

***Bacillus subtilis* NO CONTROLE DE *Alternaria alternata*, AGENTE CAUSAL DA  
MANCHA MARROM DE ALTERNARIA.**

GEAN M.C.PERASSOLI<sup>1</sup>; BRUNO B.CONVENTO<sup>2</sup>; ANTONIO L.L.CERVANTES<sup>2</sup>; CRISTIANE  
MORETTO<sup>3</sup>; KATIA C.KUPPER<sup>4</sup>

N°0800012

### 1. Resumo

Mancha marrom de alternaria, causada pelo fungo *Alternaria alternata*, é uma doença que afeta a maioria das tangerinas e seus híbridos, provocando desfolhas, seca de ramos e a queda prematura de frutos. As medidas de controle baseiam-se, principalmente, no uso de fungicidas. O controle biológico é uma alternativa para impedir o desenvolvimento e a germinação do patógeno. Este projeto teve por objetivos: (i) avaliar a sensibilidade de isolados de *A. alternata* ao fungicida do grupo dicarboximida (Iprodione); (ii) verificar a influência de 65 isolados de *B. subtilis*, no crescimento micelial. Para o ensaio de sensibilidade do patógeno ao fungicida, 26 diferentes isolados de *A. alternata* foram cultivados em meio BDA com as doses 1, 10, 100, 1.000 ppm do fungicida (Iprodione). Para os ensaios de influência no crescimento micelial, utilizou-se a técnica de cultivo pareado *B. subtilis* e *A. alternata*. O teste de germinação constituiu de lâminas com Agar-Água em que foram depositados 20µL do patógeno ( $1 \times 10^4$  esporos/mL) e antagonista ( $1 \times 10^7$  ufc/mL), a avaliação foi pela quantificação dos esporos germinados, 16 horas após a montagem do ensaio. Pelos resultados obtidos, a maioria dos isolados de *A. alternata* não apresenta sensibilidade na concentração de 1ppm do fungicida. Os testes da influência de *B. subtilis* sob *A. alternata* demonstraram que, os isolados ACB-90 e ACB-21 apresentaram as maiores porcentagens de inibições do fitopatógeno.

---

1. Bolsista CNPq: Graduando em Engenharia Agrônômica, CCA/UFSCar, Araras -SP, jeeprs78@hotmail.com

2. Colaboradores: Graduandos em Eng. Agrônômica, CCA/UFSCar, Araras-SP

3. Colaboradora: Mestranda em Sanidade vegetal, Segurança Alimentar e Ambiental IB-SP

4. Orientadora: Dra. Pesquisadora Centro APTA Citros Sylvio Moreira/IAC

## 2. Abstract

Spot of alternaria brown, caused by the fungus *Alternaria alternata*, is a disease that affects the majority of tangerines and hybrids, causing fall of leaves, dry branches, and premature fruit drop. The measures of control are based mainly in use of fungicides. The biological control is an alternative to prevent the development and germination of the pathogen. This project had the objectives: (i) assess the sensitivity of isolates of *A. alternata* fungicide to the group dicarboximide (Iprodione), (ii) assess the influence of 65 isolates of *B. subtilis*, in mycelial growth. To test the sensitivity of the pathogen of the fungicide, 26 different isolates of *A. alternata* were cultivated in the midst BDA with the concentration 1, 10, 100, 1,000 ppm of fungicide (Iprodione). For the tests of influence in mycelial growth has used up the technique of cultivation paired *B. subtilis* and *A. alternata*. The test was the germination of slides with agar-Water in which they were deposited 20  $\mu$  L of the pathogen ( $1 \times 10^4$  spores / mL) and antagonist ( $1 \times 10^7$  ufc/mL), the assessment was the quantification of spores germinated, 16 hours after the assembly of the test. Those results, most isolates of *A. alternata* showed no sensitivity to the concentration of 1 ppm of fungicide. Tests of the influence of *B. subtilis* under *A. alternata* showed that the isolated CBA-90 and CBA-21 had the highest percentages of the disqualifications pathogen.

