

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**MECANISMOS DE AÇÃO DE *Bacillus* spp. ENVOLVIDOS
NO BIOCONTROLE DE *Phyllosticta citricarpa***

Andréia Fujimoto

Bióloga

2013

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**MECANISMOS DE AÇÃO DE *Bacillus* spp. ENVOLVIDOS
NO BIOCONTROLE DE *Phyllosticta citricarpa***

Andréia Fujimoto

Orientadora: Profa. Dra. Kátia Cristina Kupper

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia Agropecuária

2013

Fujimoto, Andréia
F958m Mecanismos de ação de *Bacillus* spp. envolvidos no biocontrole de
Phyllosticta citricarpa / Andréia Fujimoto. -- Jaboticabal, 2013
v, 43 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2013
Orientadora: Katia Cristina Kupper
Banca examinadora: Margarete Camargo, Sandra Regina Ceccato
Antonini
Bibliografia

1. Enzimas hidrolíticas. 2. Metabólitos termoestáveis. 3.
Metabólitos livres de células. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 632.4:634.3

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: MECANISMOS DE AÇÃO DE *Bacillus* spp. ENVOLVIDOS NO BIOCONTROLE DE *Phyllosticta citricarpa*

AUTORA: ANDRÉIA FUJIMOTO

ORIENTADORA: Profa. Dra. KATIA CRISTINA KUPPER

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA, pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. KATIA CRISTINA KUPPER
Instituto Agrônomo de Campinas / Cordeiropolis/SP



Profa. Dra. MARGARETE CAMARGO
Departamento de Fitossanidade / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal



Profa. Dra. SANDRA REGINA CECCATO ANTONINI
Universidade Federal de São Carlos / Araras/SP

Data da realização: 31 de julho de 2013.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Andréia Fujimoto, nasceu em São Paulo, em 19 de agosto de 1986. Iniciou sua graduação em Ciências Biológicas em Março de 2007 na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho – UNESP, Campus de Jaboticabal, concluindo seu bacharelado em dezembro de 2010. Durante a graduação, estagiou junto ao Departamento de Tecnologia da mesma instituição, no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular, sob a orientação da Professora Dr^a. Maria Inês Tiraboschi Ferro e Professor Dr. Jesus Aparecido Ferro, onde realizou duas iniciações científicas, trabalhando com *Xanthomonas* spp. Em agosto de 2011, entrou no curso de pós-graduação da mesma universidade, pelo Programa de Microbiologia Agropecuária, sob orientação da Professora Dr^a. Kátia Cristina Kupper, realizando seu projeto de pesquisa na área de Fitopatologia e Controle Biológico, no Centro de Citricultura “Sylvio Moreira”/IAC, na cidade de Cordeirópolis, SP.

EPÍGRAFE

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito, nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.”

(Theodore Roosevelt)

Dedico

À minha mãe Marlene,
Pelo amor, carinho e confiança. Você é meu maior exemplo de caráter e
coragem e amo você incondicionalmente.

Ao meu tio Zé,
Pelo amor e carinho que sempre teve por mim e por acreditar no meu
trabalho. Sem você todas essas realizações não seriam possíveis, nunca
consegurei expressar o tamanho de minha gratidão.

Ao meu namorado e companheiro de tantos momentos, Luis,
Pelo grande apoio, respeito, confiança, e amor que dedicou à mim, durante
todo esse tempo, pois ao seu lado todas as conquistas se tornam nossas!

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus que me iluminou durante este período e colocou vários anjos em meu caminho.

Também agradeço à minha família que me apoiou de forma especial e carinhosa, me dando coragem e força nos momentos de dificuldade, principalmente à minha avó Amazília e minhas irmãs Ana Paula e Angela.

Quero agradecer enormemente ao meu tio, José Junqueira, que todo esse tempo me ajudou, e sem ele não teria condições de concluir meu trabalho.

E não deixando de agradecer de forma grata e grandiosa minha mãe, Marlene, a quem eu tenho amor incondicional e rogo todas as noites a minha existência.

Agradeço meu namorado, Luis Pedrinho, que me ajudou muito nos momentos de dificuldade, com muito carinho e paciência, me dando coragem e força para seguir em frente.

À todos os meus amigos, que estiveram sempre ao meu lado, me ajudando e me apoiando, agradeço. Em especial, meus companheiros de laboratório, Maria Carolina, Jéssica, Vanessa, Luriany, Tatiane, Gilmar, Aline, Mariana e Pitt. Também agradeço a todas as minhas companheiras de república, principalmente a Eleonore, a Ivi e a Danúbia.

À UNESP de Jaboticabal e ao Centro de Citricultura por terem aberto as portas para a realização deste estudo.

Agradeço a Professora Katia Kupper pela paciência na orientação e incentivo, que tornaram possível a conclusão deste trabalho.

Agradeço aos membros da banca por terem aceitado o convite, e participado desta etapa tão importante na minha vida.

Muito Obrigada!

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	ii
ABSTRACT	iii
LISTA DE TABELAS	iv
LISTA DE FIGURAS	v
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Ocorrência e Importância da Doença.....	3
2.2. Sintomatologia e Epidemiologia	3
2.3. Controle.....	6
2.4. Controle Biológico	7
2.4.1. <i>Bacillus subtilis</i> como agente de biocontrole	8
3. MATERIAL E MÉTODOS	10
3.1. Obtenção dos microrganismos.....	10
3.2. Influência dos isolados de <i>Bacillus</i> spp. no crescimento micelial de <i>Phyllosticta citricarpa</i>	10
3.3. Influência de <i>Phyllosticta citricarpa</i> no tamanho da colônia dos isolados de <i>Bacillus</i> spp.....	11
3.4. Produção de compostos voláteis pelos isolados de <i>Bacillus</i> spp	11
3.5. Produção de compostos antifúngicos termoestáveis pelos isolados de <i>Bacillus</i> spp.....	12
3.6. Produção de metabólitos livres de células pelos isolados de <i>Bacillus</i> spp.....	13
3.7. Produção de enzimas hidrolíticas pelos isolados de <i>Bacillus</i> spp.	13
3.7.1. Obtenção de parede celular de <i>Phyllosticta citricarpa</i>	13
3.7.2. Cultivo bacteriano.....	14
3.7.3. Quitinase	14
3.7.4. β -1,3-glucanase.....	15
3.7.5. Determinação de açúcares redutores.....	15
4. RESULTADOS	17
4.1. Influência dos isolados de <i>Bacillus</i> spp. no crescimento micelial de <i>Phyllosticta citricarpa</i>	17
4.2. Influência de <i>Phyllosticta citricarpa</i> no tamanho das colônias de <i>Bacillus</i> spp.....	22
4.3. Produção de compostos voláteis pelos isolados de <i>Bacillus</i> spp	25
4.4. Produção de compostos antifúngicos termoestáveis pelos isolados de <i>Bacillus</i> spp.....	26
4.5. Produção de metabólitos livres de células pelos isolados de <i>Bacillus</i> spp.....	27
4.6. Produção de enzimas hidrolíticas pelos isolados de <i>Bacillus</i> spp	28
5. DISCUSSÃO	30
6. CONCLUSÕES	35
7. REFERÊNCIAS	36

MECANISMOS DE AÇÃO DE *Bacillus* spp. ENVOLVIDOS NO BIOCONTROLE DE *Phyllosticta citricarpa*

RESUMO - A mancha preta dos frutos cítricos, causada pelo fungo *Phyllosticta citricarpa* afeta quase todas as espécies de citros, provocando problemas em sua comercialização. Sua principal medida de controle é através da utilização de fungicidas, porém devido aos impactos causados por estes, técnicas alternativas foram consideradas, como por exemplo, o controle biológico. Dessa forma, neste trabalho, avaliou-se a atividade antagônica, a produção de enzimas hidrolíticas e o efeito de metabólitos voláteis, termoestáveis e livres de células produzidos por setenta isolados de *Bacillus* spp. sobre o desenvolvimento micelial de *Phyllosticta citricarpa*. No pareamento, fungo e bactéria foram cultivados juntos e o mesmo para a produção de compostos voláteis, porém, utilizando placas de Petri bipartidas. Para a produção de compostos termoestáveis e livres de células, uma alíquota de meio cultivado com a bactéria foi adicionada ao meio de cultura e submetido à autoclavagem. Outra alíquota foi filtrada em membrana millipore e adicionada ao meio fundente. Após vertidos e solidificados os meios, discos do patógeno foram transferidos para o centro das placas e, após incubação realizou-se a medição das colônias do fungo em dois sentidos perpendiculares. No pareamento, sessenta e nove isolados de *Bacillus* spp. proporcionaram mais de 25% de inibição e para os metabólitos voláteis, vinte e sete isolados da bactéria mostraram ser capazes de controlar significativamente o desenvolvimento do fungo. Todos os isolados de *Bacillus* spp. produziram substâncias antifúngicas que suportaram a autoclavagem e proporcionaram até 98% de inibição e sessenta e nove isolados produziram metabólitos livres de células em quantidades suficientes para inibir o desenvolvimento do fungo. A produção de β -1,3-glucanase foi verificada pelos quatro isolados bacterianos testados, quando utilizado fragmentos da parede celular do fitopatógeno e a produção de quitinase não foi constatada. De acordo com os dados obtidos, o presente trabalho demonstrou o uso em potencial de isolados de *Bacillus* spp. na inibição do desenvolvimento do fungo *P. citricarpa*, através de diferentes mecanismos de ação.

Palavras-chave: enzimas hidrolíticas, cultivo pareado, metabólitos livres de células, metabólitos termoestáveis, metabólitos voláteis

MECHANISMS OF ACTION OF *Bacillus* spp. INVOLVED IN THE BIOCONTROL OF *Phyllosticta citricarpa*

ABSTRACT - The black spot of citrus caused by the fungus *Phyllosticta citricarpa* affects almost all citrus species, causing problems in their marketing. It can be primarily controlled through the use of fungicides, but due to impacts caused by these, alternative techniques have been considered, such as biological control. In this study, we have therefore evaluated the antagonistic activity, the production of hydrolytic enzymes and the effect of volatile, thermostable and free of cells metabolites, produced by seventy isolates of *Bacillus* spp. on mycelial growth of *Phyllosticta citricarpa*. In the pairing, fungus and bacteria were grown together; the same was implemented for the production of volatile compounds, however, using bipartite Petri dishes. For the production of thermostable compounds, free of cells, an aliquot of the cultured medium with the bacterium was added to the culture medium and subjected to autoclaving. Another aliquot was filtered through a millipore membrane and added to the melting medium. After the media were poured and solidified, the pathogen discs were transferred to the center of the plates and, after incubation the measurement of fungal colonies was made in two perpendicular directions. In pairing, sixty-nine isolates of *Bacillus* spp. provided more than 25% inhibition and for the volatile metabolites, twenty seven different strains were shown to be capable of controlling fungal growth significantly. All isolates of *Bacillus* spp. produced antifungal substances which sustained the autoclave and provided up to 98% inhibition and sixty-nine strains produced metabolites free of cells in amounts sufficient to inhibit the growth of the fungus. The production of β -1,3-glucanase was verified through the four bacterial strains tested, when using fragments of the cell wall of the phytopathogens and chitinase production was not detected. According to the data obtained, this study demonstrated the potential use of isolates of *Bacillus* spp. in the inhibition of the fungus *P. citricarpa* through different modes of action.

