

INTERAÇÃO *in vitro* E *in vivo* ENTRE AGENTES DE BIOCONTROLE E *Colletotrichum acutatum*

MARCOS R. LOPES¹; KATIA C. KUPPER²; ALINE C. SILVA³; MARIANA N. KLEIN⁴

Nº 11124

RESUMO

A queda prematura dos frutos cítricos (QPFC), dado aos grandes prejuízos que têm causado aos produtores, constitui-se em uma doença de grande importância econômica. A medida predominante de controle é a aplicação de fungicidas na época de florada. Considerando-se os custos financeiros, ambientais e de saúde pública, em decorrência destas aplicações, assim como, as crescentes restrições à presença de resíduos em frutas frescas e, a possibilidade do surgimento de linhagens resistentes do patógeno aos fungicidas utilizados, faz-se necessário o estudo de novas alternativas de controle e, dentre estas, o controle biológico. Porém, a inconsistência da eficácia de tal medida, impede a sua implementação em escala comercial, especialmente em culturas de alto valor. Um dos caminhos para superar a ineficiência de alguns agentes de biocontrole, sob condições ambientais diversas, seria aplicá-lo em mistura, ou aplicar mais do que um agente de biocontrole em um dado momento. Diante do exposto, este trabalho teve por finalidade, verificar, sob condições de laboratório, a utilização de isolados de *Saccharomyces cerevisiae* para o controle de *Colletotrichum acutatum*, além de testar seis isolados de levedura (ACB-CR1, ACB-K1, ACB-KD1, ACB-CAT1, ACB-BG1 e ACB-PE2) sozinhos ou, em combinação com três isolados de *Bacillus subtilis* (ACB-66, ACB-69 e ACB-77) e com um isolado de *Trichoderma pseudokoningii* (ACB-37), em flores destacadas de citros, quanto à capacidade de prevenir a infecção por *C. acutatum*. Concluiu-se, pelos resultados obtidos que os isolados de *S. cerevisiae* testados apresentam potencial de controle a *C. acutatum*, tanto quando são aplicados sozinhos ou, em combinação com isolados de *B. subtilis* ou *T. pseudokoningii*, uma vez que, os tratamentos suprimiram a produção de sintomas em flores de laranja "Valência" e, quando testados sozinhos, foram capazes de inibir a germinação do fitopatógeno.

¹ Bolsista CNPq: Graduação em Eng. de Agrônoma, UFSCar, Araras-SP, lopes.mrl@hotmail.com

² Orientadora: Pesquisadora Nível V, Centro APTA Citros "Sylvio Moreira"/IAC, Cordeirópolis-SP.

³ Colaborador: Estagiaria, Centro APTA Citros "Sylvio Moreira"/IAC, Cordeirópolis-SP.

⁴ Colaborador: Estagiaria de Mestrado, Centro APTA Citros "Sylvio Moreira"/IAC, Cordeirópolis-SP.

ABSTRACT

The Postbloom Fruit Drop (PFD), caused by *Colletotrichum acutatum*, has caused losses to citrus producers and therefore it is economically very important. This disease is generally controlled by fungicide sprayings, which increase the production cost, and affects the environment. Thus, this work aimed at developing an alternative control method through the use of biocontrol agents. Discrepancies in the efficacy of biological control between controlled conditions and commercial situations may have several causes, but is believed that in commercial production where the environmental conditions are not fully controlled, may influence the survival, establishment in the phyllosphere, and activity of the biocontrol agents. One of the ways to overcome the ineffectiveness of most of the biocontrol agents under diverse environmental conditions is to apply them in mixture. Given the above, this paper aims to verify, under laboratory conditions, the use of isolates of *Saccharomyces cerevisiae* for the control of disease, besides to test six isolates of yeast (ACB-CR1, ACB-K1, ACB-KD1, ACB-CAT1, ACB-BG1 and ACB-PE2) alone or in combination with three strains of *Bacillus subtilis* (ACB-66, ACB-69 and ACB-77) and with one isolate of *Trichoderma pseudokoningii* (ACB-37) in citrus detached flowers, for their capacity to prevent infection by *C. acutatum*. It was concluded that the isolates of *S. cerevisiae* showed potential to control *C. acutatum*, when applied alone or in combination with isolates of *B. subtilis* or *T. pseudokoningii*, since the treatments suppressed the production of symptoms in orange blossoms "Valencia" and, when tested alone, they were able to inhibit the germination of the pathogen.

