

**FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA
MESTRADO PROFISSIONAL EM
FITOSSANIDADE DOS CITROS**

FERNANDO DE AMORIM MASCARO

**Avaliação de produtos comerciais à base de *Bacillus* spp.
para o controle da podridão floral dos citros**

Dissertação apresentada ao Fundo de Defesa da
Citricultura como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em Fitossanidade
dos citros

Orientador: Dr. Geraldo José da Silva Junior

Coorientador: Dr. Franklin Jackson Machado

**Araraquara
Março 2021**

FERNANDO DE AMORIM MASCARO

**Avaliação de produtos comerciais à base de *Bacillus* spp.
para o controle da podridão floral dos citros**

Dissertação apresentada ao Fundo de Defesa da
Citricultura como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em Fitossanidade
dos Citros

Orientador: Dr. Geraldo José da Silva Junior

Coorientador: Dr. Franklin Jackson Machado

**Araraquara
Março 2021**

FERNANDO DE AMORIM MASCARO

Dissertação apresentada ao Fundo de Defesa da Citricultura como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Fitossanidade dos Citros

Araraquara, 30 de março de 2021.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Geraldo José da Silva Junior (Orientador)
Fundo de Defesa da Citricultura - FUNDECITRUS, Araraquara/SP.

Dr. Franklin Behlau
Fundo de Defesa da Citricultura - FUNDECITRUS, Araraquara/SP.

Dra. Louise Larissa May De Mio
Universidade Federal do Paraná – UFPR, Curitiba/PR.

Aos meus filhos queridos, Carolina e Daniel. A Camila, minha amada esposa e companheira de caminhada e batalhas. Aos meus pais, Sonia e Carlos (in memoriam).

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela oportunidade de vida com plena saúde e por todas as excelentes oportunidades abençoadas que tenho na vida.

Aos meus filhos Daniel e Carolina, e a minha esposa Camila, por todo o apoio, incentivo e compreensão durante todo o curso de Mestrado.

À empresa SJS Campo Consultoria e seus sócios Rubens Stamato, Roberto Salva e Décio Joaquim, pela oportunidade de trabalho e também pelo apoio para o desenvolvimento deste estudo.

Ao citricultor Luiz Carlos Rosolen, o Kaká, que disponibilizou sua fazenda e seus funcionários, Diogo e Ismael, que sempre tiveram boa vontade para realização deste estudo.

Ao orientador e professor Dr. Geraldo José Silva Junior, pela amizade, por todos os ensinamentos, e sobretudo apoio e compreensão para a realização deste estudo.

Ao coorientador, pesquisador Franklin Machado pelas suas contribuições fundamentais para discussão deste estudo.

As pesquisadoras Louise Larissa May De Mio e Rafaele Moreira, e aos pesquisadores do Fundecitrus, Nelson Wulff e Franklin Behlau, por suas importantes sugestões e correções.

Ao Fundecitrus – Fundo de Defesa da Citricultura, pela oportunidade do Mestrado e suporte através de sua equipe, especialmente Rosana Pereira, Rafael Smirne, João Pedro Lopes, Jasmine Freitas e Andrieli Botacio.

A todos os pesquisadores do Fundecitrus e aos professores do MasterCitrus, pelos ensinamentos e apoio durante todo o curso.

Às empresas parceiras e seus colaboradores que apoiaram esse estudo: Agrivalle, Bayer, Biotrop e Grupo Vittia.

A todos os colegas e novos irmãos da turma de Mestrado - MasterCitrus, especialmente André Ampúdia, Bruno Dorneles, Guilherme Baroni e Leonardo Doring.

Avaliação de produtos comerciais à base de *Bacillus* spp. para o controle da podridão floral dos citros

Autor: Fernando de Amorim Mascaro

Orientador: Dr. Geraldo José da Silva Junior

Coorientador: Dr. Franklin Jackson Machado

Resumo

O controle biológico tem sido usado para tornar o manejo de doenças mais sustentável. O número de empresas e de produtos comerciais à base de agentes de controle biológico (ACBs) têm aumentado no mundo nas últimas décadas. As bactérias do gênero *Bacillus* têm sido uma das mais estudadas como ACBs e no Brasil existem registrados no Ministério da Agricultura cerca de trinta fungicidas microbiológicos formulados à base de *Bacillus* spp. para controle de diversos fitopatógenos. Quatro fungicidas microbiológicos à base de *B. subtilis* estão registrados para o controle da podridão floral dos citros (PFC), causada por *Colletotrichum abscisum*. Entretanto, são escassos os estudos com produtos comerciais para o controle de doenças causadas por fungos em parte aérea. Alguns trabalhos foram conduzidos com *Bacillus* para o controle da PFC; entretanto, nenhum deles foi focado na avaliação dos produtos comerciais disponíveis no mercado. Desta forma, esse estudo foi conduzido com o objetivo de avaliar a eficiência de cinco produtos comerciais à base de *Bacillus* no controle da podridão floral. Os produtos comerciais Bio-Imune, Biovar, Serenade e Twixx à base de *B. subtilis* e o Biotrio (*B. subtilis* + *B. pumilus* + *B. amyloliquefaciens*) foram avaliados em casa de vegetação (na dose de 2L/2000L) e no campo (2L/ha). Plantas sem aplicação e plantas tratadas com tebuconazol + trifloxistrobina (mistura de fungicidas mais utilizada pelos citricultores para controlar PFC) com mesmo intervalo de aplicação dos produtos biológicos foram utilizadas como controles. Dois ensaios foram conduzidos em mudas de laranja doce ‘Valência’ em casa de vegetação e um campo experimental em pomar comercial de laranjeiras doce ‘Natal’. O efeito dos produtos foi avaliado sobre a redução de flores com sintomas de podridão floral e de cálices retidos após inoculação artificial do patógeno. Em casa de vegetação, os ramos não tratados com produtos e inoculados com o patógeno apresentaram 100% de flores com PFC e 83,3% de cálices retidos, não diferindo das incidências entre 85 e 100% de flores doentes e entre 75 e 98,3% de cálices retidos observadas nos ramos tratados com os produtos biológicos. Em contrapartida, ramos tratados com a mistura de triazol + estrobilurina apresentaram 23,3% de flores doentes e 25% de cálices retidos. Em campo, os ramos de plantas não pulverizados com produtos e inoculados com o patógeno apresentaram 42,3% de flores com PFC e 24,0% de cálices retidos, não diferindo das incidências entre 34,3 e 42,9% de flores com PFC e entre 22,0 e 27,9% de cálices retidos observadas em ramos tratados com os cinco produtos biológicos. A mistura de fungicidas reduziu a incidência de sintomas em flores para 6,6% e de cálices retidos para 5,3%. Os resultados obtidos nas condições do experimento mostraram que os cinco produtos comerciais à base de *Bacillus* não foram eficientes em reduzir os sintomas de podridão floral em casa de vegetação e no campo na dose de 2,0 L de produto comercial. Estudos futuros com doses mais elevadas dos produtos biológicos ou associação com o controle químico poderiam ser conduzidos de forma a viabilizar o uso destes no manejo da podridão floral.

Palavras-chave: Citrus, *Colletotrichum* spp., antracnose, biocontrole, atividade antifúngica.

Assessment of commercial products formulated with *Bacillus* spp. for control of citrus postbloom fruit drop

Author: Fernando de Amorim Mascaro

Advisor: Dr. Geraldo José da Silva Junior

Coadvisor: Dr. Franklin Jackson Machado

Abstract

Biological control has been used to make disease management more sustainable. The number of companies and commercial products based on biological control agents (BCAs) have increased worldwide in recent decades. Bacteria of the genus *Bacillus* have been one of the most studied BCAs, and in Brazil, there are registered in the Ministry of Agriculture about thirty biofungicides formulated based on *Bacillus* spp. to control different plant pathogens. Four microbiological fungicides based on *B. subtilis* are registered for control of postbloom fruit drop (PFD) caused by *Colletotrichum abscisum*. However, there are few studies with commercial biological products for the control of foliar diseases caused by fungi. Some studies were conducted with *Bacillus* to control PFD, although none of them focused on assessing commercial products available on the market. Thus, this study aimed to assess different *Bacillus*-based commercial products for PFD control. The commercial products Bio-Immune, Biovar, Serenade and Twixx containing *B. subtilis* and Biotrio formulated with *B. subtilis* + *B. pumilus* + *B. amyloliquefaciens* were assessed in greenhouse (2 L/2000 L) and in commercial orchard (2 L/hectare). Non-treated trees and trees sprayed with tebuconazol + trifloxystrobin mixture (commonly used by citrus growers to control PFD) with the same spray interval of BCAs were used as controls. Two experiments were performed in Valencia sweet orange potted trees in greenhouse, and a field trial was conducted in Natal sweet orange commercial orchard. The products efficacy in reducing PFD symptoms on flowers and persistent calyces was assessed after pathogen inoculation. In greenhouse, the incidence of flowers with PFD symptoms was 100% and of persistent calyces per branch was 83.3% in non-treated trees inoculated with the pathogen. These percentages did not differ from 85 to 100% of flowers with symptoms of PFD and from 75 to 98.3% of calyces per branch in trees treated with *Bacillus*-based products. In contrast, trees sprayed with tebuconazol + trifloxystrobin showed 23.3% diseased flowers and 25% persistent calyces. In commercial orchard, the incidences of flowers with PFD and persistent calyces were 42.3 and 24.0%, respectively, in non-treated trees. These percentages were similar to those observed in trees sprayed with the five *Bacillus*-based products, which had incidences of symptomatic flowers from 34.3 to 42.9% and of persistent calyces from 22.0 and 27.9%. The fungicide mixture reduced the incidences of symptomatic flowers and persistent calyces to 6.6% and 5.3%, respectively. The results obtained in these conditions showed that these five *Bacillus*-based products used at rate of 2 L commercial product were not effective in reducing PFD symptoms in the greenhouse and in the field. Further studies with higher rates of biological products or their association with chemical control may be conducted in order to enable the BCA use in the PFD management.

Keywords: Citrus, *Colletotrichum* spp., anthracnose, biocontrol, antifungal activity.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. MATERIAL E MÉTODOS	7
2.1 Experimentos em casa de vegetação.....	7
2.2 Experimento em pomar comercial.....	8
2.3 Análise dos dados	11
2.4 Coleta de dados climáticos	11
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	11
3.1 Experimentos em casa de vegetação.....	11
3.2 Experimento em pomar comercial.....	14
3.2.1 Dados climáticos.....	14
3.2.2 Inoculação artificial em condições de campo	15
4. CONCLUSÃO	20
REFERÊNCIAS	21

1. INTRODUÇÃO

O controle biológico (CB) consiste basicamente na supressão da população de determinado patógeno/praga por meio da ação de outro microrganismo/organismo (Cook, 1985; van Lenteren et al., 2018). Os agentes de controle biológico (ACBs) são definidos como os organismos responsáveis pelo CB das doenças/pragas, sendo que na Fitopatologia o CB está baseado no uso de antagonistas microbiológicos e na Entomologia, em insetos predadores/parasitoides, bem como microrganismos entomopatogênicos, que realizam o CB de insetos pragas e vetores de doenças (Pal & Gardener, 2006).