Keywords: hydrolytic enzymes, paired growth, metabolites free of cells, thermostable metabolites, volatile metabolites

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Porcentagem de inibição da colônia de <i>Phyllosticta citricarpa</i> após cultivo pareado com diferentes isolados de <i>Bacillus</i> spp. ou, sob influência de compostos antifúngicos produzidos pela bactéria. Ensaio 1.....	18
Tabela 2. Porcentagem de inibição da colônia de <i>Phyllosticta citricarpa</i> após cultivo pareado com diferentes isolados de <i>Bacillus</i> spp. ou, sob influência de compostos antifúngicos produzidos pela bactéria. Ensaio 2.....	19
Tabela 3. Porcentagem de inibição da colônia de <i>Phyllosticta citricarpa</i> após cultivo pareado com diferentes isolados de <i>Bacillus</i> spp. ou, sob influência de compostos antifúngicos produzidos pela bactéria. Ensaio 3.....	20
Tabela 4. Porcentagem de inibição da colônia de <i>Phyllosticta citricarpa</i> após cultivo pareado com diferentes isolados de <i>Bacillus</i> spp. ou, sob influência de compostos antifúngicos produzidos pela bactéria. Ensaio 4.....	21
Tabela 5. Influência de <i>Phyllosticta citricarpa</i> no tamanho das colônias de <i>Bacillus</i> spp.	23
Tabela 6. Produção de quitinase e β -1,3-glucanase por isolados de <i>Bacillus</i> spp., avaliada através da produção de açúcar redutor	29

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Curva Padrão de Glicose	16
Figura 2. Influência do isolado ACB-12 de <i>Bacillus</i> spp. no crescimento micelial de <i>Phyllosticta citricarpa</i> em cultivo pareado. 1- Testemunha, 2- Cultivo Pareado.....	22
Figura 3. Influência de <i>Phyllosticta citricarpa</i> no crescimento da colônia do isolado ACB-48 de <i>Bacillus</i> spp. em cultivo pareado. 1- Testemunha. 2- Cultivo Pareado.....	24
Figura 4. Influência de <i>Phyllosticta citricarpa</i> no crescimento da colônia do isolado ACB-08 de <i>Bacillus</i> spp. em cultivo pareado. 1- Testemunha. 2 – Cultivo pareado.....	25
Figura 5. Influência dos metabólitos voláteis do isolado ACB-19 de <i>Bacillus</i> spp. no crescimento micelial de <i>Phyllosticta citricarpa</i> . 1- Testemunha, 2- Teste de metabólitos voláteis.....	26
Figura 6. Influência dos metabólitos termoestáveis do isolado ACB-57 de <i>Bacillus</i> spp. no crescimento micelial de <i>Phyllosticta citricarpa</i> . 1- Testemunha, 2- Teste de metabólitos termoestáveis.....	27
Figura 7. Influência dos metabólitos livres de células do isolado ACB-63 de <i>Bacillus</i> spp. no crescimento micelial de <i>Phyllosticta citricarpa</i> . 1- Testemunha, 2- Teste de metabólitos livres de células.	28

1. INTRODUÇÃO

A mancha preta dos frutos cítricos (MPC), causada pelo fungo *Phyllosticta citricarpa* (McAlpine) Petrak (teleomorfo: *Guignardia citricarpa* Kiely) afeta quase todas as espécies de citros, causando depreciação estética dos frutos e consequente prejuízo na comercialização destes para consumo *in natura*. A comercialização dos frutos é afetada principalmente no mercado externo, em decorrência de barreiras fitossanitárias impostas por países da comunidade europeia, sendo considerada uma doença de grande importância econômica (AGUILAR-VILDOSO, 2002).

O uso de fungicidas constitui-se na principal medida de controle da MPC (FUNDECITRUS, 1998). O controle baseia-se, principalmente, na utilização de fungicidas protetores ou sistêmicos, isoladamente ou combinados, associados ou não a óleo mineral (CALAVAN, 1960; KOTZÉ, 1981; GOES et al., 1990; SCHUTTE et al., 1997; GOES, 1998).

O atual nível de incidência e severidade demonstrada pela doença, principalmente nos pomares cítricos do Estado de São Paulo, demonstra o nível de gravidade e as boas condições de adaptação encontradas pelo fungo, de maneira que as medidas de controle adotadas têm apenas contribuído para minimizar as perdas potenciais.

Com a redução do uso de fungicidas, devido à percepção da sociedade sobre o impacto de sua utilização sobre o ambiente e a saúde humana, agricultores e pesquisadores foram obrigados a considerar a aplicação de técnicas alternativas de controle e, dentre essas, a utilização do controle biológico de fitopatógenos pode ser uma opção. Nesse contexto, a utilização de espécies antagonistas de *Bacillus* tem sido extensivamente pesquisada, pelo fato dessas bactérias produzirem vários tipos de compostos antimicrobianos, incluindo antimicóticos e enzimas hidrolíticas (TABEMERO et al., 1994; MAWADZA et al., 2000), como quitinases e β -1,3-glucanases, que degradam a parede celular de fungos (BODENMANN et al., 1985; CHET et al., 1998), além de serem produtoras de esporos que são resistentes à dessecação, irradiação UV e solventes orgânicos.

Dados de literatura têm relatado que espécies de *Bacillus* apresentam potencial antagonístico contra diversos patógenos de várias culturas na pré e pós-colheita, (PUSEY et al., 1986, 1989; KALITA et al., 1996; SONODA & GUO, 1996; KUPPER & GIMENES-FERNANDES, 2002; COLLINS et al., 2003; KUPPER et al., 2006; KUPPER et al., 2011, 2012).

Kupper & Gimenes-Fernandes (2002) estudaram *in vitro* o potencial antagonístico de 64 isolados de *B. subtilis* contra *Colletotrichum acutatum*, em flores destacadas de lima ácida 'Tahiti'. Segundo os autores, todos os isolados da bactéria produziram substâncias antifúngicas capazes de inibirem o desenvolvimento micelial do fitopatógeno e alguns deles controlaram em 100% a doença em flores destacadas.

Em experimentos de campo realizados por Kupper et al. (2011), os autores mencionaram a potencialidade de dois isolados de *Bacillus subtilis* (ACB-69 e ACB-AP3) em controlar a mancha preta dos citros, porém relataram que mais estudos deveriam ser realizados, visando a seleção de isolados mais eficientes.

Diante do exposto, este trabalho teve por objetivo estudar alguns mecanismos de ação de isolados de *Bacillus spp.* que pudessem estar envolvidos no biocontrole do fungo *Phyllosticta citricarpa*, de maneira a se encontrar isolados mais eficientes para o controle da mancha preta dos citros.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Ocorrência e Importância da Doença

A mancha preta dos citros afeta todas as espécies de citros, com exceção da laranja azeda (*C. aurantium* L.) e seus híbridos que não apresentam susceptibilidade. O fungo, mesmo estando na área do pomar, pode demorar de 5 a 30 anos para provocar a doença e se espalhar de forma epidêmica (KOTZÉ, 1981; KOTZÉ, 1996).

A doença foi inicialmente descrita na Austrália nas proximidades da cidade de Sidney no ano de 1895, sendo responsável por grandes perdas com relação a frutos de laranjeira da variedade Valência (KIELY, 1948). Em 1925, foi constatada na província de Natal, na África do Sul (DOIDGE, 1929). Nos anos posteriores, ela foi detectada em diversos continentes como Ásia (China, Filipinas, Indonésia, Taiwan e Japão), África (Swazilândia, Zimbábue e Moçambique) e América do Sul (Argentina, Peru e Brasil) (KOTZÉ, 1988; FEICHTENBERGER, 1996; FEICHTENBERGER et al., 1997).

A mancha preta dos citros é de grande importância econômica, pois causa depreciação estética dos frutos e acarreta prejuízos na comercialização dos frutos in natura no mercado externo em decorrência das barreiras fitossanitárias impostas por países, como a Comunidade Europeia. Quando ocorre alta infecção na região do pedúnculo de frutos em desenvolvimento, pode haver queda prematura refletindo também, desta maneira, na produção (AGUILAR-VILDOSO, 2002).

2.2. Sintomatologia e Epidemiologia

A mancha preta dos citros é uma doença causada por um fungo, cuja fase sexual ou perfeita do fitopatógeno foi descrita em 1948 (KIELY, 1948), sendo denominada *Guignardia citricarpa* Kiely e a forma assexual ou imperfeita, denominada *Phyllosticta citricarpa*, descrita em 1889 por McAlpine (MCONIE, 1964).

Os órgãos atacados pelo patógeno são em ordem de frequência, os frutos, folhas, pedúnculos, pecíolos, ramos verdes e espinhos. Uma das principais características desta doença é a ausência de sintomas típicos nos tecidos vegetais mesmo estando infectados (AGUILAR-VILDOSO, 2002).

O surgimento de sintomas nos frutos pode demorar até um ano (fase latente), dependendo da variedade e das condições ambientais. O aparecimento é favorecido pela luminosidade combinada com altas temperaturas, sendo comum encontrar frutos com maior número de lesões na face exposta à luz do sol. Há vários tipos de lesões, nomeadas de acordo com suas características, que podem variar dependendo do tamanho, fase de maturação do fruto, condições climáticas e tipo de esporo responsável pela infecção (GÓES, 1998; FUNDECITRUS, 2000).

O sintoma mais típico e comum da doença é a mancha preta ou mancha dura, a qual geralmente surge quando os frutos iniciam a fase de mudança de cor da casca, levando a maturação externa. As lesões nos frutos são deprimidas, com bordas bem definidas, tendo centro acinzentado e pontos escuros que constituem as frutificações (picnídios) do fungo. Em frutos verdes, as lesões apresentam um círculo amarelo ao seu redor. Frutos colhidos e infectados, porém assintomáticos, podem apresentar os sintomas posteriormente, no entanto não exibindo áreas deprimidas e pontuações negras. Outro sintoma, denominado de mancha marrom ou sardenta ocorre em frutos maduros e em pós-colheita. O sintoma é caracterizado por pequenas lesões de coloração pardo-avermelhadas, levemente deprimidas, com bordas definidas e formato irregular, normalmente não apresenta as frutificações do patógeno (GÓES, 1998; FUNDECITRUS, 2000).

A mancha virulenta é resultado da fusão dos diferentes tipos de sintomas. Caracteriza-se pela formação de lesões grandes que podem tomar grandes áreas do fruto no decorrer do desenvolvimento, são escuras ou de coloração marrom, com ou sem frutificações, de formato irregular, podendo ser deprimidas ou não. Geralmente surge no final da safra quando os frutos estão maduros e com ocorrência de altas temperaturas. Em frutos ainda verdes ocorre o sintoma da mancha trincada, podendo atingir desde pequenas áreas até quase a totalidade do fruto, sendo esse tipo de lesão encontrada sempre associada ao ácaro da falsa ferrugem (*Phyllocoptruta oleivora*). A mancha reticulada ocorre em frutos imaturos na forma de

lesões superficiais de textura lisa e sem bordas definidas, possui coloração marrom escuro a clara, aspecto encharcado e corpos de frutificação não estão presentes. Tais lesões podem tomar todo o fruto (GÓES, 1998; FUNDECITRUS, 2000).

As folhas podem apresentar sintomas caracterizados por lesões de centro acinzentado, com bordas salientes marrom-escuras e circundadas por um halo amarelo parecido com aquelas observadas nos frutos com sintomas de mancha dura. As lesões em folhas são frequentemente observadas em tangerineira e limoeiros verdadeiros, e raramente em plantas de pomelo (GÓES, 1998; FUNDECITRUS, 2000).

Segundo Kotzé (1988), os fatores que podem afetar de modo direto a epidemiologia da mancha preta dos citros são, a disponibilidade de inóculo, clima favorável à infecção, ciclo de crescimento do hospedeiro e fase de maturação do fruto em relação a suscetibilidade a infecção e eventual desenvolvimento dos sintomas.

O ciclo primário da doença é constituído pela fase sexual de *P. citricarpa*, cujas estruturas infectivas são os ascósporos, responsáveis pela introdução do patógeno na área e o início da epidemia a cada ciclo da cultura, já o ciclo secundário é caracterizado pela fase assexual do fungo onde os conídios são responsáveis pelo aumento da doença na planta hospedeira e ao seu redor (KIELY, 1948; AGUILAR-VILDOSO, 2002).

As estruturas responsáveis pela formação de ascos e ascósporos, os pseudotécios, são encontrados maduros apenas em folhas caídas no solo e em fase intermediária de decomposição. A produção de ascósporos é influenciada pelas condições de temperatura e precipitação (ALCOBA et al., 2000). Os ascósporos produzidos são lançados e carregados pelo vento e assim disseminados a grandes distâncias, podendo atingir até 25 Km de distância (KLOTZ, 1973). A produção de esporos sexuais é de grande importância, pois além da capacidade de dispersão possuem maior viabilidade e tolerância ao ressecamento favorecendo a sobrevivência do patógeno no campo.

Os picnídios são estruturas produtoras de conídios, sendo importantes na disseminação de curta distância, cuja formação ocorre principalmente em lesões de frutos maduros, bem como em folhas velhas caídas e ocasionalmente presentes em

folhas novas, hastes de frutos e ramos mortos (SMITH,1996). Os conídios emergem do picnídio através do ostíolo e estão cobertos por uma massa mucilaginosa, que é rapidamente solubilizada e os conídios levados pela água das chuvas, irrigação ou orvalho, podendo alcançar a superfície de um tecido susceptível e assim iniciar novas infecções. As folhas infectadas quando caem no solo do pomar formam novos ascósporos, dando continuidade ao ciclo (KIELY, 1948; KOTZÉ, 1981; ROBBS et al., 1985).

O período crítico para infecção ocorre após a queda das pétalas e estende-se por até seis meses de desenvolvimento dos frutos (BALDASSARI, 2001). Os esporos originados sexual ou assexuadamente germinam na superfície do órgão susceptível e emitem o tubo germinativo e apressório do qual se origina o “peg” de penetração que perfura e entra através da cutícula, originando uma pequena massa de micélio entre a cutícula e a epiderme do órgão afetado. Nesta fase o fungo pode permanecer dormente por até um ano. Este período de dormência ou infecção latente é interrompido quando o fruto atinge seu tamanho final e inicia a maturação, ou quando a folha já caída entra em processo de degradação. O fungo cresce a partir do micélio subcuticular e coloniza tecidos mais internos, produzindo os sintomas típicos da doença (MCONIE, 1967; KOTZÉ, 1988). A manifestação da doença é influenciada de forma fundamental por fatores ambientais, como radiações solares intensas e altas temperaturas (KOTZÉ, 1981; KOTZÉ, 1996).