INTRODUÇÃO

O Brasil se destaca como um dos maiores produtores de citros do mundo, tanto em termos de área de cultivo, produção e quantidade de frutas processadas. Cerca de 85 % da produção é destinada à industrialização, cujo suco produzido é exportado para vários países, incluindo-se, principalmente, Bélgica, Estados Unidos, Japão, Suíça e China (AGRIANUAL, 2009).

Entretanto, apesar de toda importância dessa cultura, o setor citrícola enfrenta sérios problemas fitossanitários e, dentre as doenças mais importantes encontra-se a Queda Prematura dos Frutos Cítricos (QPFC), causada por *Colletotrichum acutatum* Simmonds. A medida predominante de controle desta doença é a pulverização com produtos químicos na época da florada. No entanto, os custos financeiros e ambientais de tais aplicações, aliado às crescentes restrições à presença de resíduos, estão a exigir o estudo de novas alternativas. Entre essas, o controle biológico surge como técnica importante que, além da sua coerência ecológica, em muitos casos, poderá se constituir em tecnologia poupadora de capital.

Muitos pesquisadores têm demonstrado a eficácia do controle biológico em diferentes interações entre antagonistas e fitopatógenos. Espécies de leveduras vêm sendo utilizadas como agentes de controle biológico para controle de *Botrytis cinerea*, agente causal do bolor

cinzento em uvas e morangos; de *Penicillium digitatum* em uvas; de *P. italicum* e *P. digitatum* em frutos de laranja; de *Botrytis*, *Rhizopus*, *Penicillium* e *Alternaria* em tomate e dos fungos *B. cinerea* e *Rhizopus*, causadores de doenças de pós-colheita em maçãs (MEHROTRA et al., 1996; JIJAKLI & LEPOIVRE, 1998; MASI et al., 2001; GUETSKY et al., 2001).

Atualmente, muitos estudos têm sido feitos com a utilização de bactérias antagonistas a determinados fitopatógenos para o controle de muitas doenças. A habilidade de bactérias formadoras de esporos (*Bacillus* spp.) permanecerem metabolicamente dormentes, por longos períodos, aumenta sua sobrevivência sobre a superfície foliar, possibilitando sua permanência em períodos secos, em temperaturas extremas e nas deficiências temporárias de nutrientes. Dessa maneira, várias linhagens bacterianas têm se mostrado promissoras como agentes de controle biológico (KNUDSEN & SPURR Jr., 1986). Estudos mostram, especialmente, a importância de *Bacillus subtilis* como agente de controle biológico a muitos fitopatógenos, tais como: a *Uromyces phaseoli* (BAKER et al., 1985); a *Pyricularia oryzae* (BETTIOL & KIMATI, 1989); a *Eutypa lata* (FERREIRA et al., 1991); a *Colletotrichum acutatum* (SONODA & GUO, 1996, KUPPER & GIMENES-FERNANDES, 2002, KUPPER et al., 2003 e KUPPER et al., 2009), a *Guignardia citricarpa* (KUPPER et al., 2004; KUPPER et al., 2005) e a *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (KALITA et al., 1996).

Espécies do gênero *Trichoderma*, até mesmo no que se refere a fitopatógenos de parte aérea, quando aplicadas em pulverizações, têm-se mostrado promissoras para o controle de doenças (TRONSMO & DENNIS, 1977; DUBOS et al., 1982; BASTOS, 1988; GULLINO & GARIBALDI, 1983; MEDEIROS & MENESES, 1994; MORETTO et al., 2001).