Os ACBs começaram a ser utilizados no final do século XIX na Rússia com utilização do fungo *Metarhizium anisopliae* para o controle de besouros em várias culturas (MacBain Cameron, 1973 apud van Lenteren et al., 2018). Em 1926, os primeiros experimentos foram relatados no Canadá com antagonistas para o controle da sarna da batata (*Streptomyces scabies*) (Cook, 1985). Em 2010, cerca de 170 espécies de ACBs haviam sido descritas na Europa para uso no controle biológico (Cock et al., 2010) e, em 2016, esse número aumentou para em torno de 350 espécies produzidos por 500 empresas em todo o mundo (van Lenteren et al., 2018). Dentre os principais ACBs, as bactérias representam a maioria dos biopesticidas comercializados, sendo que em 2011, *Bacillus thuringiensis*, usado para controle de diversas espécies de lagartas, representava cerca de 70% das vendas de ACBs (Cawoy et al., 2011). O avanço na utilização de ACBs foi impulsionado pelos programas de manejo integrado de pragas (MIP) implementados na Europa em 2009 e, desde então, o CB vem sendo utilizado amplamente no mundo todo. Em 2015, o CB foi utilizado em cerca de 30 milhões de hectares movimentando aproximadamente 1,7 bilhões de dólares (van Lenteren et al., 2018).

No Brasil, o primeiro relato de uso do CB foi na década de 1950, por meio da aplicação do fungo *Trichoderma* para controle de cigarrinhas das pastagens e com baculovírus no controle da lagarta da soja (*Anticarsia gematalis*) em soja (Melo & Azevedo, 1998). Na década de 1990, este fungo começou a ser produzido em escala comercial por empresas visando controle de patógenos habitantes de solo (Melo & Azevedo, 1998). De acordo com dados da Embrapa, em 2010, o mercado brasileiro de produtos biológicos representava cerca de 70 milhões de dólares, equivalente a 2% do mercado de agrotóxicos sintéticos (Embrapa, 2020). No Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) há mais de 330 produtos comerciais à base de ativos biológicos registrados, sendo a maioria bioinseticidas, biofungicidas e parasitóides (Brasil, 2020; Croplife, 2021).

Na natureza e nos ecossistemas equilibrados, sem interferência do homem, o CB natural é de ocorrência espontânea, pelo qual um organismo nativo benéfico realiza o controle de um organismo patógeno/praga (Millenium Ecosystem Assessment, 2005 apud van Lenteren et al., 2018). Por meio da interferência do homem podem ser implementados seis tipos de CB, sendo estes: **augmentativo (CBA)** – ACBs são capturados em massa e liberados onde a população é baixa, aumentando a sua eficiência no controle de patógenos/pragas; **inoculativo (clássico)** – importação de ACB não nativos e liberação destes para controle de organismos nativos ou não; **inundativo** – liberação em massa de ACB para rápido controle do patógeno/praga alvo, porém sem intenção de estabelecimento do ACB introduzido; **manipulativo** – manipulação do ambiente para estabelecimento dos ACBs naturais do habitat; **restaurador** – estimulação de ACB nativos sem necessidade de introdução de novos ACBs; **conservador** - o homem promove a manutenção dos agentes de controle naturais por meio de manipulações que interferem nos patógenos (Banik & Jambhulkar, 2015).

As bases do CB de fitopatógenos são dependentes das interações entre os patógenos e os ACBs, as quais podem ser afetadas pelo ambiente. Os tipos de interação conhecidos e proposto por Odum (1953 apud Pal & Gardener, 2006) são: **mutualismo** – interação de uma ou mais espécies, na qual ambas são beneficiadas e uma depende da outra; **protocooperação** – é uma forma de mutualismo, porém um organismos não dependem um do outro; **comensalismo** – interação simbiótica entre dois organismos, onde um é beneficiado e o outro não é beneficiado; **neutralismo** – interação biológica em que as populações dos organismos envolvidos não sofrem alterações; **competição** – relação entre organismos da mesma espécie ou de diferentes espécies competindo pelo mesmo recurso; **antagonismo** – interação em que a população de um organismo interfere diretamente sob população de outro organismo; **parasitismo** – simbiose entre dois organismos filogeneticamente distintos por um prolongado período, onde somente um é beneficiado (parasita) e o outro é prejudicado (hospedeiro); **predação** – um organismo se alimentando e matando o outro organismo para consumo e subsistência.

Os ACBs apresentam diferentes mecanismos pelos quais os fitopatógenos podem ser controlados, sendo que mais de um mecanismo pode estar envolvido no antagonismo (Medeiros et al., 2018). Os ACBs mais eficientes geralmente são aqueles que utilizam diversos mecanismos de antagonismos (Pal & Gardener, 2006). Os fitopatógenos podem ser afetados não somente pela presença dos ACBs no mesmo habitat, mas também pelas atividades desses microrganismos. O antagonismo pode ocorrer por diferentes mecanismos, que dependem da quantidade de contato interespecies e à especificidade das interações. Os mecanismos básicos

de antagonismo são: **antibiose** – um ou mais metabólitos produzidos pelo antagonista tem efeito negativo sobre o fitopatógeno, inibindo o crescimento e/ou germinação; **competição** – o microrganismo compete com o fitopatógeno por espaço e nutrientes; **parasitismo** – o microrganismo se alimenta das estruturas vegetativas ou reprodutivas do fitopatógeno; **hipovirulência** – introdução de linhagens menos agressivas do patógeno ou não patogênica, que pode transmitir essas características para outras linhagens; **predação** – microrganismo obtém alimento a partir de um fitopatógeno ou de outras fontes; **indução da resistência** – microrganismos não patogênicos, seus metabólitos e/ou linhagens fracas induzem os mecanismos de defesa do hospedeiro (Vieira Junior et al., 2013; Medeiros et al., 2018).

O uso de bactérias do gênero *Bacillus* também tem sido importante no controle biológico de fitopatógenos. Estas bactérias são aeróbias ou anaeróbias facultativas gram-positivas. Podem ser encontradas em diferentes ecossistemas e em climas diversos, com uma grande biodiversidade (Melo & Azevedo, 1998). Outra característica importante deste gênero, é que são produtoras de esporos (endósporos), que conferem maior resistência às condições adversas, como altas temperaturas, pH desfavorável, falta de nutrientes e de água, contribuindo assim para ser um ACB (Lanna Filho et al., 2010; Cawoy et al., 2011).

A rizobactéria *Bacillus subtilis* é uma das espécies mais utilizadas e bem estudadas no CB. Estima-se que 4 a 5% do seu genoma é dedicado à síntese de antibióticos, o que demonstra o seu potencial para produzir muitos compostos antimicrobianos (Stein, 2005). Os principais antimicrobianos produzidos são os lipopeptídeos cíclicos das famílias da surfactina, iturina e fengicina, conhecidos por características surfactantes (Ongena & Jaques, 2007). Embora *B. subtilis* tenha como habitat natural o solo, essa espécie pode ocupar nichos ecológicos distintos, em associação com plantas, estabelecendo-se na rizosfera, rizoplane, filoplane e nos tecidos internos, multiplicando-se, sobrevivendo e protegendo-se da ação antagonista da microflora autóctone (Melo & Azevedo, 1998). *B. subtilis* age sobre os patógenos por antibiose e, ocasionalmente, por parasitismo e competição (Kupper et al., 2003b).

A ação de *B. subtilis* contra patógenos fúngicos pode ser tanto na germinação dos esporos quanto no crescimento micelial. Diversos são os trabalhos já publicados com controle de fitopatógenos por essa espécie de bactéria. Em plantas de feijão, *B. subtilis* demonstrou eficiência no controle de *Uromyces phaseoli*, agente causal da ferrugem do feijoeiro (Baker et al., 1983). Essa bactéria promoveu a inibição da germinação de urediniosporos de *Hemileia vastatrix* (agente causal da ferrugem) em folhas de cafeeiro (Bettiol et al., 1997), bem como de conídios de *Colletotrichum gloeosporioides*, causador da podridão amarga, por meio de lipopeptídeos iturin A-2 (Ruangwong & Liang, 2011). Amorim e Melo (2002) verificaram que

algumas bactérias, incluindo *B. subtilis*, foram capazes de controlar *Phytophthora parasitica* e *P. citrophthora*, agentes causais da gomose dos citros, bem como de promover o desenvolvimento de plântulas. Em outro trabalho na cultura dos citros, em condições de casa de vegetação, foi observado que a associação de um isolado comercial de *B. subtilis* QST 713 (Serenade Max[®]) com hidróxido de cobre diminuiu a incidência em folhas de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, bactéria causadora do cancro cítrico (Ibrahim et al., 2016).

Outras espécies de *Bacillus* de importância comercial também têm sido utilizadas como ACB de fitopatógenos, tais como: *B. cereus*, *B. sphaericus*, *B. megaterium*, *B. pumilus* e *B. brevis* (Melo & Azevedo, 1998). Metabolitos antifúngicos produzidos por *B. pumilus* inibiram o crescimento micelial de espécies de *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* (Munimbazi & Bullerman, 1998). Em pós-colheita de citros, *B. pumilus* mostrou antagonismo eficiente contra *Penicillium digitatum*, sendo o controle de bolores tão eficaz quanto o agrotóxico imazalil (Huang et al., 1992). Estudos com a técnica do cultivo pareado da cepa DH-4 de *B. amyloliquefaciens* com *P. digitatum* demonstrou efeito antagônico e alterações morfológicas nas mitocôndrias do micélio do patógeno (Chen et al., 2018). Em pepino, resultados indicaram *B. pumilus* foi um antagonista eficaz contra *Rasstonia solani*, causador da murcha bacteriana (Huang et al., 2012). *B. pumilis* e *B. licheniformis* são capazes de produzir compostos como pumilacidina e liquenisina, os quais possuem importantes características antibióticas (Andric et al., 2020). Alguns estudos mais recentes têm demonstrado que a espécie *B. velezensis* (FZB42) apresenta potencial para controle de fitopatógenos e promoção de crescimento (Fan et al., 2018).