2.3. Controle

O controle da mancha preta dos citros baseia-se na adoção de medidas culturais, a fim de minimizar os prejuízos causados pela doença, tais como utilização de mudas saudáveis, boas condições de nutrição e sanidade, desinfestação de veículos, máquinas e equipamentos, retirada de restos vegetais e catação de frutas temporais infectadas, controle de ervas daninhas, utilização de quebra ventos e irrigação nos períodos secos para evitar queda excessiva de folhas (FUNDECITRUS, 2000), emprego de roçadeiras mecânicas, uso de decompositores das folhas caídas no chão (BELLOTTE et al., 2009), assim como a destruição

mecânica das mesmas através de trinchas (SCALOPPI, 2010) para consequente redução na produção de ascósporos (ALMEIDA, 2009). Já para a redução das infecções provenientes de conídios, uma prática agrônômica eficiente é a supressão de galhos secos na planta ou a poda dos mesmos (GOES & ALMEIDA, 2007).

Além desses cuidados, inclui-se a utilização de fungicidas protetores ou sistêmicos, isoladamente ou combinados, associados à óleo mineral ou vegetal. A utilização indiscriminada de fungicidas, no entanto, promoveu a seleção de isolados resistentes aos principais ativos utilizados, o que levou a restrição do seu uso (GHINI & KIMATI, 2000).

2.4. Controle biológico

Segundo os produtores, o desafio para o controle de doenças tem aumentado cada vez mais, devido à demanda por produtos livres de resíduos químicos tóxicos e pela percepção da sociedade em geral sobre o impacto das práticas que são utilizadas no controle de doenças, como o uso excessivo de agrotóxicos e suas consequências desastrosas para a saúde dos seres humanos e o meio ambiente. Tais pressões exercidas pela sociedade promoveram o estabelecimento de políticas governamentais que restringem a utilização de agrotóxicos (GULLINO & KUIJPERS, 1994; RAGSDALE & SISLER, 1994). Desta forma, considerando-se os custos financeiros e ambientais, agricultores e pesquisadores começaram a considerar o uso de métodos alternativos no combate a doenças (PUNJA & UTKHEDE, 2003).

O controle alternativo no contexto da proteção de plantas contra fitopatógenos engloba o controle biológico e indução de resistência, e não inclui o controle químico clássico e o melhoramento genético de plantas para resistência a doenças. Alguns autores, no entanto, classificam a indução de resistência como um tipo de controle biológico (PASCHOLATI, 1998). O controle biológico tem como premissa básica, manter a densidade populacional das espécies de pragas associadas à agricultura, em níveis economicamente e ecologicamente aceitáveis. (LIMA et al., 2000). Em um conceito mais amplo, o controle biológico é definido por Baker & Cook (1974) como a “redução da densidade de inóculo ou das atividades determinantes da doença,

esta provocada por um patógeno ou parasita nos seus estados de atividade ou dormência, por um ou mais organismos, realizada naturalmente ou através da manipulação do ambiente, hospedeiro ou antagonismo, ou pela introdução em massa de um ou mais antagonistas”. Posteriormente, Cook & Baker, em 1983, redefiniram o controle biológico como sendo “a redução da soma de inóculo ou das atividades determinantes da doença provocada por um patógeno, realizada por ou através de um ou mais organismos que não o homem”. No contexto particular deste estudo, o controle biológico de doenças de plantas pode ser definido simplesmente como “o controle de um microrganismo através de outros microrganismos”.

O desenvolvimento de agentes de controle biológico da fase laboratorial até a obtenção do produto comercial é uma tarefa muito difícil. É necessário obter diversas informações com relação à eficácia, modo de ação do agente em questão, bem como sobre a sobrevivência, colonização e potencial toxicidade para espécies não-alvo. Além disso, estudos com relação à formulação, estabilidade e vida de prateleira também são necessários (LUMSDEN, 1996; MATHRE et al., 1999; HARMAN, 2000).

Muitos estudos têm sido feitos com a utilização de bactérias antagonistas a fitopatógenos. A habilidade de bactérias formadoras de esporos (*Bacillus* spp.) permanecerem metabolicamente dormentes por longos períodos, aumenta sua sobrevivência sobre a superfície foliar, mesmo em períodos secos, de temperaturas extremas e com deficiências temporárias de nutrientes (KNUDSEN & SPURR, 1986).

2.4.1. *Bacillus subtilis* como agente de biocontrole

O gênero *Bacillus* esta entre os microrganismos mais utilizados em biocontrole de doenças por apresentar grande vantagem em relação aos outros, devido a sua capacidade de formar esporos, os quais são tolerantes ao calor e ao frio, a condições extremas de pH, a pesticidas, fertilizantes e ao tempo de estocagem. Estas vantagens permitem a utilização deste microrganismo na formulação de produtos mais estáveis e viáveis e sua aplicação no tratamento de

folhas na forma de “sprays” (BACKMAN et AL., 1997; KLOEPPER et al., 1997). Outra vantagem do gênero *Bacillus* se deve ao seu rápido crescimento em meio líquido e à ausência de patogenicidade da maioria das espécies (SHODA, 2000).

Considerando este fato, vários trabalhos têm sido realizados utilizando, em especial, *Bacillus subtilis* como agente de controle biológico (BAKER et al., 1983, PUSEY et al., 1986, FERREIRA et al., 1991).

Muitas linhagens de *B. subtilis* produzem lipopeptídeos, compostos anfifílicos com atividades surfactante e antimicrobiana, que associados à capacidade de formação de esporos, contribuem para a utilização comercial deste microrganismo no controle biológico de várias doenças de plantas (AHIMOU et al., 2000).

Grande parte dos trabalhos enfocando controle biológico pelo gênero *Bacillus* enfatiza a espécie *B. subtilis*, que é tipicamente uma rizobactéria, que se associa às raízes, formando biofilmes com características ecológicas de simbiose (ASAKA & SHODA, 1996; KILIAN et al., 2000; KONDOH et al., 2001; BERNAL et al., 2002; BAIS et al., 2004; GARDENER, 2004).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Obtenção dos microrganismos

O fungo *Phyllosticta citricarpa* e os 70 isolados de *Bacillus* spp. foram obtidos da coleção do Laboratório de Fitopatologia e Controle Biológico pertencente ao Centro APTA Citros Sylvio Moreira/IAC, Cordeirópolis/SP. Os isolados de *Bacillus* spp. foram divididos em 4 ensaios para realização dos testes, com uma média de 15 a 20 isolados por ensaio.

3.2. Influência dos isolados de *Bacillus* spp. no crescimento micelial de *Phyllosticta citricarpa*

Para estudar o efeito antagônico dos isolados de *Bacillus* spp. no crescimento micelial de *P. citricarpa*, foi utilizada a técnica de cultivo pareado em placa de Petri, contendo BDA (DENNIS & WEBSTER, 1971).

Discos de micélio com 5 mm de diâmetro retirados de colônias ativas de *P. citricarpa*, com dez dias de idade foram colocados em placas de Petri contendo BDA para pareamento a 3 cm de distância da colônia de cada um dos isolados de *Bacillus* spp.. As testemunhas foram representadas pelo fitopatógeno sem a presença dos antagonistas. A incubação das culturas se deu em estufa para B.O.D. a 26°C sob fotoperíodo de 12/12 h. A avaliação foi realizada após 10 dias de incubação, por meio de medições do crescimento micelial das colônias de *P. citricarpa* em dois sentidos perpendiculares. Os 4 ensaios realizados neste teste, utilizaram um delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e a comparação de médias foi feita pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3.3. Influência de *Phyllosticta citricarpa* no tamanho da colônia dos isolados de *Bacillus* spp.

Para estudar o efeito antagônico de *P. citricarpa* sobre crescimento celular dos isolados de *Bacillus* spp., foi utilizada a técnica de cultivo pareado em placa de Petri, contendo BDA (DENNIS & WEBSTER, 1971).

Discos de micélio com 5 mm de diâmetro retirados de colônias ativas de *P. citricarpa*, com dez dias de idade foram colocados em placas de Petri contendo BDA a 3 cm de distância da colônia de cada um dos isolados de *Bacillus* spp. Os tratamentos testemunhas foram representados pelos isolados bacterianos sem a presença do fitopatógeno. A incubação das culturas se deu em estufa para B.O.D. a 26°C sob fotoperíodo de 12/12 h. A avaliação foi realizada após 10 dias de incubação, por meio de medições do crescimento das colônias de *Bacillus* spp. em dois sentidos perpendiculares. Os 4 ensaios realizados neste teste, utilizaram um experimento fatorial com dois fatores e três repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e a comparação de médias foi feita pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

3.4. Produção de compostos voláteis pelos isolados de *Bacillus* spp.

Para verificar a produção de compostos voláteis pelos isolados de *Bacillus* spp., os ensaios foram realizados utilizando placas de poliestireno, divididas ao meio, contendo meio BDA, as quais impedem que exsudatos não voláteis produzidos pela bactéria tenham contato com o fungo através do meio de cultura. Em um dos lados foi adicionado um disco (5 mm) do isolado bacteriano e do outro lado da placa foi adicionado um disco de micélio (5 mm) do fitopatógeno. Após 13 dias de incubação em B.O.D a 26°C e fotoperíodo de 12/12 h, foi realizada a avaliação por meio de medições do crescimento micelial das colônias de *P. citricarpa*, em dois sentidos perpendiculares. Os 4 ensaios realizados neste teste, utilizaram um delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições. Os

dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e a comparação de médias foi feita pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3.5. Produção de compostos antifúngicos termoestáveis pelos isolados de *Bacillus* spp.

A termoestabilidade dos compostos antifúngicos produzidos pelos isolados bacterianos foi verificada seguindo o método descrito por Moretto (2000).

Os isolados de *Bacillus* spp. foram transferidos através de uma alça de repicagem para frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 50 mL de batata-dextrose. Em seguida, as culturas foram incubadas em condições ambientes de laboratório, sob agitação a 150 rpm, por um período de 72 horas. Transcorrido este período, uma alíquota de 10 mL foi retirada de cada frasco e transferida para outros frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 90 mL de BDA. Os meios foram autoclavados por 20 minutos, a 120°C e 1 atm de pressão e vertidos para placas de Petri. Após a solidificação, um disco de 5 mm de diâmetro, obtido de colônias ativas de *P. citricarpa* foi transferido para o centro de cada placa de Petri contendo meio e o metabólito produzido pela bactéria. As testemunhas foram representadas pelo fitopatógeno, sem a presença dos metabólitos. Após 12 dias de incubação em B.O.D a 26°C e fotoperíodo de 12/12 h, foi realizada a avaliação por meio de medições do crescimento micelial das colônias de *P. citricarpa*, em dois sentidos perpendiculares. Os 4 ensaios realizados neste teste, utilizaram um delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e a comparação de médias foi feita pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3.6. Produção de metabólitos livres de células pelos isolados de *Bacillus* spp.

Após cultivar cada isolado de bactéria em caldo batata-dextrose por 72 horas, como mencionado no item anterior, uma alíquota de 10 mL foi retirada, filtrada em membrana millipore (0,20 µm) e transferida para frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 90 mL de meio BDA fundente. Depois de vertidos e solidificados os meios em placas de Petri, um disco de 5 mm de diâmetro obtido de colônias ativas do fitopatógeno foi transferido para o centro das mesmas. As testemunhas foram representadas pelo fitopatógeno, sem a presença dos metabólitos produzidos pelo *Bacillus* spp. Após 12 dias de incubação em B.O.D a 26°C e fotoperíodo de 12/12 h, foi realizada a avaliação por meio de medições do crescimento micelial das colônias de *P. citricarpa*, em dois sentidos perpendiculares. Os 04 ensaios realizados neste teste utilizaram um delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições, seguindo o método descrito por Moretto (2000). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e a comparação de médias foi feita pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3.7. Produção de enzimas hidrolíticas pelos isolados de *Bacillus* spp.

3.7.1. Obtenção de parede celular de *Phyllosticta citricarpa*

Para a preparação da parede celular do fitopatógeno, 04 discos de micélio do fungo *P. citricarpa* foram transferidos para frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 ml de meio batata-dextrose (BD). O cultivo do fungo foi realizado sob agitação a 150 rpm, em condições de temperatura e luz ambiente, durante 10 dias. O micélio fúngico obtido foi coletado por filtração a vácuo, lavado várias vezes com água destilada, homogeneizado em 100 mL de água destilada e centrifugado a 5000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e, em seguida, foi realizada a maceração do tecido micelial em almofariz na presença de nitrogênio líquido. Posteriormente,

foram adicionados 100 mL de água destilada ao material obtido e este foi submetido a 03 ciclos de centrifugação e ressuspensão. Em seguida, o sedimento foi submetido à secagem a 55°C por 12 horas, constituindo o preparado da parede celular (MILLER, 1959).

