIO, L. L. *Bacillus* spp. and *Pseudomonas putida* as inhibitors of the *Colletotrichum acutatum* group and potential to control glomerella leaf spot. **Biological Control**, v. 72, p. 30–37, 2014.
- MOREIRA, R. R.; PERES, N. A.; DE MIO, L. L. M. *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* species complexes associated with apple in Brazil. **Plant Disease**, v. 103, n. 2, p. 268–275, 2019.
- MUNDA, A. First Report of *Colletotrichum fioriniae* and *C. godetiae* Causing Apple Bitter Rot in Slovenia. **Plant Disease**, [S.L.], v. 98, n. 9, p. 1282-1282, set. 2014. Scientific Societies.
- MOUEN BEDIMO, J. A. et al. Role of rainfall in the development of coffee berry disease in *Coffea arabica* caused by *Colletotrichum kahawae*, in Cameroon. **Plant Pathology**, v. 59, n. 2, p. 324–329, 2010.

NUNES, C. A. Biological control of postharvest diseases of fruit. **European Journal of Plant Pathology**, v. 133, n. 1, p. 181–196, 2012.

OGOSHI, C. et al. Podridões pós-colheita em maçã: perdas econômicas e alternativas de manejo. **Brazilian Journal of Development**, v. 5, n. 9, p. 17093–17101, 2019.

ONGENA, M.; JACQUES, P. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. **Trends in Microbiology**, v. 16, n. 3, p. 115–125, 2008.

PARK, M. S. et al. First report of two *Colletotrichum* species associated with bitter rot on apple fruit in Korea - *C. fructicola* and *C. siamense*. **Mycobiology**, v. 46, n. 2, p. 154–158, 2018.

PERES, N. A. R. et al. Benomyl sensitivity of isolates of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* from citrus. **Plant Disease**, v. 88, n. 2, p. 125–130, 2004.

PETRI, J. L. et al. Advances of the apple crop in Brazil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. SPEC. ISSUE 1, p. 48–56, 2011.

PHOULIVONG, S. *Colletotrichum*, naming, control, resistance, biocontrol of weeds and current challenges. p. 53–73, 2011.

PHOULIVONG, S. Cross infection of *Colletotrichum* species; a case study with tropical fruits. **Current Research in Environmental & Applied Mycology**, v. 2, n. 2, p. 99–111, 2012.

POLEATEWICH, A. M.; NGUGI, H. K.; BACKMAN, P. A. Assessment of application timing of *Bacillus* spp. to suppress pre- and postharvest diseases of apple. **Plant Disease**, v. 96, n. 2, p. 211–220, 2012.

PRAKASH, J.; EGAMBERDIEVA, D.; ARORA, N.K. A novel *Bacillus safensis*-based formulation along with mycorrhiza inoculation for controlling *Alternaria alternata* and simultaneously improving growth, nutrient uptake, and steviol glycosides in *Stevia rebaudiana* under field conditions. **Plants**, v.11, p.1857, 2022.

RAGAZZO-SÁNCHEZ, J. A. et al. Selección de cepas de *Bacillus* spp. productoras de antibioticos aisladas de frutos tropicales. **Revista Chapingo Serie Horticultura**, v. 17, n. 1, p. 5–11, 2011.

REYES-ESTEBANEZ, M. et al. Characterization of a native *Bacillus velezensis* like strain for the potential biocontrol of tropical fruit pathogens. **Biological Control**, v. 141, n. October 2019, p.

104127, 2020.

RICCE, W. da S.; PADOLFO, C.; PASA, M. da S. Zoneamento Agroclimático. In: SEZERINO, André Amarildo (org.). **Sistema de Produção para a cultura da macieira em Santa Catarina**. Florianópolis: Epagri, 2018. Cap. 2. p. 21-24.

ROBLES MONTOYA R.I. et al. Improving biometric traits of wheat seedlings with the inoculation of a consortium native of *Bacillus*. **Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas**, v.11, p.229–235, 2020.

RODRÍGUEZ-CHÁVEZ, J. L. et al. Identification of lipopeptides from *Bacillus* strain Q11 with ability to inhibit the germination of *Penicillium expansum*, the etiological agent of postharvest blue mold disease. **Postharvest Biology and Technology**, v. 155, n. April, p. 72–79, 2019.

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.

SHARMA, A. et al. Effectiveness of fungal, bacterial and yeast antagonists for management of mango anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*). **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 31, n. 1, 2021.

SHI, Y. et al. Frequency of *Colletotrichum* species causing bitter rot of apple in the Southeastern United States. **Plant Disease**, 1996.

SHIVAS, R. G.; TAN, Y. P. A taxonomic re-assessment of *Colletotrichum acutatum*, introducing *C. fioriniae* comb. et stat. nov. and *C. simmondsii* sp. nov. **Fungal Diversity**, v. 39, n. Imi 117617, p. 111–122, 2009.