No Brasil existem diferentes formulações à base de *Bacillus* registradas no MAPA como bioinseticidas, bionematicidas e biofungicidas específicos. Para o controle de fitopatógenos em diversas culturas estão registrados doze biofungicidas à base de *B. subtilis*, são eles: Baci-Attack[®], Baci-Guard[®], Biobac[®], Biobaci[®], Bio-imune[®], BTP 001-18[®], Furatrop[®], Multi-Attack[®], Multi-Guard[®], Serenade[®], Rizos[®] e Vult[®]. Os produtos Presence[®] e Quartzo[®] são formulados com *B. subtilis* e *B. licheniformis*. Os produtos Profix[®], Profix-A[®], Profix-B[®] e Profix-C[®] são misturas de *B. subtilis*, *B. licheniformis* e o fungo *Paecilomyces lilacinus*. Os produtos Bactel[®], BF20.001[®], DFC Control[®], Duravel[®], Eco-Shot[®], FxProtection[®], Pardella[®], Quartz[®], Shocker[®], Tanus[®] e Twixx[®] são formulados com *B. amyloliquefaciens* e o Sonata[®], um dos primeiros biofungicidas registrado no Brasil, formulados à base de *B. pumilus*.

Especificamente para controle de doenças dos citros, estão registrados no MAPA quatro biofungicidas à base de *B. subtilis*: Bio-imune[®], Multi-Attack[®], Multi-Guard[®] e Serenade[®]. A utilização de ACBs, como *Bacillus*, poder ser uma ferramenta adicional para auxiliar o manejo

de diferentes doenças que são majoritariamente controladas com aplicações de fungicidas e bactericidas. Entretanto, o controle biológico de fitopatógenos que afetam a parte aérea ainda é pouco utilizado. Uma das principais doenças da cultura é a podridão floral dos citros (PFC), causada por espécies de *Colletotrichum* (Timmer et al., 1994; Lima et al., 2011; Silva Junior, 2019). A doença é capaz de provocar significativos prejuízos aos citricultores na ausência de controle, uma vez que as epidemias severas podem reduzir a produção das plantas em até 80% (Silva Junior et al., 2014).

O principal agente causal da PFC é a espécie *C. abscissum* pertencente ao complexo *C. acutatum* (Pinho et al., 2015), que sobrevive na forma de apressórios nas folhas de citros e de plantas daninhas por meio de infecções quiescentes (Zulfiqar et al., 1996). Durante o florescimento e sob condições climáticas favoráveis (chuva e molhamento prolongado), os conídios são produzidos em grande quantidade nas folhas (sem formação de acérvulos) induzidos por compostos produzidos nas flores que são depositados sobre as folhas. Esses conídios produzidos nas folhas são dispersos por respingos de chuvas para flores sadias, onde ocorrem as infecções (Silva Junior, 2019).

Os sintomas da PFC consistem em lesões de coloração alaranjada ou marrom tanto em botões fechados quanto nas pétalas abertas (Timmer et al., 1994). Lesões necróticas de coloração preta também são observadas no estigma e estilete (Marques et al., 2013). Após a infecção das flores, os frutos recém-formados tornam-se amarelados e caem, porém, os cálices ficam aderidos aos ramos (Timmer et al., 1994).

O manejo da PFC consiste na adoção de práticas culturais que visam minimizar a sua incidência e os prejuízos nos pomares. As principais medidas de manejo utilizadas pelos citricultores são: plantios em regiões com baixo histórico de precipitações durante o período de floração, nutrição equilibrada das plantas, eliminação de plantas debilitadas e afetadas por outras doenças, irrigação para antecipar a interrupção do estresse hídrico, promovendo a floração antes do período das chuvas, e o uso racional do controle químico (Silva Junior, 2019).

O controle químico tem sido o método mais utilizado pelos citricultores do cinturão citrícola paulista quando a florada coincide com períodos chuvosos (Spada, 2011). Os fungicidas são aplicados preventivamente às condições climáticas favoráveis durante o período de florescimento (Goes et al., 2008; Silva Junior et al., 2014). As aplicações são recomendadas com base nos riscos de PFC enviados pelo sistema de previsão desenvolvido pelo Fundecitrus em parceria com a Esalq e a Universidade da Flórida (Gama et al., 2019).

Os fungicidas registrados no MAPA, incluídos na Lista ProteCitrus com eficiência no controle da PFC são os inibidores de quinona externa (QoI) ou estrobirulinas (azoxistrobina,

piraclostrobina e trifloxistrobina) e os inibidores da desmetilação de esteróis (DMI) ou triazóis (difenoconazol e tebuconazol) (Fundo de Defesa da Citricultura, 2020). A reduzida disponibilidade de fungicidas eficientes para o controle da PFC tem relação com as exigências dos importadores do suco brasileiro. No MAPA há registro de alguns fungicidas como o folpete (dicarboximidas) e o carbendazim (metil benzimidazol carbamato, MBC), mas que foram excluídos da Lista ProteCitrus em 2012 com o objetivo de atender mercados importadores de suco de laranja, como os Estados Unidos e a União Europeia (Silva Junior et al., 2014).

O uso frequente e excessivo dos fungicidas disponíveis, que possuem modos de ação específicos, podem levar a seleção de populações resistentes do patógeno. No Brasil ainda não foi encontrada resistência de QoI e DMI em populações de *Colletotrichum* obtidas de flores de citros. Um estudo conduzido com isolados de *C. acutatum* de várias regiões citrícolas do de São Paulo não encontrou variação significativa nos níveis de resistência do patógeno aos fungicidas DMI e QoI (Gama et al., 2020). Por outro lado, resistência aos fungicidas QoI já foi encontrada em populações de *C. acutatum* em plantações de morango na Flórida, EUA (Forcelini et al., 2016), bem como em populações de *Alternaria alternata*, agente causal da mancha marrom de alternaria, em pomares de tangerinas no estado de São Paulo (Chitolina, 2021).

Em função da baixa disponibilidade de fungicidas, do risco de resistência do patógeno aos produtos disponíveis e da recente demanda dos mercados importadores de suco de laranja por produtos mais sustentáveis, o CB pode ser uma ferramenta importante a ser adicionada como estratégia de controle da PFC. Alguns estudos já foram realizados com CB da PFC e os resultados foram promissores (Kupper et al., 2003a; Klein et al., 2016). Diversos isolados de *B. subtilis* demonstraram potencial na inibição de *C. acutatum* em laboratório, uma vez que produziram metabólitos capazes de inibir o crescimento micelial do patógeno. Porém, em condições de campo, apenas um isolado apresentou resultados satisfatórios e similares aos encontrados para o fungicida benomil (MBC) na redução de flores sintomáticas e na fixação de frutos (Kupper et al., 2003a). Esse mesmo isolado foi avaliado em outro estudo no controle de PFC e as plantas tratadas semanalmente com a concentração de 5% apresentaram menos de 20% de flores com sintomas, valor este que não diferiu da incidência de 29% observada em plantas tratadas com fungicida, mas foi significativamente inferior aos 35% observados nas plantas não tratadas (Correa, 2010). *B. subtilis* formulado em talco, caulim ou alginato de potássio, acrescidos ou não a uma fonte de nitrogênio e aplicado preventivamente ou curativamente em flores destacadas de laranja ‘Valência’ apresentou redução dos sintomas de PFC superior a 60% em relação às plantas não tratadas (Klein et al., 2016). Nesse estudo, as

formulações acrescidas de ureia e aplicadas após a inoculação do patógeno foram mais eficientes e resultaram em 90% de flores sadias.

Apesar dos estudos já realizados com isolados de *B. subtilis* demonstrarem eficiência no controle da PFC, os diferentes produtos biológicos comerciais formulados com *B. subtilis*, *B.amyloliquefaciens* e *B.pumilus* e disponíveis para uso em citros ainda não tiveram a sua eficiência comprovada sob condições de campo. Tendo em vista que as empresas detentoras dos produtos comerciais formulados com espécies de *Bacillus* spp. pretendem comercializar os mesmos no manejo da PFC, esse projeto foi elaborado com o objetivo de avaliar a eficiência dos diferentes produtos comerciais à base de *Bacillus* no controle biológico da PFC.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi subdividido em experimentos conduzidos em casa de vegetação e em pomar comercial. Em casa de vegetação foram realizados dois experimentos para avaliar o efeito preventivo de cinco produtos comerciais no controle da PFC (Tabela 1). Na safra 2020/2021, um experimento foi realizado em pomar comercial de laranjeira doce no sudoeste paulista, no qual os mesmos cinco produtos foram aplicados durante o período de florescimento para o controle biológico da PFC.

2.1 Experimentos em casa de vegetação

Os experimentos foram realizados em casa de vegetação no Fundecitrus. Plantas jovens de laranja doce ‘Valência’ [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] enxertadas em citrumelo ‘Swingle’ [*Citrus paradisi* Macfad cv Duncan x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.] cultivadas em vasos, com dois anos de idade (Figura 1A), foram utilizadas para a avaliação dos cinco fungicidas microbiológicos. O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado com sete tratamentos e três repetições, sendo cada repetição um ramo contendo pelo menos 10 botões florais. Os ramos reprodutivos com pelo menos 10 botões expandidos no estágio R4 (Silva Junior et al., 2014) foram selecionados e marcados (Figura 1B). Os fungicidas microbiológicos comerciais à base de *Bacillus* (Tabela 1) foram pulverizados individualmente nos ramos marcados com pulverizador manual modelo Leve Névoa 500 mL (Guarany, Itu, Brasil) até o ponto de escorrimento. Todos os produtos foram aplicados na dose de 2,0 L de produto comercial/2000 L de água. A mistura de tebuconazol + trifloxistrobina (Nativo, 20 + 10% i.a.,

Bayer CropScience) na dose de 800 mL de produto comercial/2000 L e apenas aplicação de água foram utilizadas como controles (Tabela 1).

A inoculação foi realizada com pulverizador manual contendo suspensão de *C. abscissum* (isolado Ca142 da coleção do Fundecitrus) na concentração de 10^5 conídios/mL, aproximadamente seis horas após a aplicação dos produtos biológicos (Figura 1C). Após a inoculação, os ramos foram ensacados individualmente com saco plástico transparente por 24 horas (Figura 1D). A incidência de flores com sintomas de podridão floral e o número de cálices retidos por ramo foram avaliados, respectivamente, sete e 90 dias após a inoculação (Pavin Junior, 2014). O experimento foi realizado em duplicata.