3.7.2. Cultivo bacteriano

Quatro isolados de *Bacillus* spp. (ACB-08, ACB-12, ACB-63 e ACB-69) foram utilizados para verificar a produção e liberação de enzimas hidrolíticas, seguindo o procedimento utilizado por Fialho (2005). Tais isolados foram transferidos, através de uma alça de repicagem, para 2,5 mL de meio batata-dextrose e incubados a 32°C por 12 horas. Após esse período, 01 mL da cultura foi transferido para frascos Erlenmeyer de 125 mL, contendo 50 mL de meio BD modificado (com preparado de parede celular do fungo a 1% (m/v), em substituição à glicose). O cultivo foi realizado em duplicata a 32°C sob agitação a 90 rpm por 24 horas. Passado este período, uma alíquota de 02 mL foi retirada e centrifugada a 10000 xg por 10 minutos, a 5°C. O sobrenadante foi recuperado e utilizado para análise das atividades de quitinase e β -1,3-glucanase.

3.7.3. Quitinase

A atividade de quitinase foi determinada pela quantificação colorimétrica de glicose liberada a partir do substrato glicol quitina. Para isso, 100 μ l da amostra de cultivo foram misturados com 200 μ l de tampão McIlvaine, pH 6,0 e 100 μ l de glicol quitina 0,01% (p/v) neste mesmo tampão. Após incubação por 15 minutos a 37°C, a reação foi interrompida através da adição de 200 μ l de reagente ADNS à mistura de reação, determinando-se o teor de açúcares redutores liberados. A cubeta de referência (branco) consistiu na presença do tampão em substituição ao meio de cultivo. O valor da leitura foi subtraído do obtido pelo controle negativo, que apresentou o tampão em substituição ao substrato (glicol quitina).

3.7.4. β -1,3-glucanase

Para a avaliação da produção de β -1,3-glucanase foi utilizada a técnica de quantificação colorimétrica de glicose liberada do substrato laminarina, através da dosagem de açúcares redutores. A mistura da reação, incubada a 37° por 1 hora, continha 200 μ l tampão McIlvaine, pH 6,0, 100 μ l da amostra de cultivo e 100 μ l de laminarina (4 mg/ml). Após esse período, a reação foi paralisada através da adição de 200 μ l do reagente ADNS a mistura de reação, determinando-se o teor de açúcares redutores liberados. A cubeta de referência (branco) consistiu na presença do tampão em substituição ao meio de cultivo. O valor da leitura foi subtraído do obtido pelo controle negativo, que apresentou o tampão em substituição ao substrato (laminarina).

3.7.5. Determinação de açúcares redutores

A determinação de açúcares redutores (AR) liberados durante os ensaios enzimáticos (quitinase e β -1,3-glucanase) foi realizada segundo o método descrito por Miller (1959), utilizando o reagente de ácido 3,5-dinitrosalicílico (ADNS). Para isto, 200 μ L deste reagente foram adicionados à mistura da reação e a solução foi aquecida em banho de água fervente por 5 min. Após resfriamento em gelo até à temperatura de 25°C, as soluções foram diluídas 2 vezes com água destilada. Em seguida, as amostras foram submetidas à leitura em espectrofotômetro para determinação da absorbância a 540 nm, contra branco apropriado. As leituras foram plotadas em curva padrão (Figura 1) à partir de uma solução de glicose na concentração de 1 mg.mL⁻¹. Aliquotas de 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1 mL desta solução foram diluídas com água destilada até completar o volume para 1 mL. Cada uma dessas soluções, considerando-se a diluição, possuíam, respectivamente, 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1 mg/mL de concentração de glicose. Para a leitura de absorbância a 540 nm, realizou-se o mesmo procedimento anterior. A partir da concentração de glicose e da respectiva absorbância, efetuou-se a regressão linear e o valor de R² (+0,988)

obtido demonstrou uma boa correlação entre a taxa de absorbância e as concentrações da solução de glicose. Para o cálculo do AR, utilizou-se a seguinte fórmula:

$$\text{AR (mg/mL)} = [(2,048 \times \text{Abs}) - 0,0745] \times \text{dil.}$$

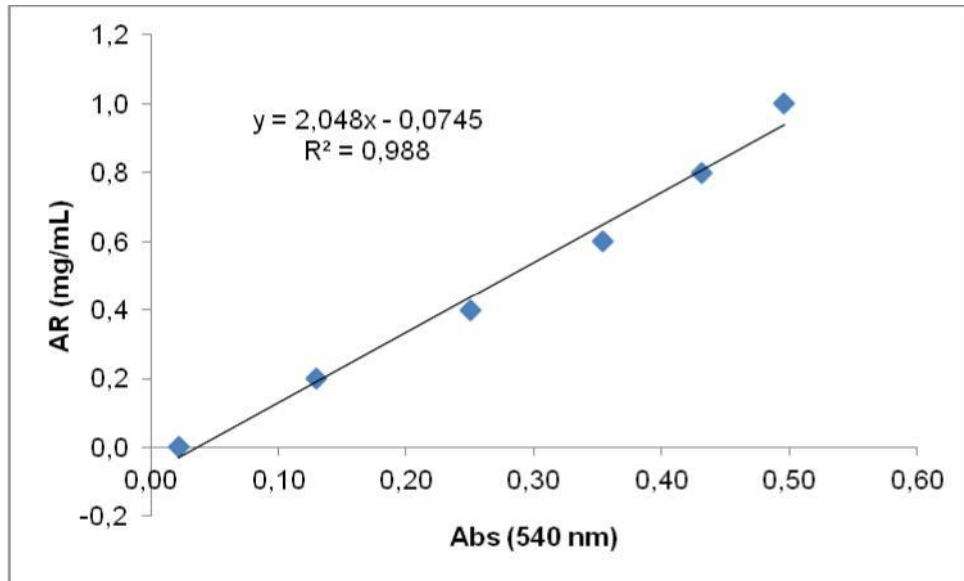


Figura 1. Curva Padrão de Glicose

4. RESULTADOS

4.1. Influência dos isolados de *Bacillus* spp. no crescimento micelial de *Phyllosticta citricarpa*

Todos os isolados de *Bacillus* spp. foram testados quanto à capacidade antagônica a *P. citricarpa*, cujos resultados podem ser observados nas Tabelas 1, 2, 3 e 4. Os resultados mostraram que, do total de 70 isolados bacterianos testados, 67 foram capazes de inibir significativamente a colônia do fungo fitopatogênico, apresentando mais de 25% de inibição no desenvolvimento do fitopatógeno, sendo que o ACB-12 (Figura 2) e o ACB-13 apresentaram os melhores resultados, proporcionando cerca de 90% de inibição.

Tabela 1. Porcentagem de inibição da colônia de *Phyllosticta citricarpa* após cultivo pareado com diferentes isolados de *Bacillus* spp. ou, sob influência de compostos antifúngicos produzidos pela bactéria. Ensaio 1.

Tratamentos	Cultivo Pareado	% Inibição	Metabólitos					
			Voláteis	% Inibição	Termoestáveis	% Inibição	Livres de células	% Inibição
Controle	4,93 a ⁽¹⁾	0,00	5,79 a	0,00	4,60 a	0,00	4,60 a	0,00
ACB-01	1,86 bcde	62,18	4,88 ab	15,77	2,21 b	51,90	3,03 b	34,24
ACB-02	1,29 cde	73,86	4,76 ab	17,71	1,44 b	68,75	2,14 c	53,53
ACB-07	0,86 de	82,49	4,20 ab	27,43	1,73 b	62,50	1,84 cde	60,05
ACB-08	1,31 cde	73,35	4,56 ab	21,17	1,34 b	70,92	0,61 hi	86,68
ACB-09	1,08 de	78,17	4,06 ab	29,81	1,66 b	63,86	0,85 ghi	81,52
ACB-10	2,43 bc	50,76	4,40 ab	23,97	1,75 b	61,96	0,59 i	87,23
ACB-11	0,84 de	82,99	3,48 abc	39,96	1,54 b	66,58	1,34 efg	70,92
ACB-12	0,55 e	88,83	3,51 ab	39,31	1,48 b	67,93	1,45 defg	68,48
ACB-13	0,58 e	88,32	4,79 ab	17,28	1,66 b	63,86	1,25 cdef	72,83
ACB-15	0,65 e	86,80	2,64 bc	54,43	1,75 b	61,96	1,50 cdef	67,39
ACB-16	2,64 b	46,45	3,01 bc	47,95	2,01 b	56,25	0,58 i	87,50
ACB-17	0,89 de	81,98	3,66 abc	36,72	1,41 b	69,29	0,95 fghi	79,35
ACB-18	2,03 bcd	58,88	3,34 bc	42,33	1,90 b	58,70	1,35 efg	70,65
ACB-19	1,05 de	78,68	1,58 c	72,79	1,69 b	63,32	1,54 cdef	66,58
ACB-20	2,05 bcd	58,38	3,21 bc	44,49	2,11 b	54,08	1,53 cdef	66,85
ACB-21	0,94 de	80,96	4,64 ab	19,87	2,01 b	56,25	2,06 cd	55,16
ACB-22	1,16 cde	76,40	2,79 bc	51,84	1,79 b	61,14	1,24 efg	73,10
ACB-AP3	2,65 b	46,19	3,85 abc	33,48	2,20 b	52,17	1,74 cde	62,23

⁽¹⁾ Médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem entre si, pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 2. Porcentagem de inibição da colônia de *Phyllosticta citricarpa* após cultivo pareado com diferentes isolados de *Bacillus* spp. ou, sob influência de compostos antifúngicos produzidos pela bactéria. Ensaio 2.

Tratamentos	Cultivo Pareado	% Inibição	Metabólitos				
			Voláteis	% Inibição	Termoestáveis	% Inibição	Livres de células
Controle	4,93 a ⁽¹⁾	0,00	3,16 a	0,00	3,63 a	0,00	3,63 a
ACB-23	1,11 fg	77,41	2,39 abc	24,51	0,68 cd	81,38	0,74 c
ACB-24	2,30 cde	53,3	2,00 bc	36,76	0,91 cd	74,83	1,03 c
ACB-25	1,06 fg	78,43	3,10 ab	1,98	0,86 cd	76,21	0,81 c
ACB-26	1,50 efg	69,54	2,79 abc	11,86	0,70 cd	80,69	0,65 c
ACB-27	1,31 efg	73,35	2,20 abc	30,43	0,66 cd	81,72	0,73 c
ACB-28	2,73 bcd	44,67	2,33 abc	26,48	1,05 bc	71,03	0,81 c
ACB-41	3,00 bc	39,09	1,95 c	38,34	0,75 cd	79,31	0,63 c
ACB-42	2,33 cde	52,79	2,88 abc	9,09	0,69 cd	81,03	0,60 c
ACB-43	3,66 b	25,63	2,44 abc	22,92	1,46 b	59,66	2,66 b
ACB-44	2,85 bcd	42,13	2,48 abc	21,74	0,75 cd	79,31	0,59 c
ACB-45	1,91 cdef	61,17	2,15 abc	32,02	0,71 cd	80,34	0,75 c
ACB-46	1,73 defg	64,97	2,00 bc	36,76	0,65 cd	82,07	0,55 c
ACB-47	1,09 fg	77,92	1,83 c	42,29	0,58 d	84,14	0,78 c
ACB-48	0,94 fg	80,96	2,15 abc	32,02	1,08 bc	70,34	0,69 c
ACB-51	1,10 fg	77,66	2,36 abc	25,30	0,69 cd	81,03	0,71 c
ACB-52	1,86 defg	62,18	1,98 c	37,55	0,80 cd	77,93	0,68 c
ACB-53	0,78 g	84,26	2,48 abc	21,74	0,80 cd	77,93	0,63 c

⁽¹⁾ Médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem entre si, pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 3. Porcentagem de inibição da colônia de *Phyllosticta citricarpa* após cultivo pareado com diferentes isolados de *Bacillus* spp. ou, sob influência de compostos antifúngicos produzidos pela bactéria. Ensaio 3.