Relatos na literatura têm mostrado que muitas vezes, a introdução de agentes de biocontrole em condições controladas de ambientes apresenta eficiência no controle de doenças, porém em situações onde a introdução é realizada em plantios comerciais, não se verifica tal eficiência. As causas que podem levar à diferença de eficácia de controle são as mais variadas possíveis, porém, acredita-se que, em plantios comerciais onde as condições ambientes não são totalmente controladas, pode haver muita influência do ambiente na sobrevivência, no estabelecimento e na atividade dos agentes de biocontrole. Sob condições naturais, a superfície da filosfera está sujeita a flutuações de temperatura, umidade relativa, à falta de umidade na superfície, a gases e ao movimento do ar. Estas condições afetam a microflora da filosfera (incluindo os agentes de biocontrole) diretamente, ou podem ter um efeito indireto pelas modificações das características da planta hospedeira, o estado metabólico e superfície química dos órgãos da planta. Um dos caminhos para superar a ineficiência da maioria dos agentes de biocontrole, sob condições ambientais diversas, seria aplicá-los em mistura ou em alternância com fungicidas químicos ou aplicar mais do que um agente de biocontrole em um dado momento. A introdução de dois ou mais agentes de biocontrole na filosfera, assumindo que cada um tenha necessidades ecológicas diferentes e modo de ação diverso, poderá facilitar o controle da doença sem afetar a eficácia de organismo

separadamente sob diversas condições, podendo, inclusive, resultar em aumento na consistência de controle (GUETSKY et al., 2001).

Diante do exposto, este trabalho teve por objetivos: (i) estudar, sob condições de laboratório, a viabilidade do uso de isolados de *Saccharomyces cerevisiae* para o controle de *Colletotrichum acutatum* e (ii) testar seis isolados de levedura sozinhos ou, em combinação com três isolados de *Bacillus subtilis* e com um isolado de *Trichoderma pseudokoningii*, em flores destacadas de citros, quanto à capacidade de prevenir a infecção por *C. acutatum*.

MATERIAL E MÉTODOS

Os testes *in vitro* e a instalação do experimento, sob condições naturais, foram realizados no Laboratório de Fitopatologia e Controle Biológico e no campo, respectivamente, localizados no Centro de Citricultura “Sylvio Moreira” / IAC, Cordeirópolis-SP.

Os agentes de controle biológico (ACBs), *Trichoderma* spp. e *Bacillus subtilis*, foram isolados a partir de amostras de solo, de folhas e flores de citros retiradas de pomares de diferentes localidades do estado de São Paulo (Moretto et al., 2001; Kupper & Gimenes-Fernandes, 2002) e os isolados de *Saccharomyces cerevisiae* foram gentilmente cedidos pelo Dr. Sérgio Pascholatti da ESALQ/USP (Piracicaba/SP).

Efeito do período de incubação e temperatura na produção de células de *S. cerevisiae*:

Foram utilizados seis isolados de levedura denominados ACB-BG1, ACB-CAT1, ACB-CR1, ACB-K1, ACB-KD1 e ACB-PE2. Colônias de cada um dos isolados, com dois dias de idade e cultivadas em B.D.A. foram transferidas para tubos de ensaio contendo 10 mL de água destilada e esterilizada, e as concentrações ajustadas para 1×10^6 ufc/mL. Uma alíquota de 0,2 mL, de cada suspensão do respectivo isolado foi distribuída em placas de Petri contendo o mesmo meio de cultura. Em seguida, as culturas foram incubadas, no escuro, em diferentes temperaturas (15, 20, 27 e 35 °C) e em diferentes períodos de incubação (6, 12, 18, 24, 36, 48, 72 e 120 horas). Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições. A avaliação se deu por meio da contagem de células das leveduras, após cada período de incubação e temperatura, com auxílio de hemocítmetro.