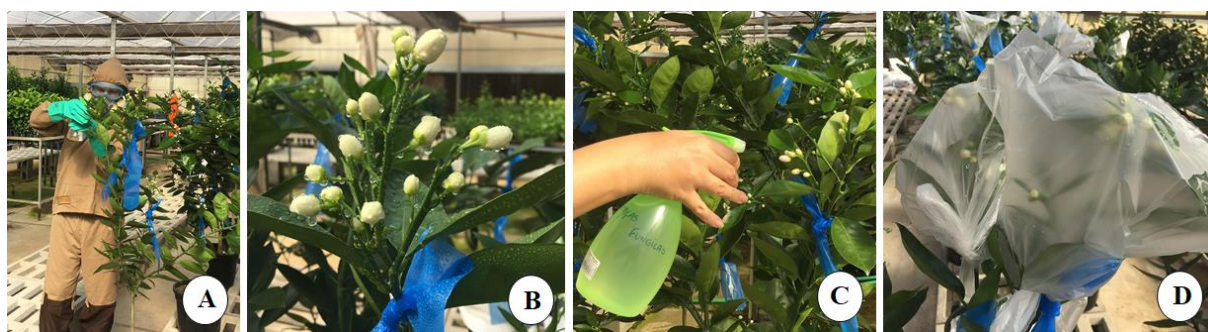


Figura 1. Aplicação dos produtos comerciais à base de *Bacillus* em ramos reprodutivos de plantas de laranja doce ‘Valência’ para controle de podridão floral dos citros (A). Ramo contendo botões florais expandidos (estádio R4) pulverizados com um dos produtos biológicos (B). Inoculação da suspensão de conídios de *Colletotrichum abscissum* nos botões florais (C). Câmara úmida com saco plástico após inoculação do patógeno nos ramos mantida por 24 horas (D).

2.2 Experimento em pomar comercial

Um experimento de campo foi conduzido nos meses de agosto e setembro de 2020, durante o florescimento das plantas, no município de Itaipava (23°32’7.33’’S; 49° 6’19.36’’O; altitude de 605 m), no sudoeste paulista, onde epidemias de podridão floral são mais frequentes e causam perdas expressivas (Figura 2A). O campo experimental foi conduzido em pomar de laranja doce ‘Natal’ enxertada em citrumelo ‘Swingle’, plantado em janeiro de 2006, com espaçamento de 6,8 m x 3,2 m. Neste pomar, as linhas de plantio estavam dispostas no sentido noroeste-sudeste. As plantas apresentavam, em média, copa com altura de 3,5 m e profundidade de 4,0 m. O volume de copa foi estimado de acordo com a metodologia do *tree-row-volume* (TRV) descrita por Silva Junior et al. (2014). Cada planta apresentou 45 m³ e o volume de copa total por hectare foi de 20.600 m³.

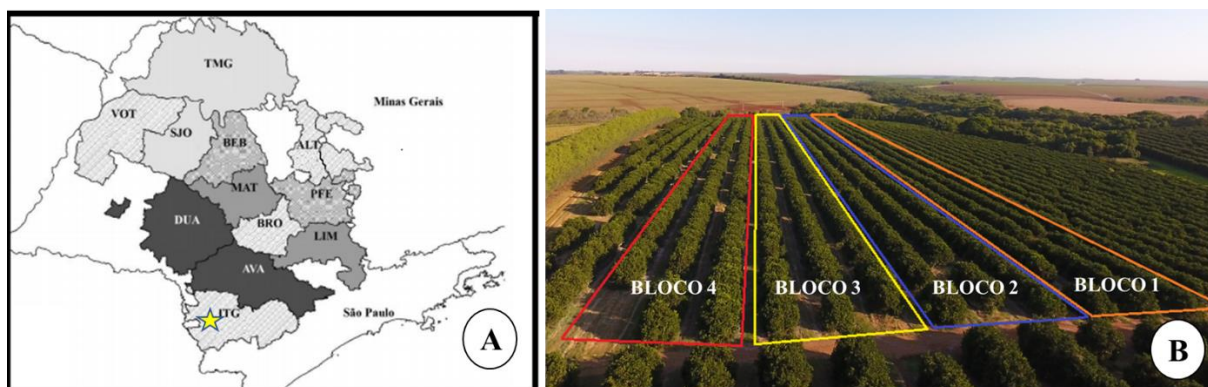


Figura 2. Localização da área experimental no mapa das regiões produtoras de citros no estado de São Paulo. A estrela amarela indica a localização do Município de Itaipava, situado na região de Itapetininga no sudoeste paulista (A). Fonte: Fundo de Defesa da Citricultura (2019). Imagem de drone do campo experimental, demonstrando os quatro blocos experimentais utilizados para avaliar os produtos comerciais à base de *Bacillus* no controle da podridão floral dos citros (B).

O campo experimental foi conduzido adotando o delineamento em blocos casualizados, com sete tratamentos e quatro repetições. Cada bloco foi composto de três linhas de plantio e, cada parcela dentro dos blocos composta por 10 plantas por linha, totalizando 30 plantas por parcela. As parcelas úteis estavam dispostas nas linhas centrais, sendo definida pelas cinco plantas mais centrais na linha central. As linhas externas aos blocos foram consideradas como bordaduras, assim como as cinco plantas no início e fim de cada linha.

Cinco fungicidas microbiológicos comerciais formulados à base de *Bacillus* (Tabela 1) foram avaliados em aplicações realizadas ao longo do florescimento, iniciando na fase de botões verdes e fechados (R1/R2) até o estágio de queda de pétalas, estigma e estile (R6/R7), conforme descrito por Silva Junior et al. (2014). Foram realizadas quatro aplicações dos tratamentos (30/07/2020, 14/08/2020; 19/08/2020 e 24/08/2020) visando o controle do inóculo natural das plantas. Devido à ausência de sintomas oriundos do inóculo natural da área, em 03/09/2020 foi realizada a quinta aplicação dos produtos com posterior inoculação do patógeno (24 horas após) em ramos marcados. A mistura de tebuconazol + trifloxistrobina (Nativo) aplicada na dose de $4,0 + 2,0$ mg de i.a./m³ de copa foi utilizada como o tratamento padrão do produtor (Rodriguez, 2016), nos mesmos intervalos e volumes usados para os produtos biológicos. Plantas não pulverizadas serviram como controles (sem aplicação).

Tabela 1. Fungicidas microbiológicos à base de *Bacillus*, com as respectivas concentrações de células (unidades formadoras de colônia - UFC/mL), doses (em L p.c./2000 L) e fungicida, avaliados no controle da podridão floral dos citros em laranjeiras em casa de vegetação e em pomar comercial, no sudoeste paulista.

Produto comercial	Composição	Concentração (UFC/mL)	Empresa	Dose (L /ha)
Serenade®	<i>Bacillus subtilis</i> QST 713	1×10^7	Bayer	2,0
Biovar®	<i>Bacillus subtilis</i> PRBS-1	3×10^8	Biotrop	2,0
Biotrio®	<i>B. subtilis</i> + <i>B. pumilus</i> + <i>B. amyloliquefaciens</i>	$1 \times 10^8 + 1 \times 10^8 + 1 \times 10^8$	Biotrop	2,0
Bio-Imune®	<i>Bacillus subtilis</i> BV-02	3×10^9	Vittia	2,0
Twixx®	<i>B. amyloliquefaciens</i> CPQBA 040-11DRM 01 CPQBA 040-11DRM 04	2×10^9	Agrivalle	2,0
Nativo®	10% Trifloxistrobina + 20% tebuconazol	-	Bayer	0,8
Testemunha				

As aplicações foram realizadas com turbo-pulverizador modelo Arbus 4000 (Jacto – Pompéia, SP), com ramal contendo 27 pontas modelo MGA 02 60° (Magnojet, Ibaiti, PR). A pressão de trabalho foi de 120 libras, a vazão por ponta de 1,2 litros de calda por minuto e a velocidade média de aplicação de 5,5 km/hora. O volume de calda foi de aproximadamente 40 mL por m³ de planta, de acordo com a metodologia TRV. Esse volume representou 825 litros de calda por hectare.

Ramos reprodutivos com no mínimo 10 botões expandidos e flores abertas (R4 e R5) foram marcados um dia após a última aplicação dos tratamentos (04/09/2020) e inoculados com *C. abscissum* com pulverizador manual. A suspensão de *C. abscissum* foi ajustada para a concentração de 10^5 conídios/mL (Figura 3). Os ramos foram marcados nas duas plantas centrais da linha central de cada parcela, sendo selecionados 10 ramos por parcela. Os ramos inoculados permaneceram individualmente ensacados com saco plástico transparente durante 24 horas. A incidência de flores com sintomas de PFC (total de flores abertas sintomáticas em relação ao total de flores abertas no ramo) foi avaliada cinco dias após a inoculação do patógeno, quando mais de 50% dos botões encontravam-se na fase de flor aberta (R5). O número de cálices retidos por ramo marcado foi avaliado 90 dias após a inoculação (Pavin Junior, 2014; Silva Junior et al., 2014).



Figura 3. Inoculação da suspensão de conídios de *Colletotrichum abscissum* em ramos de laranjeiras doces ‘Natal’, em Itai, SP (A e B). Câmara úmida com saco plástico nos ramos inoculados com patógeno e mantida por 24 horas (C).

2.3 Análise dos dados

Análise conjunta dos dados obtidos nos dois experimentos de casa de vegetação foi realizada utilizando o critério dos resíduos dos quadrados médios (Barbosa & Maldonado Júnior, 2015). As porcentagens médias de flores sintomáticas e de cálices retidos observados em casa de vegetação e no experimento de campo foram submetidas à análise de variância e comparadas ao teste de Tukey à 5% de probabilidade. Para as análises estatísticas foi utilizado o software AgroEstat, versão 1.1.0714, 2014.

2.4 Coleta de dados climáticos

No experimento conduzido em pomar comercial, os dados de temperatura, precipitação, umidade relativa do ar e período de molhamento foram registrados por uma estação meteorológica da marca Metos, modelo iMetos 3.3 (Pessl Instruments, Áustria) instalada na propriedade em uma distância de 1 km do campo experimental.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Experimentos em casa de vegetação

A incidência média de flores sintomáticas nos dois experimentos nos ramos inoculados com *C. abscissum*, mas sem aplicação de produtos foi de 100% (Figura 4). Os cinco fungicidas microbiológicos comerciais à base de *Bacillus* spp. Bio Imune, Biotrio, Biovar, Serenade e

Twixx aplicados preventivamente nas flores na dose de 2 L p.c./ha não foram eficientes para reduzir significativamente a incidência de PFC nas flores ($p>0,05$). As incidências médias de flores doentes nos ramos tratados com cada um dos cinco produtos biológicos variaram de 85 a 100% e não diferiram significativamente da porcentagem de flores doentes observada nos ramos de plantas não pulverizadas (Figura 4). Em contrapartida, a proteção das flores com a mistura dos fungicidas tebuconazol e trifloxistrobina foi eficiente em reduzir a incidência de PFC, que apresentou média de 23.3% de flores sintomáticas (Figura 4).