Tratamentos	Cultivo Pareado	% Inibição	Metabólitos				
			Voláteis	% Inibição	Termoestáveis	% Inibição	Livres de células % Inibição
Controle	3,08 a ⁽¹⁾	0,00	4,51 a	0,00	3,11 a	0,00	3,11 a 0,00
ACB-54	1,13 ab	63,41	3,01 b	33,24	0,50 efgh	83,94	0,71 bc 77,11
ACB-56	1,20 ab	60,98	3,15 b	30,19	1,13 cd	63,86	1,23 b 60,64
ACB-58	1,60 ab	47,97	3,19 b	29,36	1,18 c	62,25	0,70 bc 77,51
ACB-59	0,61 b	80,08	2,91 b	35,46	0,38 fgh	87,95	0,34 cde 89,16
ACB-60	1,84 ab	40,24	3,18 b	29,64	0,54 defgh	82,73	0,56 cde 81,93
ACB-63	0,55 b	82,11	3,59 b	20,50	0,63 cdefgh	79,92	0,00 e 100,00
ACB-64	1,91 ab	37,80	3,33 b	26,32	0,76 cdefg	75,50	0,05 de 98,39
ACB-65	0,88 ab	71,54	3,18 b	29,64	0,89 cdef	71,49	0,50 cde 83,94
ACB-66	1,24 ab	59,76	3,08 b	31,86	1,06 cde	65,86	2,78 a 10,84
ACB-67	2,19 ab	28,86	3,26 b	27,70	0,49 efgh	84,34	0,64 bcd 79,52
ACB-68	0,49 b	84,15	3,23 b	28,53	0,63 cdefgh	79,92	0,39 cde 87,55
ACB-69	0,96 ab	68,70	3,04 b	32,69	0,68 cdefgh	78,31	0,00 e 100,00
ACB-70	1,21 ab	60,57	3,06 b	32,13	0,20 gh	93,57	0,04 de 98,80
ACB-71	0,40 b	86,99	3,39 b	24,93	0,13 h	95,98	0,04 de 98,80
ACB73	0,88 ab	71,54	2,91 b	35,46	1,83 b	41,37	0,84 bc 73,09

⁽¹⁾ Médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem entre si, pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 4. Porcentagem de inibição da colônia de *Phyllosticta citricarpa* após cultivo pareado com diferentes isolados de *Bacillus* spp. ou, sob influência de compostos antifúngicos produzidos pela bactéria. Ensaio 4.

Tratamentos	Cultivo Pareado	% Inibição	Metabólitos				
			Voláteis	% Inibição	Termoestáveis	% Inibição	Livres de células
Controle	6,76 a ⁽¹⁾	0,00	3,90 a	0,00	4,74 a	0,00	4,74 a
ACB-57	3,59 bcdef	46,95	3,29 ab	15,71	0,09 g	98,15	0,71 bcd
ACB-72	4,29 b	36,60	3,60 ab	7,69	1,53 b	67,81	0,70 bcd
ACB-74	4,05 bc	40,11	4,10 a	-5,13	0,78 cde	83,64	0,36 cdefgh
ACB-75	3,84 bcd	43,25	3,35 ab	14,10	0,81 cde	82,85	0,35 defgh
ACB-76	3,84 bcd	43,25	3,99 a	-2,24	0,79 cde	83,38	0,40 cdefgh
ACB-77	3,46 bcdef	48,80	3,74 a	4,17	0,63 def	86,81	0,51 bcdefg
ACB-78	3,11 def	53,97	3,61 a	7,37	0,64 def	86,54	0,65 bcde
ACB-79	3,41 bcdef	49,54	3,06 ab	21,47	0,89 cd	81,27	0,20 gh
ACB-80	3,31 cdef	51,02	3,70 a	5,13	0,81 cde	82,85	0,50 bcdefg
ACB-81	3,73 bcde	44,92	2,45 b	37,18	0,84 cde	82,32	0,36 cdefgh
ACB-82	3,15 cdef	53,42	3,25 ab	16,67	0,40 efg	91,56	0,50 bcdefg
ACB-83	2,80 f	58,60	3,70 a	5,13	0,78 cde	83,64	0,43 cdefgh
ACB-84	2,89 ef	57,30	3,89 a	0,32	0,70 de	85,22	0,85 b
ACB-85	3,41 bcdef	49,54	3,33 ab	14,74	0,21 fg	95,51	0,06 h
ACB-86	3,59 bcdef	46,95	3,54 ab	9,29	1,21 bc	74,41	0,73 bc
ACB -87	2,96 def	56,19	3,45 ab	11,54	0,20 fg	95,78	0,53 bcdefg
ACB-88	3,71 bcdef	45,10	3,59 ab	8,01	0,98 cd	79,42	0,16 gh
ACB-89	3,51 bcdef	48,06	3,44 ab	11,86	0,91 cd	80,74	0,30 efgh
ACB-90	3,45 bcdef	48,98	3,64 ab	6,73	0,89 cd	81,27	0,59 bcdef
ACB-91	3,16 cdef	53,23	3,50 ab	10,26	0,86 cd	81,79	0,28 fgh

⁽¹⁾ Médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem entre si, pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

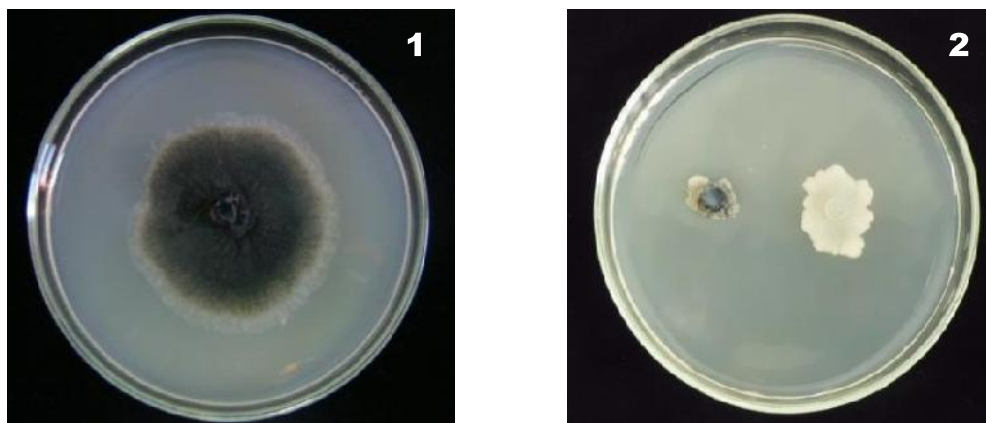


Figura 2. Influência do isolado ACB-12 de *Bacillus* spp. no crescimento micelial de *Phyllosticta citricarpa* em cultivo pareado. 1- Testemunha, 2- Cultivo Pareado.

4.2. Influência de *Phyllosticta citricarpa* no tamanho das colônias de *Bacillus* spp.

Na avaliação da influência do fungo *P. citricarpa* no desenvolvimento das colônias de *Bacillus* spp., observou-se que 52 isolados não obtiveram diferença estatística quando comparados com os tratamentos testemunhas (cultivo de *Bacillus* spp. sozinho) (Tabela 5). Porém, 18 isolados tiveram seu crescimento afetado, sendo que, dentre esses, 17 isolados (ACB-25, ACB-26, ACB-28, ACB-47, ACB-48, ACB-53, ACB-56, ACB-58, ACB-59, ACB-64, ACB-65, ACB-67, ACB-69, ACB-76, ACB-83, ACB-85 e ACB-91) apresentaram inibições das suas colônias, que variaram de 23,28% a 82,60% (Figura 3). Por outro lado, o ACB-08 de *Bacillus* spp. teve seu crescimento favorecido na presença do fitopatógeno (Figura 4).

Tabela 5. Influência de *Phyllosticta citricarpa* no tamanho das colônias de *Bacillus* spp.

<i>Bacillus</i> spp.	Com fungo (cm)	Sem fungo (cm)	Teste F
ACB-01	2,77 Ad ⁽¹⁾	1,83 Ad	1,17NS
ACB-02	1,50 Ad	1,42 Ad	0,01NS
ACB-07	1,77 Ad	3,07 Ac	2,27NS
ACB-08	5,32 Ac	1,73 Bd	17,27**
ACB-09	2,23 Ad	2,88 Ac	0,57NS
ACB-10	2,13 Ad	1,32 Ad	0,90NS
ACB-11	1,62 Ad	1,48 Ad	0,02NS
ACB-12	2,28 Ad	0,92 Ad	2,51NS
ACB-13	1,52 Ad	1,35 Ad	0,04NS
ACB-15	1,70 Ad	1,75 Ad	0,00NS
ACB-16	2,20 Ad	3,73 Ac	3,16NS
ACB-17	2,17 Ad	2,90 Ac	0,72NS
ACB-18	4,05 Ac	4,38 Ac	0,15NS
ACB-19	2,00 Ad	1,98 Ad	0,00NS
ACB-20	1,57 Ad	1,67 Ad	0,01NS
ACB-21	1,52 Ad	1,85 Ad	0,15NS
ACB-22	1,43 Ad	1,52 Ad	0,01NS
ACB-23	1,72 Ad	3,15 Ac	2,76NS
ACB-24	1,35 Ad	1,15 Ad	0,05NS
ACB-25	1,22 Bd	3,15 Ac	5,03*
ACB-26	0,87 Bd	3,08 Ac	6,61*
ACB-27	1,85 Ad	1,97 Ad	0,02NS
ACB-28	1,27 Bd	3,42 Ac	6,22*
ACB-41	1,30 Ad	1,75 Ad	0,27NS
ACB-42	2,28 Ad	1,78 Ad	0,34NS
ACB-43	1,52 Ad	1,58 Ad	0,01NS
ACB-44	1,23 Ad	1,52 Ad	0,11NS
ACB-45	1,20 Ad	1,38 Ad	0,05NS
ACB-46	1,95 Ad	2,58 Ad	0,54NS
ACB-47	2,20 Bd	4,00 Ac	4,36*
ACB-48	0,87 Bd	5,00 Ab	22,97**
ACB-51	1,68 Ad	2,03 Ad	0,16NS
ACB-52	1,20 Ad	2,22 Ad	1,39NS
ACB-53	1,18 Bd	4,43 Ac	14,20**
ACB-54	5,55 Ac	6,33 Ab	0,83NS
ACB-56	5,85 Bc	9,00 Aa	13,34**
ACB-57	2,13 Ad	2,33 Ad	0,05NS
ACB-58	5,78 Bc	7,83 Aa	5,65*
ACB-59	4,90 Bc	7,05 Aa	6,22*
ACB-60	5,17 Ac	4,78 Ac	0,20NS
ACB-63	8,45 Aa	8,42 Aa	0,00NS
ACB-64	5,03 Bc	8,00 Aa	11,83**
ACB-65	6,42 Bb	9,00 Aa	8,97**
ACB-66	5,50 Ac	6,42 Ab	1,13NS
ACB-67	6,23 Bb	8,12 Aa	4,77*
ACB-68	8,08 Aa	7,87 Aa	0,06NS
ACB-69	4,47 Bc	7,25 Aa	10,42**
ACB-70	7,20 Ab	8,58 Aa	2,57NS

Continua...			
ACB-71	6,13 Ab	6,58 Ab	0,27NS
ACB-72	2,35 Ad	2,97 Ac	0,51NS
ACB-73	5,62 Ac	5,62 Ab	0,00NS
ACB-74	2,37 Ad	3,00 Ac	0,54NS
ACB-75	2,88 Ad	3,67 Ac	0,83NS
ACB-76	2,47 Bd	4,57 Ac	5,93*
ACB-77	2,35 Ad	3,47 Ac	1,68NS
ACB-78	2,68 Ad	2,47 Ad	0,06NS
ACB-79	1,98 Ad	3,33 Ac	2,45NS
ACB-80	3,68 Ad	3,53 Ac	0,03NS
ACB-81	3,07 Ad	4,37 Ac	2,27NS
ACB-82	4,58 Ac	5,02 Ab	0,25NS
ACB-83	3,58 Bd	5,33 Ab	4,12*
ACB-84	4,32 Ac	5,25 Ab	1,17NS
ACB-85	3,37 Bd	6,28 Ab	11,44**
ACB-86	2,88 Ad	3,38 Ac	0,34NS
ACB-87	4,12 Ac	3,75 Ac	0,18NS
ACB-88	3,88 Ac	2,58 Ad	2,27NS
ACB-89	2,43 Ad	3,28 Ac	0,97NS
ACB-90	3,08 Ad	4,53 Ac	2,83NS
ACB-91	1,93 Bd	3,68 Ac	4,12*
ACB-AP3	4,23 Ac	3,93 Ac	0,12NS
Teste F	9,28**	13,42**	

(¹) Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

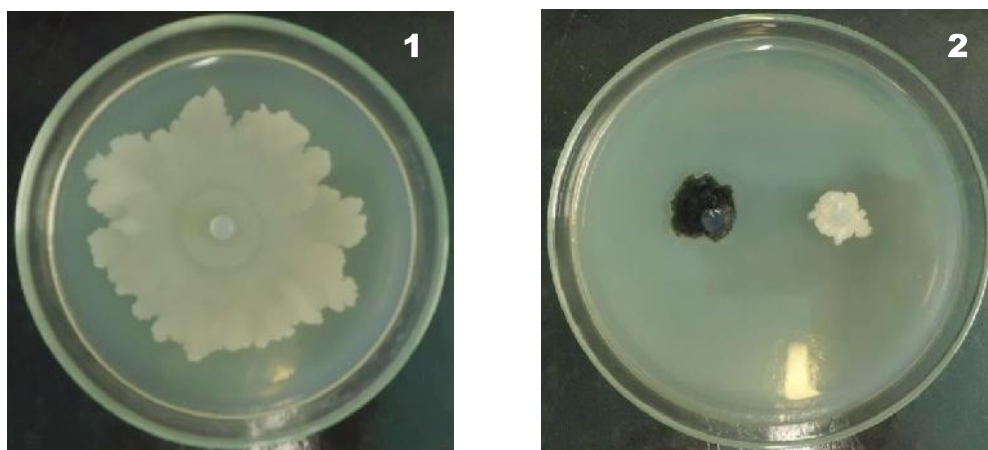


Figura 3. Influência de *Phyllosticta citricarpa* no crescimento da colônia do isolado ACB-48 de *Bacillus* spp. em cultivo pareado. 1 – Testemunha. 2- Cultivo Pareado.