Efeito de *S. cerevisiae* na germinação de *C. acutatum*:

Suspensões de células de *S. cerevisiae* (48 horas de idade) e do fungo (7 dias de idade) foram obtidas de colônias ativas, retiradas de placas de Petri contendo B.D.A.. Gotas de 10 µL das suspensões de cada agente de controle biológico (ACB) (1×10^6 ufc/mL) e do fitopatógeno (1×10^4 conídios/mL) foram depositados em áreas demarcadas de lâminas, previamente preparadas, contendo meio ágar-água. Para o tratamento testemunha foram

colocadas gotas de água destilada e esterilizada no lugar dos ACBs. Posteriormente, as lâminas foram colocadas no interior de placas de Petri esterilizadas, contendo um chumaço de algodão embebido em água estéril. As culturas foram incubadas em estufa para B.O.D. a 25 °C por 15 horas e, após o término desse período foram adicionados 10 µL de uma solução contendo azul lático, nas áreas demarcadas, com a finalidade de paralisar o desenvolvimento do patógeno. A seguir, procedeu-se a determinação do número de conídios germinados e não germinados. Para isto, foram avaliados 200 conídios, a partir dos quais se estabeleceu a porcentagem de germinação. Foi considerado germinado o conídio cujo tamanho do tubo germinativo era maior ou igual à sua largura mediana. Utilizou-se um delineamento inteiramente casualizado, sendo cada tratamento composto por sete repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos, comparadas pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

Eficiência de *S. cerevisiae* no controle de *C. acutatum* em flores destacadas de citros:

Pedúnculos de flores destacadas de laranjeira “Valência” foram inseridos em orifícios, contidos em espuma sintética umedecida sobre papel de filtro, presentes em caixas Gerbox® (Kupper & Gimenes-Fernandes, 2002). As flores foram tratadas com suspensões (1×10^7 ufc/mL) do agente de controle biológico (ACB), 24 horas antes e 24 horas depois da inoculação do patógeno (1×10^3 conídios/mL). As testemunhas foram constituídas de flores sem inoculação e com inoculação, porém, tratadas com água. Após a inoculação, as flores foram incubadas em estufa para B.O.D. a 22 °C por 72 horas. Determinou-se a porcentagem de flores sadias.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efeito do período de incubação e temperatura na produção de células de *S. cerevisiae*.

De acordo com os dados das tabelas 1, 2, 3 e 4, observa-se que, a produção de células de *S. cerevisiae* variou de acordo com o isolado testado, a temperatura e o período de incubação.

De um modo geral, a multiplicação de células de *S. cerevisiae* é favorecida pela temperatura de 35 °C, no período de 36 horas de incubação. Dentre os isolados testados o ACB-K1 foi o que apresentou maior média de unidades formadoras de colônias ($7,8 \times 10^7$ ufc/mL), diferindo estatisticamente dos demais que, por sua vez diferiram entre si.

Quando se avalia individualmente cada isolado de levedura, verifica-se que, apenas ACB-CR1 e ACB-CAT1 foram favorecidos pela temperatura de 27 °C, sendo os melhores períodos de incubação de 36 horas e 48 horas, respectivamente. Na temperatura de 15 °C houve menor multiplicação de células de leveduras para todos os isolados testados.

TABELA 1: Valores correspondentes a soma de quadrado, quadrado médio, significância e coeficiente de variação do efeito da produção de células de *Saccharomyces cerevisiae* em diferentes períodos de incubação e temperaturas.

C. Variação	Grau de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F
Isolado (I)	5	84075,32	16815, 58	2930,27**
Temperatura (T)	3	239818,26	79939, 52	13930,54**
Período de Incubação (P)	7	1087388,12	155341,17	27070,38**
I x T	15	33156,03	2210,15	385,20**
I x P	35	111957,54	3198,94	557,43**
T x P	21	180504,23	8595,64	1497,87**
I x T x P	105	100105,31	953,51	166,14**
Coeficiente de Variação (%)				4,01

**Diferença significativa a 1 % de probabilidade ($p < 0,01$).

TABELA 2: Número médio de unidades formadoras de colônias ($\times 10^6$) de diferentes isolados de *Saccharomyces cerevisiae*.

Isolados	ufc/mL $\times 10^6$
ACB – K-1	78,43 a ⁽¹⁾
ACB – KD-1	66,23 b
ACB – CAT-1	64,12 c
ACB – CR-1	55,15 d
ACB – BG-1	50,00 e
ACB – PE-2	41,30 f

⁽¹⁾ Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5 %.