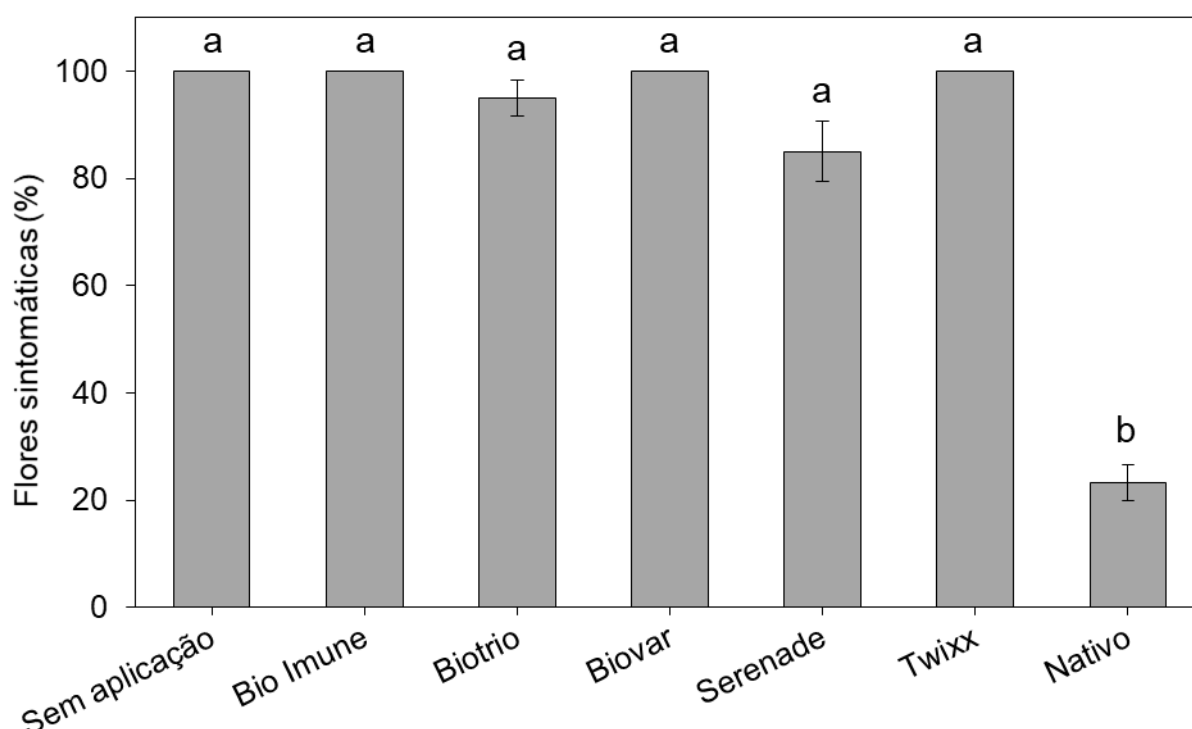


Figura 4. Porcentagem média de flores sintomáticas em ramos reprodutivos de plantas de laranja doce ‘Valência’ cultivadas em casa de vegetação. Os ramos foram tratados com fungicidas microbiológicos à base de *Bacillus* spp. (Bio-Imune®, Biotrio®, Biovar®, Serenade® e Twixx®) ou com a mistura de tebuconazol + trifloxistrobina (Nativo®) e inoculados com suspensão de conídios de *Colletotrichum abscissum*. Ramos não pulverizados com produtos e inoculados com o fungo foram utilizados como controle (sem aplicação). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p=0,05$). Barras indicam o erro padrão da média.

Nos ramos inoculados com *C. abscissum* e sem proteção de fungicidas microbiológicos, a porcentagem de botões florais que resultou em cálices retidos foi de 83.3% (Figura 5). Essa incidência de cálices retidos não diferiu significativamente ($p>0,05$) daquelas observadas para os ramos tratados com os cinco fungicidas microbiológicos à base de *Bacillus* spp., que

variaram de 75% a 98.3% de cálices retidos (Figura 5). Os ramos pulverizados com a mistura tebuconazol + trifloxistrobina apresentaram incidência média de 25% de cálices retidos e diferiram significativamente dos valores observados em ramos protegidos com fungicidas microbiológicos ou sem proteção (Figura 5).

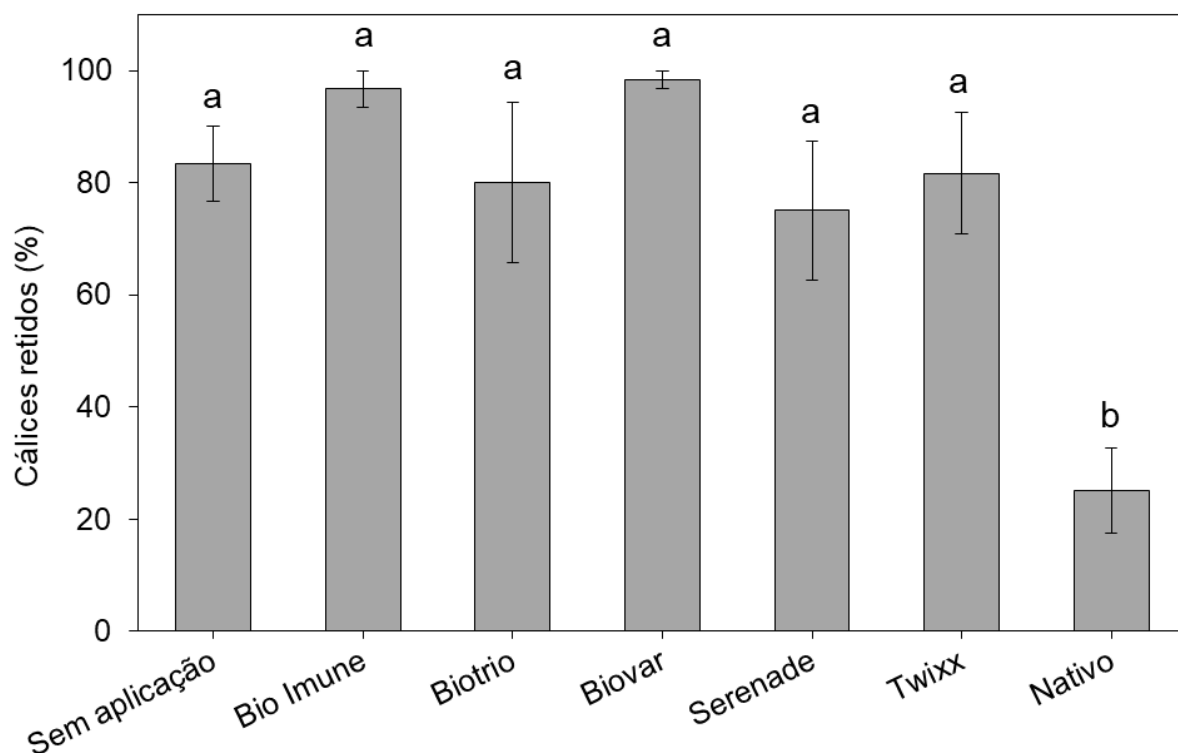


Figura 5. Porcentagem média de cálices retidos em ramos reprodutivos de plantas de laranja doce ‘Valência’ cultivadas em casa de vegetação. Os ramos foram tratados com fungicidas microbiológicos à base de *Bacillus* spp. (Bioimune®, Biotrio®, Biovar®, Serenade® e Twixx®) ou com a mistura de tebuconazol + trifloxistrobina (Nativo®) e inoculados com suspensão de conídios de *Colletotrichum abscissum*. Ramos não pulverizados com produtos, mas inoculados com o fungo foram utilizados como controle (sem aplicação). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p=0,05$). Barras indicam o erro padrão da média.

Em casa de vegetação, onde as condições climáticas são mais controladas e não há ocorrência de chuvas, o controle químico preventivo com a aplicação da mistura de triazol + estrobilurina, que é comumente adotado pelos citricultores paulistas, se mostrou eficiente para controlar a PFC com redução significativa tanto na incidência de flores doentes quanto de cálices retidos. Resultados similares com essa mistura de fungicidas em ensaios de casa de vegetação também foram obtidos por Pavin Junior (2014). Em contrapartida, os fungicidas microbiológicos à base de *Bacillus* não foram eficientes no controle da doença sob essas

condições. Em citros não há trabalhos com avaliação desses produtos aplicados em casa de vegetação para o controle da podridão floral, mas na cultura da maçã, redução significativa dos sintomas da mancha foliar de *Glomerella* (*C. acutatum*) foi observada em condições de casa de vegetação. As mudas foram tratadas preventivamente com diferentes isolados de *Bacillus* spp. e verificou-se que houve diminuição do número de lesões e a quantidade máxima de doença (Moreira, 2013).

3.2 Experimento em pomar comercial

3.2.1 Dados climáticos

Durante o florescimento que durou cerca de 43 dias, somente no período compreendido entre o 15° e o 22° dia (13 e 20 de agosto de 2020) foi registrada precipitação acumulada de aproximadamente 100 mm. Neste período foram observados valores entre 14 e 24 horas de molhamento em todos os dias (Figura 6). Nesse período chuvoso com molhamento prolongado, as temperaturas foram reduzidas para valores próximos a 5°C, o que provavelmente inibiu a germinação dos conídios de *C. abscissum* e afetou negativamente a infecção das pétalas pelo patógeno, uma vez que poucos sintomas foram observados na semana seguinte. Em virtude desta condição de temperatura muito baixa e ausência de sintomas na semana compreendida entre o 23° e 36° dia, inoculação artificial de suspensão de esporos de *C. abscissum* foi realizada no 37° dia de florescimento. A inoculação do patógeno foi realizada com temperatura em torno de 22°C durante a câmara úmida de 24 horas. Nenhum evento de chuva ocorreu desde a quinta pulverização dos produtos no 36° dia até a avaliação dos sintomas no 43° dia (Figura 6).

A primeira aplicação dos fungicidas microbiológicos foi realizada em 30/07/2020 (1° dia) com temperatura média de 16°C e umidade relativa (UR) de 72%. A segunda aplicação foi no 16° dia com média de 21,8°C e UR de 76%, tendo registrado 2,6 mm de precipitação no período. A terceira aplicação foi no 21° dia com temperatura de 17,3°C, UR de 88% e 6 mm de precipitação. A quarta aplicação no 26° dia com temperatura de 19,4°C e UR de 59%. A quinta aplicação dos fungicidas microbiológicos foi realizada no 36° dia, um dia antes da inoculação de *C. abscissum*, com temperatura média de 27°C e UR média de 50%.