## 3. Introdução

Apesar da importância da cultura, o setor citrícola enfrenta sérios problemas fitossanitários, e dentre estes, encontra-se a doença mancha marrom de alternaria (MMA), causada pelo fungo *Alternaria alternata*. As medidas de controle baseiam-se, principalmente, no uso de fungicidas, porém, em condições favoráveis de ocorrência da doença, são necessárias várias aplicações dos produtos, o que além de onerarem os custos de produção, podem levar à contaminação do meio ambiente e, ao surgimento de resistência por parte do patógeno os mais fungicidas utilizados para controle da doença. Diante disso, o presente projeto de pesquisa teve por objetivos: (i) avaliar a sensibilidade de diferentes isolados de *Alternaria alternata* aos principais fungicidas utilizados para o controle da doença em tangerinas e seus híbridos; (ii) verificar a influência de 65 isolados de *B. subtilis*, isolados de folhas e flores de citros de diferentes municípios do estado de São Paulo, no crescimento e na germinação de *A. alternata*.

## **4. Material e Métodos**

### **4.1. Avaliação da sensibilidade de isolados de *Alternaria alternata* ao fungicida empregado no controle.**

No presente ensaio, foram empregados dezenove isolados de *A. alternata*, obtidos em pomares cítricos de diferentes regiões localizadas no estado de São Paulo. Os isolados foram testados quanto a sensibilidade do principal fungicida utilizado para o controle da doença (Iprodione), foi utilizada a metodologia descrita por EDGINTON et al. (1971), modificada por MENTEN et al. (1976). Os tratamentos foi constituído pelo fungicida do grupo da dicarboximida (iprodione), nas concentrações 0, 1, 10, 100, e 1000 µg/mL. Empregou-se o delineamento inteiramente casualizado, em arranjo fatorial com cinco repetições. Cada unidade experimental foi constituída por uma placa de Petri. Para avaliação da sensibilidade foi determinada a porcentagem de inibição das colônias do patógeno. As avaliações foram realizadas aos 7 dias após incubação.

### **4.2. Influência dos agentes de controle biológico (ACBs) no crescimento micelial e germinação de *A. alternata***

Os 65 isolados de *B. subtilis*, que foram testados neste trabalho, pertencem à coleção de bactérias antagônicas do Centro APTA Citros Sylvio Moreira. Para estudar o efeito antagônico dos possíveis agentes de controle biológico sobre o crescimento das colônias de *A. alternata*, foi utilizada a técnica de cultivo pareado em placa de Petri, contendo BDA (DENNIS & WEBSTER, 1971). Para avaliar a influência dos isolados de *B. subtilis* sobre a germinação de *A. alternata*, os diferentes ACBs foram repicadas para placas de Petri contendo BDA e incubadas por dois dias, em estufa para BOD, a 27 °C, fotoperíodo 12/12h. Conídios do fitopatógeno foram produzidos em meio de cultura, seguindo a metodologia adotada por CANIHOS et al. (1999). Para estudar a inibição da germinação dos conídios do fitopatógeno, alíquotas de 20µL, dos possíveis antagonistas ( $1 \times 10^7$  ufc/mL) e do fitopatógeno ( $1 \times 10^4$  conídios/mL) foram depositadas nas áreas demarcadas de lâminas previamente preparadas, contendo ágar-água. Para o tratamento testemunha foram colocadas alíquotas de água no lugar dos ACBs. As lâminas foram incubadas em estufa para BOD, na temperatura de 27°C, no escuro por dezesseis horas. A avaliação foi através da contagem de conídios germinados num total de 100 conídios, avaliados ao acaso, efetuando-se o cálculo da porcentagem de germinação. Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, sendo cada tratamento composto por cinco repetições.