SIAHMOSHTEH, F. et al. Unraveling the mode of antifungal action of *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens* as potential biocontrol agents against aflatoxigenic *Aspergillus parasiticus*. **Food Control**, v. 89, p. 300–307, 2018.

SID AHMED, A. et al. Effect of chitin on biological control activity of *Bacillus* spp. and *Trichoderma harzianum* against root rot disease in pepper (*Capsicum annuum*) plants. **European**

Journal of Plant Pathology, v.109, p.633–637, 2003.

SILVA-JUNIOR, G. J. et al. Spatiotemporal characterization of citrus postbloom fruit drop in Brazil and its relationship to pathogen dispersal. **Plant Pathology**, v. 63, n. 3, p. 519–529, 2014.

SONG, B. et al. Antifungal activity of the lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* anti-CA against *Candida albicans* isolated from clinic. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 16, p. 7141–7150, 2013.

SPADARO, D.; DROBY, S. Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit: The importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists. **Trends in Food Science and Technology**, v. 47, p. 39–49, 2016.

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

STADNIK, M. J. Manejo integrado de doenças da macieira. Florianópolis: **CCA-UFSC**, 2009. 229p.

STEIN, T. *Bacillus subtilis* antibiotics: Structures, syntheses and specific functions. **Molecular Microbiology**, v. 56, n. 4, p. 845–857, 2005.

SUTTON, T. B. Bitter Rot. Pages 15-16 in: **Compendium of Apple and Pear Diseases**, (A.L. Jones and H. S. Aldwinckle, eds.) American Phytopathological Society, St. Paul, MN, 1990.

SUTTON B. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: **Bailey JA, Jeger MJ** (Eds.). *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. Wallingford, UK: CABI. p.1-26, 1992.

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.

TANG, Q. et al. Effects of fengycin from *Bacillus subtilis* fmbJ on apoptosis and necrosis in *Rhizopus stolonifer*. **Journal of Microbiology**, v. 52, n. 8, p. 675–680, 2014.

TAO, Y. et al. Antifungal Activity and Mechanism of Fengycin in the Presence and Absence of Commercial Surfactin Against *Rhizopus stolonifer*. **Journal of Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 146–150, 2011.

TAYLOR J. A necrotic leaf blotch and fruit rot of apple caused by a strain of *Glomerella cingulata*. **Phytopathology** 61: 221-224. 10.1094/Phyto-61-221, 1971.

TEAM, R CORE, 2022. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>.

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. (eds) **Plant-Microbe Interactions**, vol 1. Springer, Boston, MA, 1996.

TOURE, Y.; ONGENA, M.; JACQUES, P.; GUIRO, A.; THONART, P. Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, p. 1151-1160, 2004.

USALL, J.; TORRES, R.; TEIXIDÓ, N. Biological control of postharvest diseases on fruit: a suitable alternative? **Current Opinion in Food Science**, v. 11, p. 51–55, 2016.

VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M.; BETTI, J. A. Doenças da macieira. In: KIMATI, H. et al. (Eds.) **Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Ceres, cap.48, pp.421-433, 2005.

VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M. et al. Doenças da Macieira. In: AMORIM, L. et al. **Manual de fitopatologia: Doenças de plantas cultivadas**. 5 ed. São Paul: Agronômica Ceres, v.a. p. 485-509, 2018.

VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M. et al. Manejo das doenças de verão na Produção Integrada de Maçã. **Circular Técnica Embrapa Uva e Vinho**, 36, 1-12, 2002.

VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M.; HOFFMANN, A. Produção integrada de maçã. In: MAPA (Ed.) **Produção integrada no Brasil: agropecuária sustentável alimentos seguros**. Brasília, Mapa/ACS, cap.18, pp. 513-532, 2009.

VELHO, A. C. et al. New insights into the characterization of *Colletotrichum species* associated with apple diseases in southern Brazil and Uruguay. **Fungal Biology**, v. 119, n. 4, p. 229–244, 2015.

VOGEL, J.; QUAX, W. J. Enzymatic Quorum Quenching in Biofilms. **Quorum Sensing: Molecular Mechanism and Biotechnological Application**, p. 173–193, 2019.

WANG, X. et al. *Bacillus amyloliquefaciens* HG01 induces resistance in loquats against anthracnose rot caused by *Colletotrichum acutatum*. **Postharvest Biology and Technology**, v. 160, n. October 2019, p. 111034, 2020.

WANG, J.; HE, Y.; LI, T. Complex biochemical synergistic interactions between two rhizobacteria grown in consortium, *Bacillus subtilis* SL-44 and *Enterobacter hormaechei* Wu-15. **Rhizosphere**, v.24, 2022.