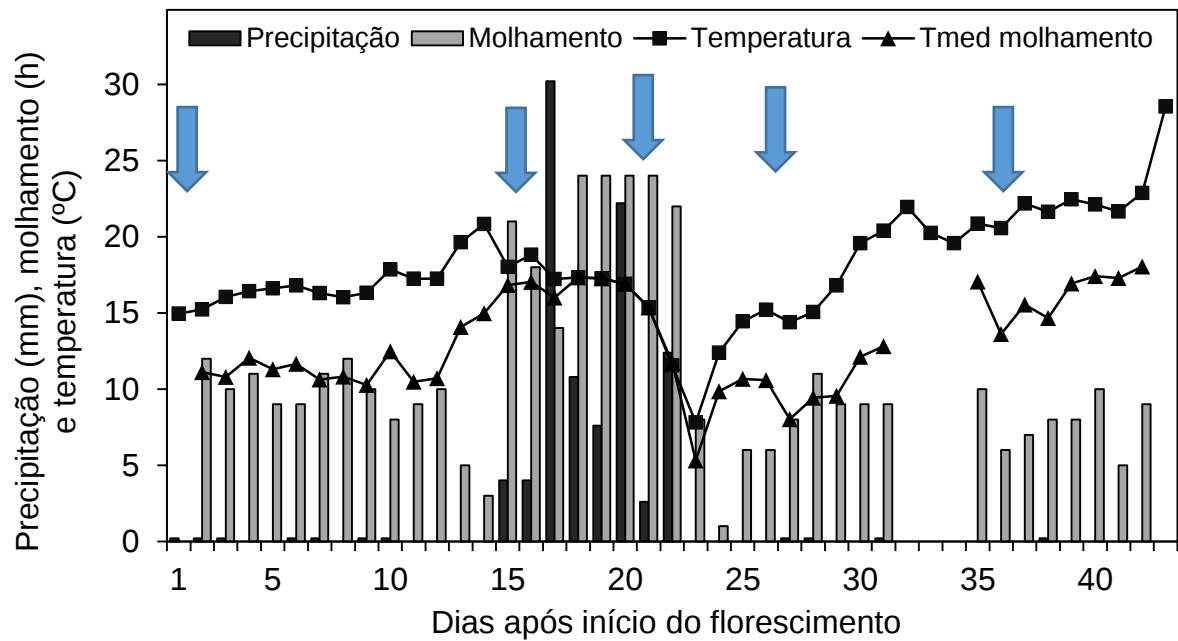


Figura 6. Precipitação (mm), duração do período de molhamento diário (horas), temperatura média diária (°C) e temperatura média durante o período de molhamento (°C) registrados por estação meteorológica instalada na área experimental durante o florescimento de plantas de laranjeira Natal, em Itaipava/SP. Dia 01 corresponde a 30/07/2020. As setas em azul correspondem às aplicações dos produtos.

3.2.2 Inoculação artificial em condições de campo

Os resultados obtidos no experimento de campo seguiram a mesma tendência observada para os quatro experimentos conduzidos em casa de vegetação. As plantas que não foram pulverizadas com produtos apresentaram, em média, 42% de flores sintomáticas. Essa incidência não diferiu significativamente daquelas observadas em plantas que foram pulverizadas com fungicidas microbiológicos à base de *Bacillus* spp., que variaram de 34 a 43% de flores com sintomas de podridão floral (Figura 7). Os ramos de plantas tratadas com a mistura de triazol + estrobilurina apresentaram incidência média de flores sintomáticas de 6,6%, valor significativamente inferior aos observados nos ramos tratados com produtos biológicos ou não tratados (Figura 7).

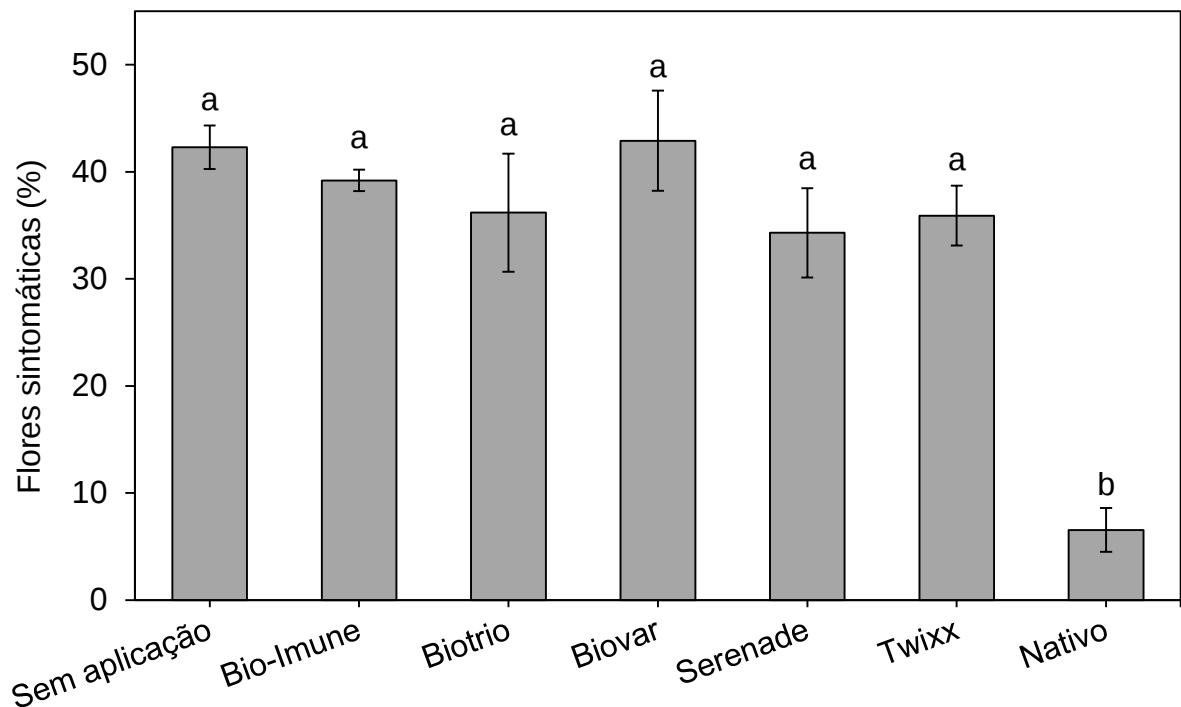


Figura 7. Porcentagem média de flores sintomáticas em ramos reprodutivos de plantas de laranja doce ‘Natal’ em pomar comercial em Itai/SP, pulverizadas com fungicidas microbiológicos à base de *Bacillus* spp. (Bioimune[®], Biotrio[®], Biovar[®], Serenade[®] e Twixx[®]) ou com a mistura de tebuconazol + trifloxistrobina (Nativo[®]) em cinco aplicações durante o florescimento. Os ramos foram inoculados com suspensão de conídios de *Colletotrichum abscissum* um dia após a quinta aplicação na fase de botão expandido (R4). Ramos não pulverizados com os fungicidas, mas inoculados com o fungo foram utilizados como controle (sem aplicação). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p=0,05$). Barras indicam o erro padrão da média.

As porcentagens médias de cálices retidos nos ramos de plantas tratadas com os fungicidas microbiológicos foram similares e variaram de 22 a 28%. Esses valores não diferiram significativamente dos 24% de cálices retidos observados nos ramos que não receberam aplicação de fungicida (Figura 8). Por outro lado, os ramos de plantas pulverizadas com a mistura de triazol + estrobilurina apresentaram incidência de 5,5% de cálices retidos (Figura 8).

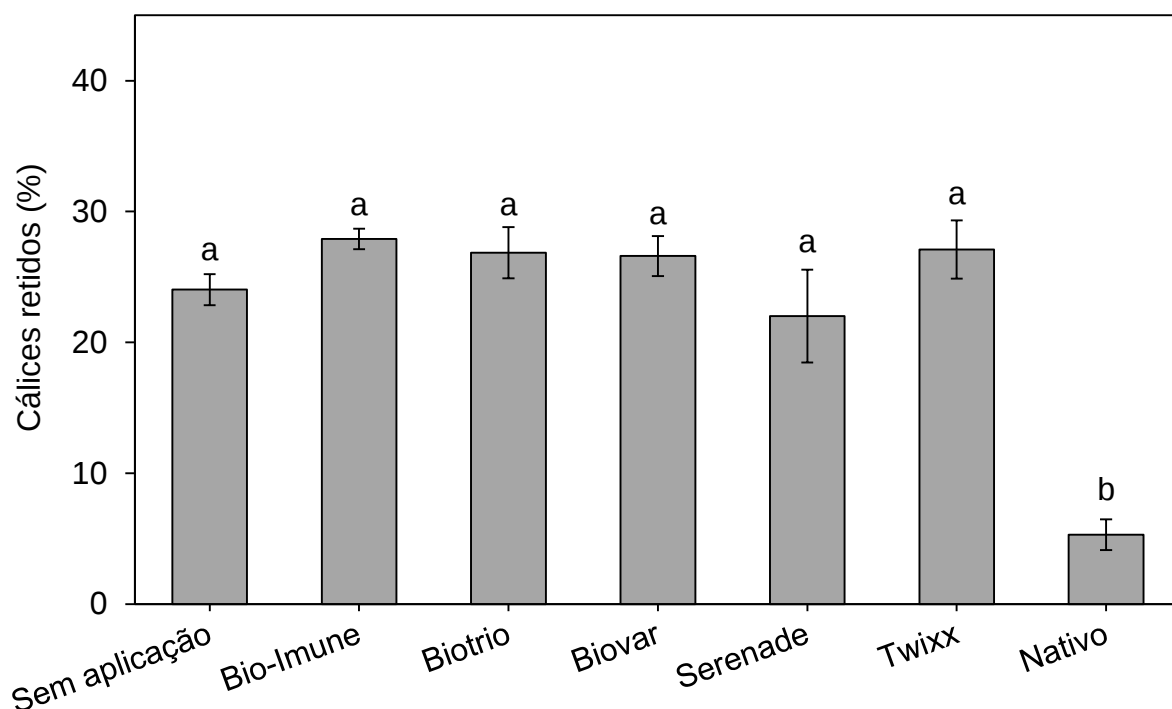


Figura 8. Porcentagem média de cálices retidos em ramos reprodutivos de plantas de laranja doce ‘Natal’, em pomar comercial em Itaí/SP, pulverizadas com fungicidas microbiológicos à base de *Bacillus* spp. (Bioimune®, Biotrio®, Biovar®, Serenade® e Twixx®) ou com a mistura de tebuconazol + trifloxistrobina (Nativo®) em cinco aplicações durante o florescimento. Os ramos foram inoculados com suspensão de conídios de *Colletotrichum abscissum* um dia após a quinta aplicação na fase de botão expandido (R4). Ramos não pulverizados com os fungicidas, mas inoculados com o fungo foram utilizados como controle (sem aplicação). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p=0,05$). Barras indicam o erro padrão da média.