TABELA 3: Efeito da temperatura no número médio de unidades formadoras de colônias de *Saccharomyces cerevisiae*.

Temperatura	ufc/mL $\times 10^6$
15 °C	30,01 d
20 °C	52,04 c
27 °C	70,99 b
35 °C	84,78 a ⁽¹⁾

⁽¹⁾ Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5 %.

TABELA 4: Influência do período de incubação no número médio de unidades formadoras de colônias ($\times 10^6$) de *Saccharomyces cerevisiae*.

Período de Incubação (horas)	ufc/mL $\times 10^6$
6	1,09 h
12	6,36 g
18	20,13 f
24	50,34 e
36	112,88 b
48	114,01 a ⁽¹⁾
72	92,36 c
120	79,49 d

⁽¹⁾ Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5 %.

Efeito de *S. cerevisiae* na germinação de *C. acutatum*.

De acordo com os dados apresentados na tabela 5, observa-se que, todos os isolados de *S. cerevisiae* inibiram a germinação de conídios de *C. acutatum*, porém, os isolados ACB-CR1, ACB-PE2, ACB-CAT1 e ACB-K1 foram os mais eficientes, com valores de inibições de

germinação que variaram de 78 a 82 %.

TABELA 5: Efeito de *Saccharomyces cerevisiae* na germinação de *Colletotrichum acutatum* em meio ágar-água, após 15 horas de incubação a 25 °C.

Tratamentos	% de esporos germinados	% de inibição
Testemunha	98,35 a ⁽¹⁾	1,64
BG-1	37,64 b	62,35
KD-1	29,21 bc	70,78
K-1	21,28 c	78,71
CAT-1	21,04 c	78,92
PE-2	20,92 c	79,07
CR-1	17,85 c	82,14

⁽¹⁾ Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 %.

Eficiência de *S. cerevisiae* no controle de *C. acutatum* em flores destacadas de citros.

Os dados apresentados na tabela 6, porcentagem de flores sadias curativo, mostraram que, isolado de ACB-K1 (*S. cerevisiae*) + ACB-66 (*B. subtilis*) foi o melhor tratamento com 92,63 % de flores sadias, comparado com as testemunhas, flores inoculadas e sem tratamento com agentes de biocontrole (0,6 % de flores sadias) e flores não inoculadas e não tratadas (99,83 % de flores sadias).

No entanto, é importante mencionar que três isolados de *S. cerevisiae*, ACB-K1, ACB-CR1 e ACB-KD1 sozinhos ou, em combinação com *Bacillus subtilis* (ACBs 66, 69 e 77) ou com *Trichoderma pseudokoningii* (ACB-37) apresentaram eficiência de controle de forma curativa que variaram de 74 a 88 %.

Quando se avaliam os dados da tabela 6, onde as pétalas foram tratadas preventivamente, antes da inoculação do patógeno, verifica-se que, o melhor tratamento foi a combinação da levedura ACB-CR1+66 com 89,70 % de controle, porém, esse tratamento não diferiu estatisticamente dos isolados ACB-BG1 e ACB-PE2 sozinhos ou, em combinação com os isolados de *B. subtilis* e *T. pseudokoningii*, com porcentagens de controle que variaram de 72, 23 a 89,20 %. O isolado de *S. cerevisiae*, ACB-CR1 sozinho ou, em combinação com ACB-77, ACB-69 e ACB-37, proporcionou 79,26; 80,19; 76,33 e 69,73 % de frutos sadios.

Quando se comparam os dados dos tratamentos curativo e preventivo, pode se concluir que existem diferenças entre os mecanismos de ações das leveduras estudadas. Por exemplo, quando as leveduras foram testadas de forma curativa, as melhores foram ACB-K1, ACB-CR1 e ACB-KD1 sozinhos ou, em combinação com os demais agentes de biocontrole. Por outro lado, quando as leveduras foram empregadas de forma preventiva, as mais eficientes foram ACB-CR1, ACB-BG1 e ACB-PE2 sozinhas ou, em combinação com os isolados de bactérias ou com *T. pseudokoningii*.

