

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
CURSO DE AGRONOMIA**

Rodrigo Richter Ribeiro

**CONTROLE BIOLÓGICO DE *Neovectria ditissima* E *Fusarium* spp. NA CULTURA
DA MACIEIRA**

Curitibanos

2022

Rodrigo Richter Ribeiro

**CONTROLE BIOLÓGICO DE *Neonectria ditissima* E *Fusarium* spp. NA CULTURA
DA MACIEIRA**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação
em Agronomia, do Centro de Ciências Rurais,
Campus de Curitiba, da Universidade
Federal de Santa Catarina.

Orientador: Profa. Dra. Glória Regina Botelho

Curitiba

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Ribeiro , Rodrigo Richter
CONTROLE BIOLÓGICO DE *Neonectria ditissima* E *Fusarium* sp
NA CULTURA DA MACIEIRA / Rodrigo Richter Ribeiro ;
orientador, Glória Regina Botelho , 2022.
40 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Campus
Curitibanos, Graduação em Agronomia, Curitibanos, 2022.

Inclui referências.

1. Agronomia. 2. Macieira . 3. Controle Biológico. 4.
Bactérias . 5. Fungos . I. Botelho , Glória Regina . II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em
Agronomia. III. Título.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
Coordenação do Curso de Graduação em Agronomia
Rodovia Ulysses Gaboardi km3
CP: 101 CEP: 89520-000 - Curitibanos - SC
TELEFONE (048) 3721-4174 E-mail: agronomia.cbs@contato.ufsc.br.

RODRIGO RICHTER RIBEIRO

Controle biológico de *Neonectria ditissima* e *Fusarium* spp. na cultura da macieira.

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de Engenheiro Agrônomo, e aprovado em sua forma final pelo Curso de Graduação em Agronomia.

Curitibanos, 18 de novembro de 2022.



Documento assinado digitalmente
Douglas Adams Weiler
Data: 21/11/2022 14:11:13-0300
CPF: ***.111.820-**
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Prof. Dr. Douglas Adams Weiler
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:



Documento assinado digitalmente
Gloria Regina Botelho
Data: 22/11/2022 18:31:05-0300
CPF: ***.241.057-**
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Profª. Dra. Glória Regina Botelho
Orientadora
Universidade Federal de Santa Catarina



Documento assinado digitalmente
JOAO FREDERICO MANGRICH DOS PASSOS
Data: 23/11/2022 08:14:29-0300
CPF: ***.799.129-**
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Prof. Dr. João Frederico Mangrich dos Passos
Membro da banca examinadora
EPAGRI/Lages



Documento assinado digitalmente
Luciano Picolotto
Data: 23/11/2022 07:44:17-0300
CPF: ***.989.720-**
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Prof. Dr. Luciano Picolotto
Membro da banca examinadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Agradecimentos

A Deus, pelo dom da vida, por ter me mostrado o caminho da luz e nunca ter me abandonado, e nunca deixar eu desistir.

Aos meus pais, Marcio e Flávia, por terem me apoiado em cada passo que dei até aqui, sempre deram tudo de si para eu poder realizar meus sonhos, além desse amor incondicional que me empurrou e fez ir para frente, além disso todas as vezes que eu pensei em desistir eles estavam me dando força para continuar.

Aos meus familiares, que também estiveram sempre ao meu lado e muitas vezes abriram as portas de suas casas e me acolheram, além de me oferecerem conselhos aos quais levarei para a vida toda. Me dando apoio durante essa caminhada.

Aos meus amigos, em especial Camila Maria Ramiro, Caroline Vaz, Cintia Faquin, Gisele de Souza, Thaise Novaes, Gislaine Lemos, Marivone Richter, que me acolheram em suas vidas e me mostraram que quando caminhamos com bons amigos, a vida se torna mais doce. E mais especial ainda agradecer a Lucas Seisl Machado, que sempre esteve ao meu lado em todos os momentos, me ouvindo, aconselhando, me auxiliando, e sempre me impulsionando pra frente.

Agradeço a minha professora, orientadora e amiga, Glória Regina Botelho, pelas inúmeras vezes que me ouviu e me orientou, pelos puxões de orelha, pelo conhecimento transmitido e por não ter me deixado desistir, por sempre estar do meu lado, agindo como uma mãe que me acolheu e me amparou sempre que eu precisei.