WIECZOREK, A.S. et al. Ecological functions of agricultural soil bacteria and microeukaryotes in chitin degradation: a case study. **Frontiers in Microbiology**, v.10, 2019

WIN, T.T.; BO, B.; MALEC, P.; FU, P. The effect of a consortium of *Penicillium* sp. and *Bacillus* spp. in suppressing banana fungal diseases caused by *Fusarium* sp. and *Alternaria* sp. **Journal of Applied Microbiology**, v.131, p.1890–1908, 2021.

WU, Y. M. et al. *Bacillus amyloliquefaciens* strains control strawberry anthracnose through antagonistic activity and plant immune response intensification. **Biological Control**, v. 157, n. December 2020, p. 104592, 2021.

YAN, F. et al. Antifungal activity of lipopeptides from *Bacillus amyloliquefaciens* MG3 against *Colletotrichum gloeosporioides* in loquat fruits. **Biological Control**, v. 146, n. April, p. 104281, 2020.

YANTI, Y.; HAMID H.; YAHERWANDI, R. Biological control of *Sclerotium rolfsii* on tomato seedlings using *Bacillus* spp. consortium. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v.741, 2021.

YÁNEZ-MENDIZÁBAL, V. et al. Biological control of peach brown rot (*Monilinia* spp.) by *Bacillus subtilis* CPA-8 is based on production of fengycin-like lipopeptides. **European Journal of Plant Pathology**, v. 132, n. 4, p. 609–619, 2012.

YE, W. Q. et al. Biocontrol potential of a broad-spectrum antifungal strain *Bacillus amyloliquefaciens* B4 for postharvest loquat fruit storage. **Postharvest Biology and Technology**, v. 174, n. December 2020, p. 111439, 2021.

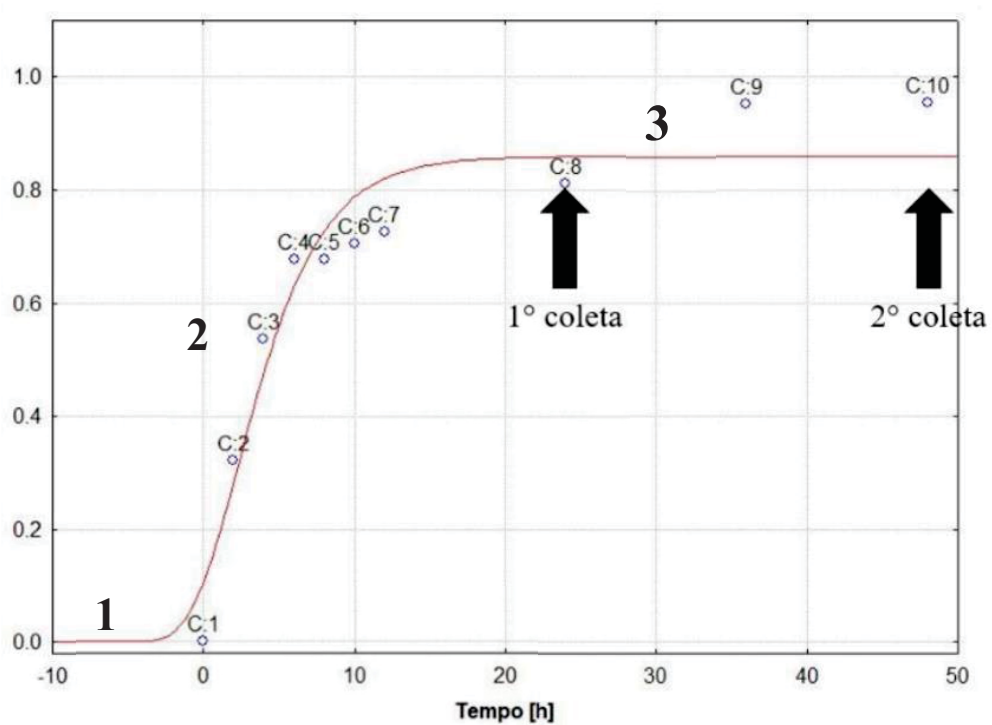
ZHANG, L.; SUN, C. Fengycins, cyclic lipopeptides from marine *Bacillus subtilis* strains, kill the plant-pathogenic fungus *Magnaporthe grisea* by inducing reactive oxygen species production and

chromatin condensation. **Applied And Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 84, n. 18, p. 1-17, 15 set. 2018. American Society for Microbiology.

ZHAO, H. et al. Biological activity of lipopeptides from *Bacillus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 15, p. 5951–5960, 2017.

ANEXO

I) CURVA DE CRESCIMENTO DE *Bacillus alcalophilus*, ONDE: 1) FASE LAG; 2) FASE LOG; 3) DASE ESTACIONÁRIA. 1ª COLETA – 24 HORAS DE CULTIVO; 2ª COLETA – 48 HORAS DE CULTIVO.



Fonte: o autor (2022).