A única levedura que se mostrou eficiente nas duas formas de controle foi ACB-CR1. A utilização do isolado da bactéria ACB-66 na mistura com isolados das leveduras ACB-K1 (forma curativa) e ACB-CR1 forma preventiva) aumenta a eficiência e controle.

TABELA 6: Porcentagem de flores sadias de citros com tratamento curativo e preventivo, após tratamentos com agentes de biocontrole, sozinhos ou em mistura, e inoculação com *Colletotrichum acutatum*.

Tratamentos	% de flores sadias curativo	% de flores sadias preventivo
Testemunha não inoculada	99,83 A ⁽¹⁾	99,83 A ⁽¹⁾
K-1 + 66	92,63 AB	69,56 BCDE
CR-1 + 77	87,66 ABC	80,90 ABC
K-1 + 69	87,13 ABC	69,60 BCDE
K-1 + 77	86,56 ABC	69,26 BCDE
CR-1 + 69	85,93 ABC	76,33 ABCDE
KD-1 + 66	85,63 ABC	52,86 DE
KD-1 + 37	84,60 ABC	79,20 ABCD
CAT-1 + 37	84,60 ABC	70,03 BCDE
KD-1	84,00 ABC	67,30 BCDE
PE-2 + 66	83,96 ABC	76,96 ABCDE
CAT-1 + 66	83,90 ABC	58,36 CDE
KD-1 + 77	83,50 ABC	68,50 BCDE
K-1 + 37	82,13 BCD	70,80 BCDE
CR-1 + 66	82,10 BCD	89,70 AB
CAT-1	80,00 BCD	71,33 BCDE
CR-1 + 37	79,80 BCD	69,73 BCDE
K-1	79,20 BCD	49,96 E
BG-1 + 77	78,96 BCD	86,16 ABC
CR-1	76,93 BCD	79,26 ABCD
PE-2 + 69	76,66 BCD	86,43 AB
CAT-1 + 77	76,20 BCD	81,40 ABC
BG-1 + 66	75,66 CD	81,66 ABC
BG-1 + 69	74,86 CD	89,20 AB
BG-1	74,56 CD	85,86 ABC
CAT-1 + 69	74,20 CD	66,63 BCDE
KD-1 + 69	73,86 CD	73,16 ABCDE
PE-2	73,16 CD	77,96 ABCD
PE-2 + 77	72,86 CD	72,23 ABCDE
BG-1 + 37	71,86 CD	85,60 ABC
PE-2 + 37	65,26 D	84,46 ABC
Testemunha inoculada	0,60 E	0,60 F

⁽¹⁾ Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 %.

CONCLUSÃO

Os isolados de *S. cerevisiae* testados neste trabalho apresentam potencial de controle a *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos, tanto quando são aplicados sozinhos ou, em combinação com isolados de *B. subtilis* ou *Trichoderma pseudokoningii*, uma vez que, os tratamentos suprimem a produção de sintomas em flores de laranja “Valência” e, quando testados sozinhos foram capazes de inibir a germinação do fitopatógeno.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ – PIBIC, pela bolsa concedida.

Ao Centro APTA Citros “Sylvio Moreira” – IAC, pela oportunidade de estágio.