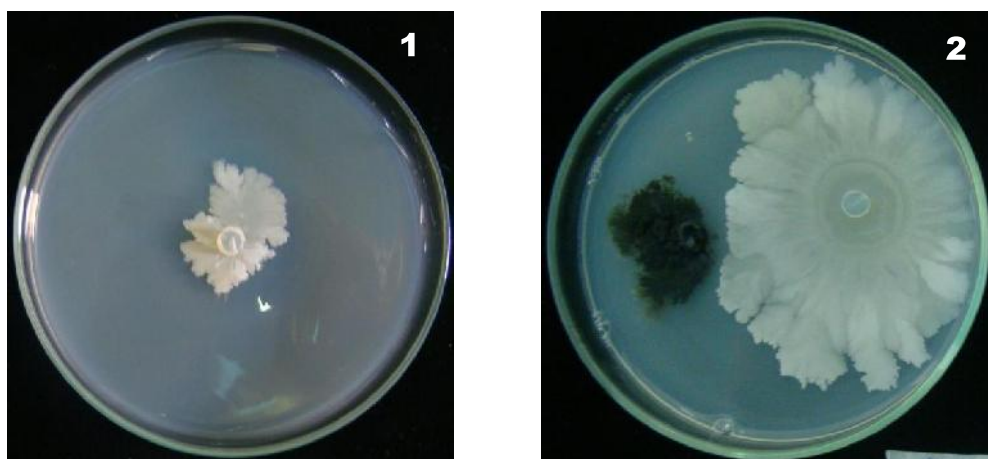


Figura 4. Influência de *Phyllosticta citricarpa* no crescimento da colônia do isolado ACB-08 de *Bacillus* spp. em cultivo pareado. 1- Testemunha. 2 – Cultivo pareado.

4.3. Produção de compostos voláteis pelos isolados de *Bacillus* spp.

Os resultados obtidos mostraram que dos 70 isolados bacterianos testados, 27 foram capazes de produzir compostos voláteis que inibiram significativamente o desenvolvimento do fungo. No primeiro ensaio, os melhores resultados foram obtidos com os isolados ACB-19, ACB-15, ACB-22, ACB-16, ACB-20 e ACB-18, em ordem decrescente de eficiência, apresentando variações de 72,79% a 42,33% de inibição (Tabela 1, Figura 5). No segundo ensaio, os isolados que proporcionaram maior controle do fungo foram os ACB-47, ACB-41, ACB-52, ACB-24 e ACB-46, com porcentagens de inibição que variaram de 42,29% a 36,76% (Tabela 2). Já no terceiro ensaio, todos os isolados de *Bacillus* spp. produziram compostos voláteis que inibiram significativamente o desenvolvimento do fungo, com valores de inibição que variaram de 35,46% (ACB-59) a 20,50% (ACB-63) (Tabela 3). No quarto ensaio apenas o ACB-81 diferiu estatisticamente do tratamento inibindo 37,18% a colônia do fitopatógeno (Tabela 4).

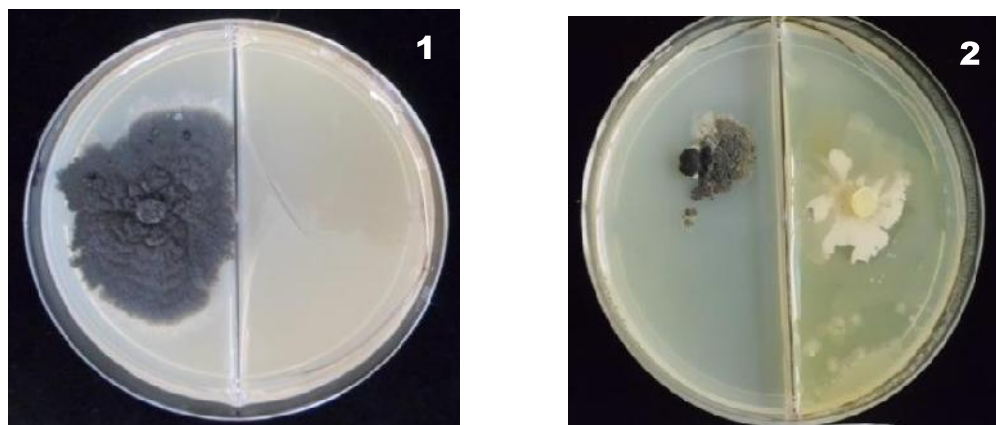


Figura 5. Influência dos metabólitos voláteis do isolado ACB-19 de *Bacillus* spp. no crescimento micelial de *Phyllosticta citricarpa*. 1- Testemunha, 2- Teste de metabólitos voláteis.

4.4. Produção de compostos antifúngicos termoestáveis pelos isolados de *Bacillus* spp.

Com relação à produção de compostos anti-fúngicos por *Bacillus* spp. que suportam a alta temperatura, os resultados obtidos indicaram que todos os 70 isolados bacterianos testados foram capazes de produzir metabólitos termoestáveis que afetaram o desenvolvimento da colônia do fitopatógeno, com valores de inibições que variaram de 41,37% (ACB-73) a 98,15% (ACB-57) (Tabelas 1, 2, 3, 4 e Figura 6).

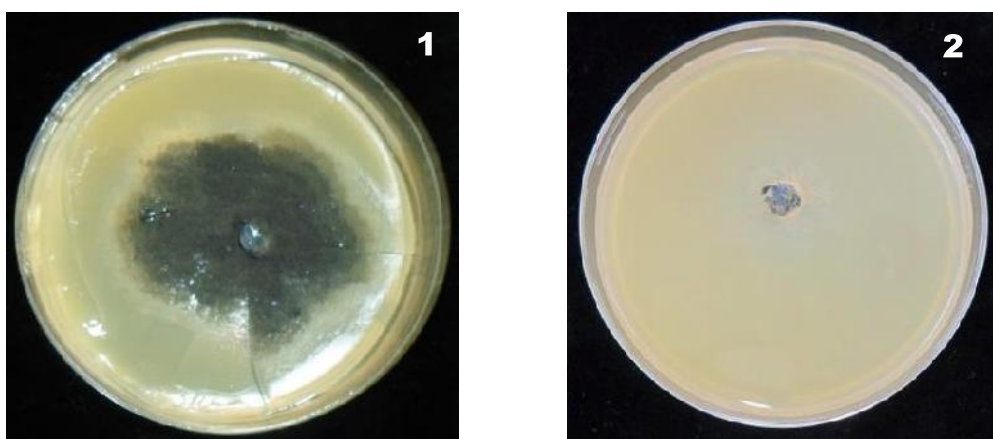


Figura 6. Influência dos metabólitos termoestáveis do isolado ACB-57 de *Bacillus* spp. no crescimento micelial de *Phyllosticta citricarpa*. 1- Testemunha, 2- Teste de metabólitos termoestáveis.

4.5. Produção de metabólitos livres de células pelos isolados de *Bacillus* spp.

Com exceção do ACB-66, que proporcionou somente 10,84% de inibição no desenvolvimento do fungo, os demais isolados bacterianos proporcionaram um controle significativo do fitopatógeno. Tais isolados produziram metabólitos livres de células que afetaram o desenvolvimento da colônia do patógeno, com valores de inibição da colônia do fungo que variaram de 26,55% (ACB-43) a 100% (ACB-63 e ACB-69) (Tabelas 1, 2, 3, 4 e Figura 7).

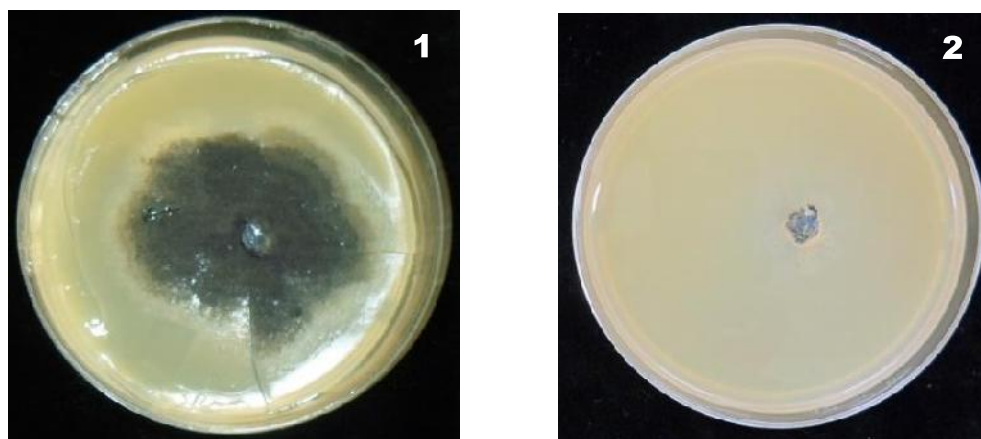


Figura 7. Influência dos metabólitos livres de células do isolado ACB-63 de *Bacillus* spp. no crescimento micelial de *Phyllosticta citricarpa*. 1- Testemunha, 2- Teste de metabólitos livres de células.

4.6. Produção de enzimas hidrolíticas pelos isolados de *Bacillus* spp.

Pelos resultados obtidos verificou-se que, todos os isolados de *Bacillus* spp. testados foram capazes de produzir β -1,3-glucanase, em diferentes concentrações, quando cultivados em meio batata dextrose modificado (com preparo de parede celular de *P. citricarpa* em substituição à glicose), sendo que o ACB-63 foi o isolado que demonstrou maior atividade desta enzima através da produção de açúcar redutor. Nenhum dos isolados testados foi capaz de produzir quitinase nas condições apresentadas (Tabela 6).

Tabela 6. Produção de quitinase e β -1,3-Glucanase, por isolados de *Bacillus* spp., avaliada através da produção de açúcar redutor

Isolados	Quitinase AR (mg/mL)⁽¹⁾	β-1,3-Glucanase AR (mg/mL)
ACB-08	0,00	0,10
ACB-12	0,00	0,07
ACB-63	0,00	0,30
ACB-69	0,00	0,06

⁽¹⁾ AR – Açúcar redutor

5. DISCUSSÃO

Em virtude dos prejuízos causados por *Phyllosticta citricarpa* e ao crescente interesse pela utilização de métodos de controle não agressivos ao meio ambiente, agricultores e pesquisadores passaram a considerar o uso do controle biológico para o controle de doenças. Nesta busca, foi descoberto que através da utilização de microrganismos antagônicos, podia-se proporcionar diferentes níveis de controle da doença (PUNJA & UTKHEDE, 2003). O gênero *Bacillus* está entre os mais utilizados por apresentar a capacidade de formar endósporos, permitindo sua utilização na formulação de bioprodutos mais estáveis e viáveis (BACKMAN et al., 1997; KLOEPPER et al., 1997), além de possuir rápido crescimento em meio líquido e ausência de patogenicidade da maioria das espécies (SHODA, 2000).

Para desenvolver um bioproduto comercial, é necessário obter diversas informações do agente antagônico com relação à eficácia, modo de ação, sobrevivência, colonização e potencial de toxicidade para espécies não-alvo (LUMSDEN, 1996; HARMAN, 2000).

Neste estudo, todos os isolados de *Bacillus* spp. promoveram inibições no crescimento micelial do fitopatógeno, por meio de diferentes mecanismos de ação. Os resultados deste trabalho podem ser comparados com alguns trabalhos de literatura, os quais têm demonstrado que filtrados de espécies de *Bacillus* inibem o crescimento de fungos fitopatogênicos (CUBETA et al., 1985; BETTIOL & KIMATI, 1990; KUPPER & GIMENES-FERNANDES, 2002).