Os resultados obtidos nesse estudo são semelhantes aos observados por Kupper et al. (2003a) que demonstrou que a maioria dos isolados testados de *B. subtilis* não promoveram o controle da podridão floral no campo, possivelmente devido às condições favoráveis para o desenvolvimento do patógeno. Outros experimentos em campo com fungicidas microbiológicos comerciais à base de *Bacillus* spp. no controle de doenças de parte aérea também demonstraram as dificuldades na obtenção do controle efetivo e satisfatório do patógeno. Em maçã, tanto a cepa de *B. subtilis* obtida em pomares comerciais, quanto o produto comercial à base de *B. subtilis* (Serenade®), não apresentaram controle eficiente da mancha foliar de *Glomerella* causada por *C. acutatum* (Moreira, 2013). As causas mais prováveis para a dificuldade de obtenção de controle de doenças do filoplano em condições de campo estão associadas principalmente as condições favoráveis ao patógeno e adversas aos agentes de biocontrole. No caso do *Bacillus* spp., as principais condições adversas para o estabelecimento

de populações da bactéria no filoplano são relacionadas ao ambiente e à superfície dos tecidos que impedem o estabelecimento das populações e consequentemente acarretam falhas no controle. Na cultura da pera, Stockwell et al. (1998) observaram que as bactérias utilizadas como agentes de controle biológico de um importante fitopatógeno do filoplano (*Erwinia amylovora*) não estavam totalmente dispersas nas superfícies dos tecidos. De acordo com esses autores, essa cobertura reduzida pode ter ocorrido pela influência da disponibilidade de nutrientes, da radiação UV, das variações de temperatura e das condições de umidade.

Na literatura são encontrados alguns trabalhos conduzidos com concentrações mais altas de *Bacillus* com o objetivo de aumentar a eficiência dos ACBs. Em estudo com o isolado ACB-69 de *B. subtilis* foram utilizadas concentrações mais altas em diferentes formulações do produto e foi constatado controle eficiente da PFC (Correa, 2010). As aplicações foram realizadas durante o período de florescimento com 10^{13} UFC/L e volume de calda de 8 L por planta. Tanto a concentração quanto o volume de calda foram superiores aos utilizados em nosso estudo que variou de 10^{11} a 10^{12} UFC ou endósporo/L e volume de calda de 1,5 L por planta ou 800 L/ha, que representou 40 mL de calda por m³ de copa.

Os produtos comerciais à base de *Bacillus* foram aplicados nos volumes de calda adotados comumente pelos citricultores paulistas para o controle químico da PFC. Esses volumes mais baixos são utilizados em velocidades mais altas (até 7 km/h), de forma a otimizar o rendimento operacional, uma vez que a PFC é uma doença com epidemias explosivas que requer tomada de decisão de manejo rápida e assertiva. Assim, a preconização de volumes de calda mais elevados no manejo da PFC para aplicação de produtos biológicos poderia acarretar redução do rendimento operacional, principalmente em grandes propriedades, com possível impacto negativo no manejo da doença (Soares, 2015). Vale ressaltar que, quando o florescimento das plantas de citros coincide com períodos de chuvas intensas e frequentes, todos os pomares de uma propriedade devem ser pulverizados rapidamente, sendo recomendado aplicar o fungicida no máximo 24h após a condição favorável para a germinação dos esporos e infecção das flores (Pavin Junior, 2014; Silva Junior, 2019).

O controle químico da PFC nos pomares paulistas é realizado com aplicações de triazóis, estrobilurinas ou a misturas dos dois grupos. O custo dos produtos comerciais formulados com a mistura de triazol + estrobilurina é de aproximadamente R\$ 60,00 por aplicação por hectare e esses produtos apresentam eficiência de redução dos sintomas de PFC em até 90% (Silva Junior et al., 2014; Soares, 2015; Gama et al., 2019). Os produtos comerciais à base de *Bacillus* quando utilizados na concentração de 2 L/ha custam em média R\$ 120,00 por aplicação por hectare. Os ACBs testados apresentam o dobro de custo e eficiência muito inferior quando

comparados ao tratamento químico com a mistura de fungicidas. Embora seja necessária a avaliação desses ACBs em concentrações mais altas de forma a identificar a mais eficiente no controle da PFC no campo, vale destacar que, o custo dos produtos na dose adequada poderá ser muito alto e a aceitação por parte dos citricultores reduzida.

A adição de talco, ureia e molibdato de amônio aos produtos à base de *Bacillus* tem sido avaliada como estratégia para aumentar a eficiência de controle tanto do *C. abscissum* *in vitro* como dos sintomas da PFC no campo (Klein, 2012). De acordo com este estudo, possivelmente estes aditivos quando adicionados à calda podem aumentar a produção de metabólitos produzidos por *Bacillus* e, conseqüentemente, contribuir para aumentar o controle da doença. A adição talco + ureia ao isolado ACB-69 de *B. subtilis* proporcionou controle similar ao do fungicida tiofanato metílico no controle da PFC (Klein et al., 2016). Adicionalmente, a seleção de potenciais ACBs diretamente da parte aérea de plantas em pomares comerciais de citros poderia potencializar a atividade antagônica as mesmas contra *C. abscissum*, por serem mais tolerantes e aclimatadas às condições climáticas adversas. Na cultura da maçã, isolado da bactéria *Pseudomonas putida* obtido da parte área de macieiras e aplicado semanalmente foi eficiente em reduzir o progresso da severidade da mancha foliar da *Glomerella*, causada por *C. acutatum* (Moreira, 2013).

Diferentes estudos têm demonstrado que o uso de ACBs, principalmente à base de *Bacillus* spp., além de apresentarem controle direto sobre os fitopatógenos, podem aumentar a massa das plantas e a produção (Hu et al., 2020), bem como induzir resistência das plantas aos patógenos (Chen et al., 2020). Portanto, mais estudos são necessários para avaliar as concentrações necessárias da bactéria para obtenção de efeito antagônico satisfatório em condições de campo, o uso de aditivos nas caldas com os ACBs, bem como os efeitos desses produtos na indução de resistência e na produção de plantas de citros. Adicionalmente, a eficácia dos bioprodutos aplicados no fim da tarde ou à noite, quando as temperaturas são mais amenas, a umidade do ar é geralmente superior a 90% e a planta permanece molhada, poderia ser avaliada em trabalhos futuros. Nesse estudo, as condições ambientais variaram consideravelmente entre as cinco aplicações realizadas no campo de maneira similar às aplicações dos fungicidas convencionais, porém as aplicações foram realizadas em condições ideais de clima, com temperaturas geralmente inferiores a 30°C e umidades superiores a 55% (Scapin & Ramos, 2017). A continuidade dos estudos com ACBs em citros é importante para verificar se algum produto biológico comercial pode apresentar eficiência satisfatória no controle da PFC. O aumento de dose do produto ou do volume de calda, o uso de aditivos, ou ainda a associação dos ACBs com o controle químico, são alternativas de tratamentos a serem

avaliados em futuros campos experimentais na tentativa de tornar os fungicidas microbiológicos estratégias eficientes e sustentáveis para o manejo desta importante doença que afeta as flores e causa danos consideráveis à produção das plantas de citros tanto no Brasil quanto em outros países das Américas.

4. CONCLUSÃO

Os cinco fungicidas microbiológicos à base de *Bacillus* aplicados em plantas de laranja doce em casa de vegetação e no campo, na dose de 2,0 L/2000 L de água, com posterior inoculação artificial de *C. abscissum*, não foram eficientes em controlar a podridão floral dos citros.

REFERÊNCIAS

- Amorim, E.P.R., Melo, I.S. de. 2002. Ação antagonica de rizobactérias contra *Phytophthora parasitica* e *P. Citrophthora* e seu efeito no desenvolvimento de plântulas de citros. **Revista Brasileira de Fruticultura** 24(2):565-568.
- Andric, S., Meyer, T., Ongena, M. 2020. *Bacillus* responses to plant-associated fungal and bacterial communities. **Frontiers in Microbiology** 11:1-9.
- Arrebola, E., Sivakumar, D., Korsten, L. 2010. Effect of volatile compounds produced by *Bacillus* strains on postharvest decay in citrus. **Biological control** 53:122-128.
- Baker, C. J., Stavely, J. R., Thomas, C. A., Sasser, M., MacFall, J. S. 1983 Inhibitory effect of *Bacillus subtilis* on *Uromyces phaseoli* and on development of rust pustules on bean leaves. **Phytopathology** 73:1148-1152
- Banik, S., Jambhulkar, P. 2015. Biological control of diseases in field crops: status and concerns. **Agrotechnology** 2:336-352.
- Barbosa, J.C., Maldonado Júnior, W. 2015. **Experimentação Agronômica & AgroEstat: sistemas para análises estatísticas de ensaios agronômicos**. Jaboticabal: FUNEP. 396 p.
- Bettiol, W., Garilbaldi, A., Migheli, Q. 1997. *Bacillus subtilis* for the control of powdery mildew on cucumber and zucchini squash. **Bragantia** 56(2):281-287.
- Brasil. 2020. **AGROFIT: Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários**. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 12 ago. 2020.
- Cawoy, H., Debois, D., Franzil, L., De Pauw, E., Thonart, P., Ongena, M. 2011. Lipopeptides as main ingredients for inhibition of fungal phytopathogens by *Bacillus subtilis*/*amyloliquefaciens*. **Microbiol Technology** 8(2):281-295.
- Chen, K., Tian, Z., Luo, Y., Cheng, Y., Long, C. 2018. Antagonistic Activity and the Mechanism of *Bacillus amyloliquefaciens* DH-4 Against Citrus Green Mold. **Biological control** 108:1253-1262.
- Chen, K., Tian, Z., Hec. H., Longb, C. Jianga, F. 2020. *Bacillus* species as potential biocontrol agents against citrus diseases. **Biological control** 151:104419.
- Chitolina, G.M., Silva-Junior, G.J., Feichtenberger, E., Pereira, R.G., Amorim, L. 2021. Distribution of *Alternaria alternata* isolates with resistance to quinone outside inhibitor (QoI) fungicides in Brazilian orchards of tangerines and their hybrids. **Crop Protection** 141: 105493
- Cock, M.J.W., van Lenteren, J.C., Brodeur, J., Barratt, B.I.P., Bigler, F., Bolckmans, K., Cònsoli, F.L., Haas, F., Mason, P.G., Parra, J.R.P. 2010. Do new access and benefit sharing procedures under convention on biological diversity threaten the future of biological control? **Biocontrol** 55:199-218

Cook, R.J. 1985. Biological control of plants pathogens: theory to application. **Phytopathology** 75(1):25-29.