Aos meus colegas de grupo, em que muitas vezes pedi auxílio durante a trajetória, e sempre me estenderam a mão.

Aos colegas de curso, técnicos, servidores, por terem feito parte da minha caminhada nessa Universidade.

Muito obrigado a todos.

RESUMO

A cultura da macieira é considerada uma das principais espécies frutíferas de clima temperado, cultivadas na região Sul. Várias doenças vêm causando problemas em pomares comerciais de cultura da macieira. Algumas das principais doenças são causadas por fungos, entre esses: *Neonectria ditissima* (relacionado a doença conhecida como Cancro Europeu) e *Fusarium* sp (causador da doença conhecida como Podridão Carpelar). Essas doenças são de difícil controle químico, isso muitas vezes pelo fato da resistência, devido ao excesso de produtos utilizados. Uma alternativa é o controle biológico. Com base nisso, este trabalho buscou testar bactérias que foram isoladas de cultivo de macieira, para o controle desses fungos *in vitro*. Inicialmente, foram isoladas e purificadas 23 bactérias que foram estocadas. Os fungos foram obtidos através de uma parceria com a Epagri de São Joaquim, com o pesquisador Felipe Augusto Moretti Ferreira Pinto. Após serem recebidos, os fungos foram purificados e estocados. O experimento de antagonismo *in vitro* foi realizado no laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Santa Catarina, campus de Curitiba, onde este realizado em Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC), com 6 repetições e 24 tratamentos. Além disso, para fins de identificação dos mecanismos de controle dos fungos, as bactérias foram realizadas análises de produção de enzimas extracelulares (lipase e quitinase) e produção de sideróforos. Das 23 bactérias isoladas, nove foram capazes de inibir o fungo *Fusarium* spp, e sete foram capazes de inibir o fungo *Neonectria ditissima*. O resultado dos testes de enzimas mostrou que 16 bactérias foram capazes de produzir essa enzima, dentre elas sete bactérias foram capazes de inibir o fungo *Fusarium* e cinco inibiram o fungo *Neonectria ditissima*. Com relação a produção de sideróforos, 13 isolados bacterianos testaram positivos para este composto, 5 dos isolados mostraram inibição dos dois fungos. Esses resultados demonstram o potencial que microrganismos isolados de materiais vegetais tem, no controle de doenças, mostrando que o Controle Biológico é uma alternativa eficiente para diminuir o uso de produtos químicos e assim além de tornar os frutos mais saudáveis, também diminui os impactos ambientais.

Palavras – chave: Rizobactérias, Biocontrole, Maçã, Fungos, Doenças;

ABSTRACT

The apple tree culture is considered one of the main fruit species of temperate climate, cultivated in the South region. Several diseases have been causing problems in commercial apple orchards. Some of the main diseases are caused by fungi, among these: *Neonectria ditissima* (related to the disease known as European Cancer) and *Fusarium* spp (which causes the disease known as Carpelar Rot). These diseases are difficult to control chemically, this is often due to the fact of resistance, due to the excess of products used. An alternative is biological control. Based on this, this work sought to test bacteria that were isolated from apple tree cultivation, for the control of these fungi *in vitro*. Initially, 23 bacteria were isolated and purified and stored. The fungi were obtained through a partnership with Epagri de São Joaquim, with researcher Felipe Augusto Moretti Ferreira Pinto. After being received, the fungi were purified and stored. The *in vitro* antagonism experiment was carried out in the Microbiology laboratory of the Federal University of Santa Catarina, Curitibanos campus, and this was carried out in a completely randomized design (DIC), with 6 replications and 24 treatments. In addition, for the purpose of identifying the fungal control mechanisms, the bacteria were analyzed for the production of extracellular enzymes (lipase and chitinase) and production of siderophores. Of the 23 bacteria isolated, nine were able to inhibit the fungus *Fusarium* spp, and seven were able to inhibit the fungus *Neonectria ditissima*. The result of the enzyme tests showed that 16 bacteria were able to produce this enzyme, among them seven bacteria were able to inhibit the fungus *Fusarium* and five inhibited the fungus *Neonectria ditissima*. Regarding the production of siderophores, 13 bacterial isolates tested positive for this compound, 5 of the isolates showed inhibition of both fungi. These results demonstrate the potential that microorganisms isolated from plant materials have in disease control, showing that Biological Control is an efficient alternative to reduce the use of chemicals and thus, in addition to making fruits healthier, also reduces environmental impacts.