## 5. Resultados e Discussão

### 5.1 Avaliação da sensibilidade de isolados de *Alternaria alternata* aos fungicidas empregados no controle.

De acordo com os dados das Tabelas 1 e 2, observa-se que, de um modo geral os isolados de *A. alternata* que foram submetidos a cultivo em meio de cultura contendo concentrações de 1000 ppm e 100 ppm, não apresentaram crescimento micelial, porém nas concentrações de 10 ppm e 1 ppm, obtivemos isolados que apresentaram crescimento micelial.

**TABELA 1.** Sensibilidade de isolados de *Alternaria alternata* aos fungicidas empregados no controle.

Tratamentos	Média do Crescimento Micelial (cm)									
	T 3703	T 0403	L 2304	T 0803	T 2403	T 2603	L 2604	T 3603	A-1	MI-2
Test.	3,56	3,55	1,70	3,08	2,64	4,00	2,30	4,60	2,95	7,60
1ppm	1,82	1,85	0,00	1,89	1,30	1,27	1,06	1,54	1,87	0,00
10ppm	0,00	1,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,71	0,00	0,00
100ppm	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1000ppm	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

**TABELA 2.** Sensibilidade de isolados de *Alternaria alternata* aos fungicidas empregados no controle.

Tratamentos	Média do Crescimento Micelial (cm)								
	T 4303	MBA-3	MI-03	A1-4	A2-1	T 4103	L 2707	MBA-2	MBA-1
Test.	8,00	6,75	7,30	8,93	4,95	7,90	4,60	6,60	4,39
1ppm	0,27	0,00	0,62	0,00	0,25	0,00	0,00	1,80	0,00
10ppm	0,42	0,00	0,40	0,00	0,00	0,00	0,00	1,90	0,00
100ppm	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1000ppm	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Os resultados foram semelhantes aos obtidos por HUANG & LEVY (1995), que caracterizaram isolados de *Alternaria brassicicola* resistentes ao iprodione, uma vez que a maioria dos isolados apresentou colônias menores que os isolados selvagens em meio BDA.

### 5.2. Influência dos ACBs no crescimento micelial e germinação de *A. alternata*

De acordo com o demonstrado na Tabela 3, podemos observar os isolados de *B. subtilis* (ACB-16, ACB-21, ACB-25, ACB-90) foram os mais promissores, promovendo maiores percentuais de inibição da colônia de *A. alternata*. De acordo com BETTIOL e colaboradores (1997), *B. subtilis* em especial, é considerado como agente antagônico promissor a fungos e bactérias fitopatogênicas.

**TABELA 3.** Influência dos agentes de controle biológico (ACBs) no crescimento micelial de *Alternaria alternata*

TRATAMENTOS	% DE INIBIÇÃO	TRATAMENTOS	% DE INIBIÇÃO	TRATAMENTOS	% DE INIBIÇÃO
TEST.	0,00 A	TEST.	0,00 A	TEST.	0,00 A
ACB-84	7,32 AB	ACB-47	16,12 AB	ACB-54	20,41 AB
ACB-02	7,88 ABC	ACB-23	20,33 BC	ACB-09	24,88 AB
ACB-79	8,32 ABC	ACB-43	20,91 BC	ACB-20	27,75 ABC
ACB-91	8,45 ABCD	ACB-12	27,18 BC	ACB-22	42,42 BCD
ACB-82	8,62 ABCD	ACB-01	27,82 BCD	ACB-46	42,58 BCD
ACB-80	8,93 ABCD	ACB-07	30,00 CD	ACB-26	44,98 BCD
ACB-27	9,50 ABCD	ACB-53	39,00 DE	ACB-19	46,25 BCD
ACB-87	9,51 ABCD	ACB-17	44,31 EF	ACB-41	53,43 BCD
ACB-77	9,69 ABCDE	ACB-18	47,20 EFG	ACB-45	55,82 BCD
ACB-76	10,08 ABCDE	ACB-AP-3	48,53 EFG	ACB-10	69,22 CD
ACB-71	10,25 ABCDE	ACB-44	49,00 EFG	ACB-16	70,02 D
ACB-63	10,45 ABCDE	ACB-52	49,77 EFG	ACB-21	70,81 D
ACB-88	10,48 ABCDEF	ACB-28	50,62 EFG		
ACB-74	11,42 ABCDEFG	ACB-11	50,64 EFG		
ACB-72	13,22 ABCDEFGH	ACB-42	50,64 EFG		
ACB-60	15,53 ABCDEFGHI	ACB-13	50,83 FG		
ACB-89	15,57 ABCDEFGHI	ACB-48	51,16 FG		
ACB-83	15,57 ABCDEFGHI	ACB-BTHD-567	52,45 FG		
ACB-73	17,22 ABCDEFGHIJ	ACB-08	54,12 FG		
ACB-64	17,75 ABCDEFGHIJ	ACB-24	54,12 FG		
ACB-78	18,54 BCDEFGHIJ	ACB-15	54,91 FG		
ACB-69	20,89 BCDEFGHIJ	ACB-25	57,31 G		
ACB-65	21,87 BCDEFGHIJ				
ACB-59	25,36 CDEFGHIJ				
ACB-66	26,41 DEFGHIJK				
ACB-81	27,69 EFGHIJK				
ACB-70	28,50 FGHIJK				
ACB-67	28,77 GHIJK				
ACB-75	28,86 GHIJK				
ACB-57	29,01 GHIJK				
ACB-86	29,47 HIJK				
ACB51	30,01 HIJK				
ACB-56	30,49 HIJK				
ACB-58	30,51 HIJK				
ACB-68	32,97 IJK				
ACB-85	33,75 JK				
ACB-90	43,95 K				