Estudando a interação *in vitro* entre *P. citricarpa* e bactérias endofíticas, Araújo et al. (2001) constataram que alguns isolados de *Bacillus* spp. foram inibidos e outros tiveram seu crescimento estimulado na presença do sobrenadante da cultura do fungo. Tais resultados corroboram com os obtidos neste estudo, onde 17 isolados de *Bacillus* spp. tiveram seu crescimento inibido e 1 deles (ACB-08) teve seu crescimento favorecido na presença do fitopatógeno, em cultivo pareado. Os dados apresentados no presente trabalho sugerem que alguns isolados bacterianos, mesmo tendo seus crescimentos celulares afetados na presença do fungo, não

perderam e nem diminuíram sua atividade antagonística, demonstrada por meio da produção de substâncias antifúngicas.

Nos testes referentes à produção de metabólitos termoestáveis e livres de células, com exceção do ACB-66, todos os demais isolados bacterianos foram capazes de inibir significativamente o desenvolvimento do fungo *P. citricarpa*, revelando que os metabólitos produzidos pelos isolados de *Bacillus* spp. mantiveram suas atividades antagonísticas mesmo após serem submetidos a alta temperatura. Por outro lado, o(s) metabólito(s) produzido(s) pelo ACB-66 só afetou(ram) o desenvolvimento da colônia do patógeno quando submetido à alta temperatura. É possível que com a autoclavagem, tenha ocorrido a solubilização de alguma substância, presente no meio, disponibilizando-a para exercer ação contra *P. citricarpa*. Uma segunda hipótese é quanto à possibilidade de algum componente, presente na célula do microrganismo, ter atividade contra o fitopatógeno e ter sido liberada para o meio durante a autoclavagem (MORETTO, 2001). Além disso, a competição por espaço e nutriente poderia ser outro mecanismo de ação do ACB-66 envolvido no biocontrole, uma vez que, durante o cultivo pareado, o antagônico inibiu em torno de 78% o crescimento micelial de *P. citricarpa*.

Estudando o isolado NSRS 89-24 de *B. subtilis* no controle de *Pyricularia grisea* e *Rhizoctonia solani*, Leelasuphakul et al. (2006) mostraram que a cultura de filtrados esterilizada, ou seja, livres de células da bactéria, foi a que melhor inibiu o crescimento dos fungos fitopatogênicos quando comparado aos metabólitos bacterianos produzidos e submetidos à autoclavagem. Esses resultados estão de acordo com os obtidos neste estudo, onde embora todos os isolados tenham produzidos metabólitos termoestáveis em quantidades suficientes para inibir o desenvolvimento do fungo, as maiores inibições das colônias do fitopatógeno ocorreram pelos metabólitos livres de células, sugerindo que alguns compostos possam ser de natureza proteica.

No presente trabalho, 27 isolados de *Bacillus* spp. produziram compostos voláteis em concentrações suficientes para inibir o desenvolvimento do fungo *P. citricarpa*, diferindo estatisticamente da testemunha. Vale ressaltar o desempenho do ACB-19 que produziu metabólitos voláteis que inibiram em 73% a colônia de *P. citricarpa*. Tais isolados, além de agirem através da produção de compostos

antifúngicos voláteis agem também através de compostos antifúngicos não voláteis e resistentes à autoclavagem, sendo, portanto, fortes candidatos para utilização no biocontrole quando se busca a produção de um bioproduto.

Resultados semelhantes foram encontrados por outros autores. Marroni & Germani em 2011, trabalhando com *Bacillus* spp. no controle *in vitro* de *Macrophomina phaseolina*, agente etiológico da podridão de tronco da mamona (*Ricinus communis* L), mostrou que o isolado RP 5 foi eficiente na produção de metabólitos voláteis, sendo considerado fungistático. Estudando o controle biológico do fungo *P. citricarpa* por *Saccharomyces cerevisiae*, Fialho (2004), observou controle do fitopatógeno em até 83%, através da produção de compostos voláteis pela levedura.

Um fato interessante observado neste estudo diz respeito aos isolados ACB-74 e ACB-76 que não produziram metabólitos voláteis antifúngicos e, sim, algum composto volátil que favoreceu o crescimento do fungo. Por outro lado, tais microrganismos produziram metabólitos livres de células e termoestáveis que inibiram em mais de 80% a colônia do patógeno.

Os resultados referentes à atividade enzimática pelos 04 isolados de *Bacillus* spp. (ACB-08, ACB-12, ACB-63 e ACB-69), mostraram que ocorreu a produção de β -1,3-glucanase, quando os isolados bacterianos foram cultivados em meio suplementado com fragmentos da parede celular do fungo. Por outro lado, não houve produção de quitinase pelos isolados bacterianos estudados, sugerindo que a β -1,3-glucanase, possa ser mais importante do que a quitinase na degradação da parede de *Phyllosticta citricarpa*.

Estudos têm demonstrado que enzimas líticas extracelulares e antibióticos de *B. subtilis* são importantes para o biocontrole de fitopatógenos, podendo essas substâncias agir isoladamente ou em sinergismo na degradação das paredes celulares dos fungos (Leelasuphakul et al., 2006; Tweddell et al., 1993).

Ao estudar o isolado NSRS 89-24 de *B. subtilis*, Leelasuphakul et al. (2006) mostraram que o mesmo produziu a enzima β -1,3-glucanase e um extrato antibiótico (metabólitos livres de células) que atuaram de forma sinérgica no controle de *Pyricularia grisea* e *Rhizoctonia solani*. Segundo os autores, o alvo dos compostos

antifúngicos está direcionado para o ataque da parede celular de fungos que contém compostos de quitina, β -1,3-glucanos e outros oligossacarídeos.

Os isolados que produziram atividade enzimática neste estudo, ACB-08, ACB-12, ACB-63 e ACB-69, também produziram metabólitos livres de células que proporcionaram 86,68%, 68,48%, 100% e 100% de inibição no desenvolvimento micelial de *P. citricarpa*, respectivamente. Tal fato indica a possível atividade sinérgica destes, com as enzimas hidrolíticas no biocontrole do patógeno, considerando os resultados *in vitro*. Tais resultados indicam que, estes compostos bioativos produzidos pelos isolados de *Bacillus* spp., podem funcionar *in vivo* como biofungicida para controle da doença.

A constatação da produção de substâncias inibidoras de *P. citricarpa* produzidas pelos diversos isolados de *Bacillus* spp., alguns, inclusive, mais efetivos que outros, como mostram os dados, é importante para o entendimento dos possíveis mecanismos de ação que estão envolvidos no controle do fitopatógeno, abrindo a possibilidade de controle da doença também pelo uso das substâncias produzidas e, não apenas pela introdução massal dos agentes de biocontrole.

A maioria dos isolados de *Bacillus* spp. estudado mostrou o potencial dos mesmos para a produção de metabólitos livres de células e em quantidades suficientes para inibir o crescimento micelial de *P. citricarpa*. No entanto, muitos isolados também produziram substâncias termooestáveis, mostrando que alguns compostos antifúngicos foram parcialmente responsáveis pela inibição da colônia do patógeno.

De modo geral, as bactérias antagônicas, tais como *B. subtilis*, *Pseudomonas cepacia*, *Pseudomonas fluorescens* e outras, agem significativamente por antibiose e, ocasionalmente, por parasitismo e competição (ARRAS & ARRU, 1997). Microrganismos que agem por antibiose, geralmente, têm amplo espectro de ação, de forma que a produção de substâncias tóxicas é mais efetiva na inibição dos fungos do que qualquer outro mecanismo de ação envolvido. Dados de literatura mostram a inibição de *Monilinia fructicola*, agente causal da podridão parda do pessegueiro por *B. subtilis* (PUSEY & WILSON, 1984; MCKEEN et al., 1986 e PUSEY et al., 1986) e de *Eutypa lata*, agente causal do declínio da videira (FERREIRA et al., 1991).

A produção rápida e eficiente de metabólitos e enzimas hidrolíticas por microrganismos com atividade antimicrobiana, como foi observada neste estudo, sugere a viabilidade de utilização dos mesmos em programas de controle biológico.

6. CONCLUSÕES

De acordo com os dados obtidos neste trabalho, conclui-se que:

- a) A maioria dos isolados de *Bacillus* spp. testado foi capaz de produzir substâncias antifúngicas e, em quantidades suficientes, para inibir o desenvolvimento micelial de *Phyllosticta citricarpa*;
- b) A produção de enzimas hidrolíticas, como a β -1,3-glucanase, por *Bacillus* spp. pode ser um dos mecanismos de ação envolvidos no biocontrole da mancha preta dos citros.

7. REFERÊNCIAS

AGUILAR-VILDOSO, C.I. (Coord). **Manual técnico de procedimentos da mancha preta dos citros**. Brasília: MAPA/DAS/DDIV, 2002. 72p.

AHIMOU, F.; JACQUES, P.; DELEU, M. Surfactin and iturin A effects on *Bacillus subtilis* surface hydrophobicity. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, n. 10, p. 749-754, 2000.

ALCOBA, N.J.; VIGIANI, A.R.; VEJARANO, N.V.; SLVARES, E.E; SERRANO, M.A.; BONILLO, M.C. **Mancha negra de los citros**: epidemiologia y control. San Salvador de Jujuy: Ediciones Universidad Nacional de Jujuy, 2000. 56p.

ALMEIDA, T.F. **Mancha Preta dos Citros: expressão dos sintomas em frutos pela inoculação com conídios e controle do agente causal (*Guignardia citricarpa*)**. 2009. 66 f. Tese. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2009.

ARAÚJO, W. L.; MACCHERONI JR. W.; AGUILAR-VILDOSO, C. I.; BARROSO, P. A.; SARIDAKIS, H. O.; AZEVEDO, J. L. Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 3, p. 229-236, 2001.

ARRAS, G.; ARRU, S. Mechanism of action of some microbial antagonists against fungal pathogens. **Annali di Microbiologia ed Enzimologia**, v.47, p.97-120, 1997.

ASAKA, O.; SHODA, M. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping off of tomato with *Bacillus subtilis* RB14. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 4081-4085, 1996.

BACKMAN, P.A.; WILSON, M.; MURPHY, J.F. Bacteria for biological control of plant diseases. In: RECHCIGL, N.A.; RECHCIGL, J.E. **Environmentally Safe Approaches to Crop Disease Control**, p. 95-109, 1997.

BAIS, H.P.; FALL, R.; VIVANCO, J.M. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of Arabidopsis roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. **Plant Physiology**, v. 134, p. 307-319, 2004.

BAKER, J.C., STAVELY, J.R., THOMAS, C.A., SASSER, M., Mac MACFALL, J.S. Inhibitory effect of *Bacillus subtilis* on *Uromyces phaseoli* and on development of rust pustules on bean leaves. **Phytopathology**, v. 73, n. 8, p.1148-1152, 1983.

BAKER, K.F.; COOK, R.J. **Biological control of plant pathogens**. San Francisco: W.F. Freeman, 1974. 433p

BALDASSARI, R.B.; GÓES, A. de; SANTOS, J.M.; TIMOSSI, A.J. Microscopia eletrônica de varredura de isolados de *Guignardia citricarpa* obtidos de plantas cítricas. **Summa Phytopathologica**, v. 27, p. 88-92, 2001.

BELLOTTE, J.A.M.; KUPPER, K.C.; RINALDO, D.; SOUZA, A.; PEREIRA, F.D.; GOES, A. Acceleration of the decomposition of Sicilian lemon leaves as an auxiliary measure in the control of citrus black spot. **Tropical Plant Pathology**, v. 34, n. 2, p. 71-76, 2009.

BERNAL, G.; ILLANES, A.; CIAMPI, L. Isolation and partial purification of a metabolite from a mutant strain of *Bacillus* sp. with antibiotic activity against plant pathogenic agents. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 1, 2002.

BETTIOL, W.; KIMATI, H. Efeito de *Bacillus subtilis* sobre *Pyricularia oryzae* agente causal da brusone do arroz. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.25, n.8, p.1165-1174, 1990.

BODENMANN, J.; HENINGER, U.; HOHL, H. R. Extracellular enzymes of *Phytophthora infestans*: endocellulase, β -glucosidase and 1,3- β -glucanase. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 75-82, 1985.

BREWER, M.T.; LARKIN, R.P. Efficacy of several biocontrol organisms against *Rhizoctonia solani* on potato. **Crop Protection**, v. 24, p. 939-950, 2005.

CALAVAN, E. C. Black spot of citrus. **The California Citrographic**, Los Angeles, v.46, p.4, 18, 22-4, 1960.

CHET, I.; BENHAMOU, N.; HARAN, S. Mycoparasitism and lytic enzymess. In: Harman, G. E.; Kubicek, C.P., editors. **Trichoderma and Gliocladium**, v. 2, London: Taylor, and Francis; 1998, p. 153-72.