Keywords: Rhizobacteria, Biocontrol, Apple, Fungi, Diseases;

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
1.1	OBJETIVOS.....	11
1.1.1	Objetivo Geral	11
1.1.2	Objetivos Específicos	11
1.2	JUSTIFICATIVA	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1	A CULTURA DA MACIEIRA	13
2.2	PRINCIPAIS DOENÇAS DA MACIEIRA	14
2.2.1	Cancro Europeu	15
2.2.2	Podridão Carpelar	16
2.3	CONTROLE DE DOENÇAS.....	18
2.3.1	Controle Biológico de Doenças	18
2.4	RIZOBACTERIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO	20
3	MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1	ISOLAMENTO E ESTOCAGEM DAS BACTÉRIAS DE MACIEIRA	21
3.2	ESTOCAGEM DOS FUNGOS <i>Neonectria ditissima</i> e <i>Fusarium</i> spp.	21
3.3	TESTE GRAM	21
3.4	TESTE DE ANTAGONISMO <i>in vitro</i> DOS ISOLADOS BACTERIANOS	22
3.5	AVALIAÇÃO DE MECANISMOS DE EFEITO INDIRETO NO CRESCIMENTO DE PLANTAS ..	23
3.5.1	Produção de Sideróforos	23
3.5.2	Produção de enzimas extracelulares	24
3.6	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	25
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4.1	CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS DOS ISOLADOS BACTERIANOS	26
4.2	MECANISMOS DE PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE EFEITO INDIRETO.....	27
4.2.1	Produção de Sideróforos	27
4.2.2	Produção de enzimas extracelulares	28
4.3	AVALIAÇÃO DE ANTAGONISMO <i>in vitro</i> DE ISOLADOS BACTERIANOS	30
4.3.1	Inibição ao <i>Fusarium</i> spp.	30
4.3.2	Inibição de <i>Neonectria ditissima</i>	32
5	CONCLUSÃO	35
	REFERÊNCIAS	36

1 INTRODUÇÃO

O cultivo de macieira é uma atividade consolidada no Brasil. Essa cultura tem grande importância socioeconômica para o país, principalmente na região Sul, onde a cultura é uma das principais espécies frutíferas da região, sendo que a mesma contabiliza cerca de 99% da área plantada (PICOLOTTO, 2021). Nessa região, os principais estados produtores são Santa Catarina e Rio Grande do Sul (CANAL AGRO, 2021).

Uma das maiores limitações da cultura, desde o início de sua implantação no país, é a ocorrência de problemas fitossanitários. Dentre esses estão as doenças Cancro Europeu e Podridão Carpelar (PICOLOTTO, 2021). Essas doenças são causadas por diferentes fungos que vêm causando prejuízos aos pomares que são respectivamente, *Neonectria ditissima* (Cancro Europeu) e *Fusarium* sp (Podridão Carpelar) (PAGNO, 2009). O Cancro Europeu é considerada uma doença quarentenária, que pode causar grandes perdas, pelo fato de que em alguns casos, é considerada uma doença grave, pelo fato de muitas vezes para se evitar a contaminação, a planta infectada deve ser eliminada (CAMPOS, 2015). A podridão carpelar tem-se tornado uma importante doença no Brasil, deixando de ser considerada uma doença secundária dentro do grupo das doenças de verão, a mesma tem sido um problema mais frequente nos pomares do país, e seu controle, realizado com produtos químicos, é ineficaz (SILVEIRA et al., 2013). Para a redução das perdas causadas por essas doenças, o principal método utilizado tem sido o controle químico. Outras práticas culturais como o poda e o manejo adequado das plantas podem ajudar no controle dessas doenças, mas não tem sido suficiente. E então, surge o controle biológico como uma das principais opções para auxiliar os produtores em seus pomares (PETRI et al., 2011).

Essas doenças ocorrem, principalmente, na segunda metade do ciclo vegetativo das plantas. Por se tornarem evidentes próximo à colheita, devido as anomalias no fruto, e não se dispor de métodos eficazes de controle causam perdas significativas (PETRI et al, 2011). Melo (2021) observou que, com a intensa utilização de fungicidas químicos, começam a surgir perdas de sensibilidade e resistência de patógenos a muitos grupos químicos, além de impactos negativos ao ambiente. Diante disso, medidas alternativas de controle podem ser utilizadas para garantir a sustentabilidade da agricultura.