De acordo com os dados da Tabela 4, podemos observar que houve inibição no percentual de germinação dos esporos de *A. alternata* variando de 19,05% (ACB-58) até 56,39% (ACB-90), em relação à testemunha.

**TABELA 4.** Influência dos agentes de controle biológico na germinação de *A.alternata*

TRATAMENTOS	ESPOROS GERMINADOS (%)
Testemunha	90,17 A
ACB-58	73,00 B
ACB-BTHD567	60,17 BC
ACB-24	58,17 BC
ACB-25	57,67 BC
ACB-11	56,50 C
ACB-51	55,33 CD
ACB-15	52,50 CDE
ACB-08	51,17 CDE
ACB-68	50,67 CDE
ACB-21	47,00 CDE
ACB-56	47,00 CDE
ACB-48	46,83 CDE
ACB-28	46,00 CDE
ACB-85	40,17 DE
ACB-90	39,33 E

## 7. Conclusão

Concluimos que *A.alternata* apresenta sensibilidade ao iprodione apenas na concentração de 1ppm e *B. subtilis* demonstrou *in vitro*, ser um promissor agente de controle biológico contra o fitopatógeno.

## 8. Bibliografia

- BETTIOL, W, GARIBALDI, A., MIGHELI, Q., Bacillus subtilis for the control of powdery mildew on cucumber an zucchini squash., **Bragantia**, v.56, n.2, p. 281-287,1997.
- CANIHOS, Y., PEEVER, T.L. & TIMMER, L.W. Temperature, leaf wetness, and isolate effects on infection of Minneola tangelo leaves by *Alternaria* sp. **Plant Disease**, v.83, p.429-433, 1999.
- DENNIS, C. & WEBSTER, J. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* III. Hyphal interactions. **Transactions of the British Mycological Society**, v.57, p.359-363, 1971.
- EDGINGTON, L.V., KHEW, K. & BARROW, G.L. Fungitoxic spectrum of benzimidazole comounds. **Phytopathology**, v.61, p.42-44, 1971.
- HUANG, R. & LEVY, Y. Characterization of iprodione resistant isolates of *Alternaria brassicicola*. **Plant Disease**, v.79, p.828-833, 1995.
- MENTEN, J.O.M., MACHADO, C.C., MINUSSI, E., CASTRO, C. & KIMATI, H., Efeito de alguns fungicidas no crescimento micelial de *Macrophomina phaseolina* (Tass) Goid. "in vitro". **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.1, p.57-66, 1976.