REFERÊNCIAS

- AGRIANUAL, 2009. **Anuário da Agricultura Brasileira**. São Paulo: FNP, Consultoria & Comércio, 2009. p. 267-300.
- BAKER C. J., STAVELY J. R. & MOCK N., Biocontrol of bean rust by *Bacillus subtilis* under field conditions. **Plant Disease**, v.69, p.770 - 772. 1985.
- BASTOS, C.N. Resultados preliminares sobre a eficácia de *Trichoderma viride* no controle da vassoura-de-bruxa (*Crinipellis perniciosa*) do cacauzeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.13, p.340-342, 1988.
- BETTIOL, W. & KIMATI, H. Seleção de microrganismos antagonísticos *Pyricularia oryzae* para o controle da brusone do arroz. **Summa Phytopathologica**, v.15, p.257-266, 1989.
- DUBOS, B., JAILLOUX, F., BULIT, J. Protection du vignoble contre la pourriture grise: les propriétés antagonistes du *Trichoderma* a l'égard du *Botrytis cinerea*. **Les Colloques de L'INRA**, v.11, p.205-219, 1982.
- 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.
- GUETSKY, R., SHTIENBERG, D., ELAD, Y. & DINOOR, A. Combining biocontrol agents to reduce the variability of biological control. **Phytopathology**, v.91, p.621-627, 2001
- GULLINO, M.L., GARIBALDI, A. Situation actuelle et perspectives d'avenir de la lutte biologique et integree contre la pourriture grise de la vigne en Italie. **Les Colloques de L'INRA**, Bordeaux, v.18, p.91-97, 1983.
- JIJAKLI, M.H. & LEPOIVRE, P. Characterization of an exo-b-1,3-glucanase produced by *Pichia anomala* strain K, antagonist of *Botrytis cinerea* on apples. **Phytopathology**, v.49, p. 234-237, 1998.
- KALITA, P., BORA, L.C. & BHAGABATI, K.N. Phylloplane microflora of citrus and their role in management of citrus canker. **Indian Phytopathology**, v.49, p.234-237, 1996.
- KNUDSEN, G.R. & SPURR Jr., H.W. Management of bacterial populations for foliar disease biocontrol. In: MUKERJEE, K.G., GARG, K.L. **Biocontrol of Plant Diseases**, v.7, p.83-92, 1986.
- KUPPER, K.C.; BELLOTTE, J.A.; GOES, A. de. Controle alternativo de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.31, n.4, p.1004-1015, 2009.
- KUPPER, K.C., BETTIOL, W., CORREA, E.B., MORETTO, C. Potencialidade de *Bacillus subtilis* e *Trichoderma* spp. como agentes de biocontrole de *Guignardia citricarpa*. **Fitopatologia Brasileira**, v 29: S129. 2004 (Abstract).
- KUPPER, K.C., BETTIOL, W., CORREA, E.B., MORETTO, C., GOES, A. de. Controle de *Guignardia citricarpa*, agente causal da mancha preta dos frutos cítricos, através de *Bacillus subtilis* e *Trichoderma* spp. Libro de Resúmenes: **XII Congreso Latinoamericano de Fitopatología – III Taller de la Asociación Argentina de Fitopatólogos**. 2005 (Abstract).
- KUPPER, K.C., GIMENES-FERNANDES, N. e GOES, A. de. Controle biológico de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. **Fitopatologia Brasileira**, v.28, p. 251-257, 2003.
- 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, p. 292-295, 2002.
- MASIH, E.I., SLEZACK-DESCHAUMES, S., MARMARAS, I., AIT BARKA, E., VERNET, G., CHARPENTIER, C., ADHOLEYA, A. & PAUL, B. Characterization of the yeast *Pichia*

- membranifaciens* and its possible use in the biological control of *Botrytis cinerea*, causing the grey mould disease of grapevine. **FEMS Microbiology Lett.**, v. 202, p.227-232, 2001.
- MEDEIROS, S.A.F., MENEZES, M. Potencial antagonico de alguns fungos a *Colletotrichum gloeosporioides*, agente causal da antracnose do cajueiro, *Anacardium occidentale*. **Fitopatologia Brasileira**, v.19, p.84-91, 1994.
- MEHROTRA, N.K., SHARMA, N., GHOSH (NAYEK), R. & NIGAM, M. Biological control of green and blue mould disease of citrus fruit by yeast. **Indian Phytopathology**, v. 49, p. 350-354, 1996.
- 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.
- SONODA, R.M., GUO, Z. Effect os spray applications of *Bacillus subtilis* on postbloom drop of citrus. **Phytopathology**, v.86, p.S52, 1996. Supplement.
- TRONSMO, A., DENNIS, C. The use of *Trichoderma* species to control strawberry fruit rots. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, v.83, p.449-455, 1977.