Correa, F.E. 2010. Viabilidade prática de *Bacillus subtilis* para controle biológico de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. 57 f. **Dissertação de Mestrado**. Araras, SP: Universidade Federal de São Carlos.

Croplife. 2021. **Produtos biológicos registrados**. São Paulo: CropLife Brasil. Disponível em <<https://croplifebrasil.org/publicacoes/produtos-biologicos-registrados/>>. Acesso em: 10 fev. 2021.

Embrapa. 2020. **Controle biológico**. Brasília: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/tema-controle-biologico/sobre-o-tema>>. Acesso em: 20 ago. 2020.

Fan, B., Wang, C., Song, X., Ding, X., Wu, L., Wu, L., Gao, X., Borriss, R. 2018. *Bacillus velezensis* FZB42 in 2018: The Gram-Positive Model Strain for Plant Growth Promotion and Biocontrol. **Frontiers in Microbiology** 9:2491.

Forcelini, B.B., Seijo, T.E., Amiri, A., Peres, N.A. 2016. Resistance in strawberry isolates of *Colletotrichum acutatum* from Florida to quinone-outside inhibitor fungicides. **Plant Disease** 100(10):2050-2056.

Fundo de Defesa da Citricultura. 2019. **Estimativa da Safra de Laranja 2019/2020 do Cinturão Citrícola de São Paulo e Triângulo/Sudoeste Mineiro**. Araraquara: Fundecitrus. Disponível em: <https://www.fundecitrus.com.br/pdf/pes_relatorios/2019_05_10_Sumario_Executivo_da_Estimativa_da_Safra_de_Laranja_2019-2020.pdf>. Acesso em: 10 jul. 2020.

Fundo de Defesa da Citricultura. 2020. **ProteCitrus**: produtos para proteção da citricultura. Araraquara: Fundecitrus. Disponível em: <<https://www.fundecitrus.com.br/protecitrus>>. Acesso em: 30 jul. 2020.

Gama, A.B., Silva Junior, G.J., Peres, N.A., Edwards Molina, J.P., Lima, L.M., Amorim, L. 2019. A threshold-based decision-support system for fungicide applications provides costeffective control of citrus postbloom fruit drop. **Plant Disease** 103:2433-2442.

Goes, A., Garrido, R.B.O., Reis, R.F., Baldassari, R.B., Soares, M.A. 2008. Evaluation of fungicide applications to sweet orange at different flowering stages for control of postbloom fruit drop caused by *Colletotrichum acutatum*. **Crop Protection** 27:71-76.

Hu, J., Zheng, M., Dang, S., Shi, M. Zhang, J., Li. Y. 2020. Biocontrol potential of *Bacillus amyloliquefaciens* LYZ69 against anthracnose of alfalfa (*Medicago sativa* L.). **Phytopathology** <https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-20-0385-R>.

Huang, Y., Wild, B.L., Morris, S.C. 1992. Postharvest biological control of *Penicillium digitatum* decay on citrus fruit by *Bacillus pumilus*. **Annals of Applied Biology** 120(2):367-372.

Huang, X., Zhang, N., Yong, X., Yang, X., Shen, O. 2012. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off disease in cucumber with *Bacillus pumilus* SQR-N43. **Microbiological Research** 167:135-143.

Ibrahim, Y.E., Saleh, A.A., El Komy, M.H., Al-Saleh, M.A., 2016. *Bacillus subtilis* QST 713, copper hydroxide, and their tank mixes for control of bacterial citrus canker in Saudi Arabia. **Journal of Citrus Pathology** 30994

Klein, M.N. 2012. Desenvolvimento de formulações de *Bacillus subtilis* para controle da podridão floral dos citros. 64 f. **Dissertação de Mestrado**. São Carlos, SP: Universidade Federal de São Carlos.

Klein, M.N., Silva, A.C., Kupper, K.C. 2016. *Bacillus subtilis* based-formulation for the control of postbloom fruit drop of citrus. **Word Journal Microbiology Biotechnology** 32(12):205.

Kupper, K.C., Gimenes-Fernandes, N., Goes, A. de. 2003a. Controle biológico de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. **Fitopatologia Brasileira** 28:251-257.

Kupper, K.C., Corrêa, E.B., Moretto, C., Bettiol, W., de Goes, A. 2003b. Controle de *Guignardia citricarpa* por *Bacillus subtilis* e *Trichoderma* spp. **Revista Brasileira de Fruticultura** 33(4):1111-1118.

Lanna Filho, R., Ferro, H.M., Pinho, R.S.C. de, 2010. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. **Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas** 4(2):12-20.

Lima, W.G., Sposito, M.B., Amorim, L., Gonçalves, F.P., Melo Filho, P.A. 2011. *Colletotrichum gloeosporioides*, a new causal agent of post-bloom fruit drop. **European Journal of Plant Pathology** 131:157-165.

Marques, J.P.R., Amorim, L., Spósito M.B., Appezzato-da-Glória, B. 2013. Histopathology of postbloom fruit drop caused by *Colletotrichum acutatum* in citrus flowers. **European Journal of Plant Pathology** 135:783-90.

Medeiros, F.H.V., Silva, J.C.P., Pascholati, S.F. 2018. Controle biológico de doenças de plantas. In: Amorim, L., Bergamin Filho, A., Rezende, J.A.M. (Ed.). **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. Minas Gerais: Agronômica Ceres. p. 261-274.

Melo, I.A., Azevedo, J.L. 1998. **Controle Biológico**. Jaguariúna: Embrapa. 264 p.

Moreira, R.R. 2013. *Bacillus* spp. e *Pseudomonas* sp. no biocontrole de *Colletotrichum* do grupo *acutatum*, causador da mancha foliar de glomerella em macieira. 108 f. **Dissertação de Mestrado**. Curitiba, PR: Universidade Federal do Paraná.

Munimbazi, C., Bullerman, L.B. 1998. Isolation and partial characterization of antifungal metabolites of *Bacillus pumilus*. **Journal of Applied Microbiology** 84(6):959-968.

Ongena, M., Jaques, P. 2007. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. **Trends in Microbiology** 16(3):115-125.

Pal, K.K., Gardener, B.M. 2006. Biological control of plants pathogens. **The Plant Health Instructor** 2:1-25.

Pavin Junior, W. 2014. Momento de aplicação de fungicida em relação à condição favorável para a podridão floral dos citros em casa de vegetação e no campo. 26 f. **Dissertação de Mestrado**. Araraquara, SP: Fundo de Defesa da Citricultura.

Pinho, D.B., Lopes, U.P., Pereira, O.L., Silveira, A.L., Goes, A. 2015. *Colletotrichum abscissum*: Molecular re-identification of *Colletotrichum acutatum* sensu lato causing citrus postbloom fruit drop in Brazil. **Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi** 34:236-237.

Rodriguez, G.M. 2016. Pulverização eletrostática de mistura fungicida para o controle da podridão floral dos citros. 34 f. **Dissertação de Mestrado**. Araraquara, SP: Fundo de Defesa da Citricultura.

Ruangwong, O., Liang, W.J. 2011. Effect of Crude Extract from *Bacillus subtilis* LB5 Cultivated Broth on Conidial Germination of *Colletotrichum Gloeosporioides*. **International Journal of Medical, Health, Biomedical, Bioengineering and Pharmaceutical Engineering** 6(12):644-648.

Silva Junior, G.J. 2011. Podridão floral dos citros: dinâmicas temporal e espacial, sensibilidade de *Colletotrichum acutatum* a fungicidas e controle da doença. 133 f. **Tese de Doutorado**. Piracicaba, SP: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Universidade de São Paulo.

Silva Junior, G.J. 2019. **Podridão floral**: medidas essenciais de controle. Araraquara: Fundecitrus. 27 p.

Silva Junior, G.J., Spósito, M.B., Marin, D.R., Amorim, L. 2014. Efficacy and timing of application of fungicides for control of citrus postbloom fruit drop. **Crop Protection** 59:51-56.

Soares, M.A. 2015. Eficiência de volumes de calda de fungicida e da adição de adjuvantes no controle da podridão floral dos citros em pomares de laranja doce. 47 f. **Dissertação de Mestrado**. Araraquara, SP: Fundo de Defesa da Citricultura.

Spada, Luciano. 2011. Danos causados pela podridão floral dos citros em diferentes variedades de laranja doce. 28 f. **Dissertação de Mestrado**. Araraquara, SP: Fundo de Defesa da Citricultura.

Stein, T. 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. **Molecular Microbiology** 56(4):845-857.

Stockwell, V.O., Johnson, K.B., Loper, J.E. 1998. Establishment of Bacterial Antagonists of *Erwinia amylovora* on Pear and Apple Blossoms as Influenced by Inoculum Preparation. **Phytopathology** 88(6):506-513.

Timmer, L.W., Agostini, J.P., Zitko, S.E., Zulfiqar, M. 1994. Postbloom fruit drop increasingly prevalent disease of citrus in the Americas. **Plant Disease** 78:329-334.

van Lenteren, J.C., Bolckmans, K., Kohl, J., Ravensberg, W.J., Urbaneja, A. 2018. Biological control using invertebrates and microorganisms plenty of new oportunities. **Biocontrol** 63:39-59.

Vieira Junior, J.R., Fernandes, C. de F., Antunes Junior, H., Silva, M.S. da, Silva, D.S.G. da., Silva, U.O. da. 2013. **Rizobactérias como agentes de controle biológico e promotores de crescimento de plantas**. Porto Velho: Embrapa. 15 p. (Documentos 155).

Yáñez-Mendizábal, V., Viñas, I., Casals, C., Marín, S., Solsona, C., Teixidó, N. 2011. Potential of a new strain of *Bacillus subtilis* CPA-8 to control the major postharvest diseases of fruit. **Biocontrol Science and Technology** 21(4):409-426.

Zulfiqar, M., Brlansky, R.H., Timmer, L.W. 1996. Infection of flower and vegetative tissues of citrus by *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides*. **Mycologia** 88:121-128.