COLLINS, D. P.; JACOBSEN, B. J.; MAXWELL, B. Spatial and temperal population dynamics of a phyllosphere colonizing *Bacillus subtilis* biological control agente of sugar beet cercospora leaf spot. **Biological Control**, v. 26, p. 224-32, 2003.

COOK, R.J.; BAKKER, K.F. **The nature and practice of biological control of plant pathogens**. St Paul: The American Phytopathological Society, 1983. 615p.

CUBETA, M. A.; HARTMAN, G. L.; SINCLAIR, J. B. Interaction between *Bacillus subtilis* and fungi associated with soybean seeds. **Plant Disease**, v.69, n.6, p.506-509, 1985.

DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. III - Hyphal interaction. **Transactions of the British Mycological Society**, v.57, p.368-369, 1971c.

DOIDGE, E.M. Some diseases of citrus prevalent in South Africa. **South African Journal Science**, v. 26, p. 320-325, 1929.

FEICHTENBERGER, E. Mancha-preta dos citros no Estado de São Paulo. **Laranja**, v. 17, p. 93-108, 1996.

FEICHTENBERGER, E.; MÜLLER, G.W.; GUIRADO, N. Doenças dos citros (*Citrus* spp.). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. (Ed) **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Ceres, 1997. v. 2, p. 261-296.

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

FIALHO, M. B. **Efeito *in vitro* de *Saccharomyces cerevisiae* sobre *Guignardia citricarpa*, agente causal da pinta preta dos citros**. 2004. 60p. Dissertação de mestrado - Escola Superior de Agricultura. "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

FUNDECITRUS. **Manual técnico sobre pinta preta**. Araraquara, 2000. 10p. (Boletim Técnico).

GARDENER, B.B.M. Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. in agricultural systems. **Phytopathology**, v. 94, n. 11, p. 1252-1258, 2004.

GHINI, R.; KIMATI, H. **Resistência de fungos a fungicidas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. 78p.

GOES, A. DE. Controle da mancha preta dos frutos cítricos. **Laranja**, v. 19, p. 305-320, 1998.

GOES, A. DE; BARROS, J. C. DA; S. M. de; PINHEIRO, J. E. Controle da pinta preta em frutos de tangerina Rio (*Citrus deliciosa*), ocasionada por *Phyllosticta citricarpa* (*Guignardia citricarpa*). **Fitopatologia Brasileira**, v. 15, p.73-75, 1990.

GOES, A.; ALMEIDA, T.F. **Atualização em Mancha Preta**. Citricultura atual, Cordeirópolis, n. 61, p. 14-15, 2007.

GULLINO, M.L.; KUIJPERS, L.A.M. Social and political implications of managing plant diseases with restricted fungicides in Europe. **Annual Review of Phytopathology**, v. 32, p. 559-579, 1994.

HANDELSMAN, J.; EMMERT, E.A.B. Biocontrolo f plant disease: a (Gram-) positive perspective. **FEMS Microbiology Letters**, v. 171, p. 1-9, 1999.

HARMAN, G.E. Myths and dogmas of biocontrol-changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. **Plant Disease**, v. 84, p. 377-393, 2000.

KALITA, P.; BORA, L.C.; BHAGABATI, K.N. Phylloplane microflora of citrus and their role in management of citrus canker. **Indian Phytopathology**, New Delhi, v. 49, n.3, p. 234-237, 1996.

KATZ, E.; DEMIAN, A. L. The peptide antibiotics of *Bacillus*: chemistry, biogenesis, and possible functions. **Bacteriology**, v. 41, p. 449-74, 1977.

KIELY, T.B. Preliminary studies on *Guignardia citricarpa* spp.: the asciegenous stage of *Phoma citricarpa* McAlp. And its relation to black spot of citrus. **Proceedings of the Linnean Society of New South Wales**, v. 73, p. 249-292, 1948.

KILIAN, M.; STEINER, U.; KREBS, B.. JUNGE, H.; SCHMIEDEKNECHT, G.; HAIN, R. FZB24[®] *Bacillus subtilis* – mode of action of a microbial agent enhancing plant vitality. **Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer**, v. 1, p. 172-93, 2000.

KLOEPPER, J.W. Current status and future trends in biocontrol research and development in the U.S. **Proceedings of the International Symposium of Clean Agriculture**, Japan, p. 49-52, 1997.

KLOTZ, L.J. **Color handbook of citrus disease**. 4 ed. Berkeley: University of California, Division of Agricultural Sciences, 1973. 122p.

KNUDSEN, G.R; SPURR Jr.; H.W. Management of Bacterial Populations for Foliar Disease Biocontrol. In: MUKERJIL, K.G., GARG, K.L. **Biocontrol of plant diseases**. Boca Raton: CRC Press, p. 83-92, 1986.

KONDOH, M.; HIRAI, M.; SHODA, M. Integrated biological and chemical control of damping-off caused by *Rhizoctonia solani* using *Bacillus subtilis* 1XB14-C and Flutolanil. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 91, p. 173-177, 2001.

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

KOTZÉ, J.M. Black spot. In: WHITESIDE, J.O. GARNSEY, S.M.; TIMMER, L.W. (Ed) **Compendium of citrus diseases**. St. Paul: APS Press, 1988, p. 10-12.

KOTZÉ, J.M. History and epidemiology of Citrus Black Spot in South Africa. In: INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS, 8, Sun City, 1996. **Proceedings**. Sun City: International Society of Citriculture, 1996. p. 1296-1299.

KUPPER, K. C.; CORRÊA, E. B.; MORETTO, C.; BETTIOL, W.; GOES, A. DE. Control of *Guignardia citricarpa* by *Bacillus subtilis* and *Trichoderma* spp. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.33, p.1111-1118, 2011.

KUPPER, K. C.; CORREA, F. E.; AZEVEDO, F. A. de; SILVA, A. C. da. *Bacillus subtilis* to biological control of postbloom fruit drop caused by *Colletotrichum acutatum* under field conditions. **Scientia Horticulturae**, v. 134, p. 139-143, 2012.

KUPPER, K.C.; BETTIOL, W.; GOES, A. de; SOUZA, P.S. de; BELLOTTE, J.A.M. Biofertilizer for control of *Guignardia citricarpa*, the causal agent of citrus black spot. **Crop Protection**, v. 25, p.569-573, 2006.

KUPPER, K.C.; GIMENES-FERNANDES, N. Isolamento e seleção de *Bacillus* spp. para o controle de *Colletotrichum acutatum* em flores destacadas de lima-ácida 'Tahiti'. **Summa Phytopathologica**, v. 28, n.3, p. 292-295, 2002.

LEELASUPHAKUL, W.; SIVANUNSAKUL, P.; PHONGPAICHIT, S. Purification, characterization and synergistic activity of β -1, 3-glucanase and antibiotic extract from an antagonistic *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 against rice blast and sheath blight. **Enzyme and microbial technology**, v. 38, n.7, p. 990-997, 2006.

LIMA, L.H.C.; MARCO, J.L. de; FELIX, C.R. Enzimas hidrolíticas envolvidas no controle biológico por micoparasitismo. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Ed.). **Controle biológico**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. v. 2, cap. 8, p. 263-304.

LUMSDEN, R.D. Development of *Gliocladium virens* for damping-off disease control. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 18, p. 463-468, 1996.

MARRONI, I.V.; GERMANI, J.C. Eficiência de rizobactérias *Bacillus* spp. no controle *in vitro* de *Macrophomina phaseolina* agente etiológico da podridão de tronco da mamona (*Ricinus communis* L). **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 6, p. 159-167, 2011.

MARTINS-CORDER, M.P.; MELO, I.S. Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* spp. a *Verticillium dahliae*. **Scientia Agricola**, v. 55, p. 1-7, 1998.

MAWADZA, C.; HATTI-KAUL, R.; ZVAUYA, R.; MATTIASSON, B. Purification and characterization of celulasas produced by two *Bacillus* strains. **Biotechnology**, v. 83, p. 177-87, 2000.

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

McONIE, K.C. Germination and infection of citrus by ascospores of *Guignardia citricarpa* in relation to control of black spot. **Phytopathology**, v. 57, p.743-746, 1967.

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

MILLER, G.H. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-429, 1959.

MORETO, K. C. K. **Controle biológico da queda prematura dos frutos cítricos, causada por *Colletotrichum acutatum***. 2000. 130p. Tese de doutorado – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP – Jaboticabal, 2000.

MORETTO, K.C.K.; GIMENES-FERNANDES, N.; SANTOS, J.M. dos. Influence of *Trichoderma* spp. on *Colletotrichum acutatum* mycelial growth and morphology and on infection of 'Tahiti' lime detached flowers. **Summa Phytopathologica**, v.27, p.357-364, 2001.

NGUGI, H.K.; DEDEJ, S.; DELAPLANE, K.S.; SABELLE, A.T.; SCHERM, H. Effect of flower-applied Serenade biofungicide (*Bacillus subtilis*) on pollination-related variables in rabbiteye blueberry. **Biological Control**, v. 33, p. 32-38, 2005.

PASCHOLATI, S.F. **Potencial de *Saccharomyces cerevisiae* e outros agentes bióticos na proteção de plantas contra patógenos**. Piracicaba, 1998. 123p. Tese (Livre Docência) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

PINCHUK, I. V.; BRESSOLIER, P.; SOROKULVA, I. B.; VEREUIL, B.; URDACI, M.C. Amicoumacin antibiotic production and genetic diversity of *Bacillus subtilis* strains isolated from different habitats. **Research Microbiology**, v. 153, p. 269-76, 2002.

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

PUSEY, P. I. Use of *Bacillus subtilis* and related organisms as biofungicides. **Pesticide Science**, v. 27, p. 133-40, 1989.

PUSEY, P. L.; WILSON, C. L. Postharvest biological control of stone fruit brown rot by *Bacillus subtilis*. **Plant Disease**, v.68, n.9, p.753-756, 1984.

PUSEY, P.L.; WILSON, C.L.; HOTCHKISS, M.W.; FRANKLIN, J.D. Compatibility of *Bacillus subtilis* for postharvest control of peach brown rot with commercial fruit waxes, dicloran, and cold-storage conditions. **Plant Disease**, v. 70, n. 6, p. 587-590, 1986.

RAGSDALE, N.N.; SISLER, H.D. Social and political implications of managing plant diseases with decreased availability of fungicides in the United States. **Annual Review of Phytopathology**, v. 32, p. 545-557, 1994.

ROBBS, C.F.; PIMENTEL, J.P.; RIBEIRO, R.L. A mancha preta dos citros: identificação da forma perfeita *Guignardia citricarpa* no Estado do Rio de Janeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 10, p.248, 1985. Suplemento/Apresentado ao 18 Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Fortaleza, 1985 – Resumo.

SANTOS, E.R. **Controle biológico da mancha-aquosa do melão causada por *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli***. 60p. Dissertação de mestrado - PÓS-BIOTEC/UFPE, Recife, PE, 2004.

SCALOPPI, E.M.T. **Mancha Preta dos Citros: Técnicas de manejo e queda precoce de frutos**. 65p. (tese de doutorado). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2010.

SCHISLER, D.A.; SLININGER, P.J.; BEHLE, R.W.; JACKSON, M.A. Formulation of *Bacillus* spp. for Biological Control of Plant Diseases. **Phytopathology**, v.94, p. 1267-1271, 2004.

SCHUTTE, G. C.; BEETON, K. V.; KOTZÉ, J. M. Rind stippling on Valencia oranges by copper fungicides used for control of citrus black spot in South Africa. **Plant Disease**, v.81, p.851-854, 1997.

SHODA, M. Review: Bacterial control of plant diseases. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 89, p. 515-521, 2000.

SMITH, J.H. A study of the effect of various disease control programs on spore releases of the citrus black spot pathogen *Guignardia citricarpa* Kiely. In: INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS, 8., Sun City, 1996. **Proceedings**. Sun City: International Society of Citriculture, 1996. p. 351-352.

SONODA, R.M.; GUO, Z. Effect of spray applications of *Bacillus subtilis* on postbloom drop of citrus. **Phytopathology**, St. Paul, v.86, p.S52, 1996.

TABEMERO, C.; COLL, P.M.; FERNANDEZ- ABALOS, J. M.; PEREZ, P.; SANTAMARIA, R. I. Cloning and DNA sequencing of *bga* A, a gene encoding an endo- β -1,3-1,4-glucanase, from an alkalophilic *Bacillus* strain (N137). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, p. 1213-20, 1994.

TWEDDELL, R. J.; JABAJI-HARE, S. H.; CHAREST, P. M. Production of chitinases and β -1,3-glucanases by *Stachybotrys elegans*, a mycoparasite of *Rhizoctonia solani*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 2, p. 489-495, 1993.