Com a demanda crescente pela produção de alimentos, consequência do crescimento populacional, há a exigência do uso de novas tecnologias aplicadas à agricultura para que se possa tornar essa atividade cada vez mais produtiva e sustentável (MELO, 2021).

Atualmente busca-se alternativas para o controle de doenças de formas menos prejudiciais ao meio ambiente e ao ser humano, visando a redução ou eliminação do uso de defensivos, buscando a produção de alimentos saudáveis (VIEIRA, 2013). Nos últimos anos, o mundo tem tomado conhecimento e observado a potencialidade do desenvolvimento de tecnologias específicas para ativar os mecanismos de defesa de plantas como forma inteligente ao uso indiscriminado de defensivos (MELO, 2021). O controle biológico é uma ferramenta indispensável, em que se busca maior eficiência de controle e de utilização dos recursos da terra com baixo custo.

O controle biológico, ainda é pouco utilizado por produtores, e consiste na utilização de microrganismos benéficos para minimizar o ataque e severidade de doenças em plantas (SCHÄFER, 2017; OLIVEIRA, 2022). Ratz (2017) observou que dentre esses microrganismos, as rizobactérias têm sido intensamente estudadas. Araujo *et al.* (2011) descreveram que existem rizobactérias que são promotoras do crescimento de plantas e são, frequentemente, isoladas da rizosfera de diversas culturas. Além disso, Oliveira (2009) citou que as rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCP), também podem colonizar órgãos e exercerem, assim, efeitos benéficos às plantas. Como colonizadoras de tecidos vegetais passam a ser denominadas endofíticas. Entre os gêneros mais estudados, destacam-se: *Bacillus* e *Pseudomonas*. Dentre os efeitos desses microrganismos sobre o desenvolvimento das plantas, estão os efeitos benéficos na germinação de sementes, emergência de plântulas e em seu crescimento, como produção de reguladores de crescimento, incremento no suprimento de elementos como nitrogênio, fósforo e, possivelmente ferro, além de atuarem como agentes de controle biológico (BERNARDES, 2008; MELO, 2021; OLIVEIRA, 2022).

Dentre os mecanismos de ação de rizobactérias para uso em controle biológico, a produção de compostos antibióticos tem sido considerada como um dos mais importantes, pois atua na supressão de patógenos (MELO, 2021). Os antibióticos são compostos orgânicos de baixo peso molecular que, mesmo em baixas concentrações são deletérios ao crescimento de outros microrganismos patogênicos (MELO, 2021). Segundo Júnior *et al.* (2013), RPCP as são os microrganismos antagonistas mais estudados atualmente com potencial para serem utilizados na agricultura.

Seu uso pode constituir uma alternativa biológica promissora para aumentar a produtividade das culturas e reduzir as entradas de insumos agrícolas em agroecossistemas (RATZ *et al.*, 2017). Vieira (2013) relatou que tem se buscado no controle biológico, por rizobactérias residentes de filoplano ou endofíticas, pois atualmente existem poucos trabalhos envolvendo controle biológico em culturas perenes, como a macieira. Os microrganismos endofíticos incluem, principalmente, aqueles que vivem no interior das plantas, habitando de modo geral em suas partes aéreas, como folhas e caules, sem causar aparentemente nenhum dano a seus hospedeiros (SANTOS; VARAVALLO, 2011). Santos e Varavallo (2011) relatam que, tem havido um crescente interesse no estudo da ocorrência, e do potencial de colonização e da utilização de bactérias endofíticas, e outros endófitos, para a promoção de crescimento e controle biológico de doenças de plantas.

Essas bactérias endofíticas são mais facilmente encontradas em plantas perenes. Acredita-se então, que algumas das bactérias isoladas neste trabalho, oriundas dos materiais de pomares da região produtora de São Joaquim, possivelmente são endofíticas, pois foram retiradas, também de tecidos foliares e esses microrganismos são descritos como capazes de colonizar folhas de culturas de perenes (BRUISSON; *et al.* 2019).

Neste sentido, acredita-se que bactérias isoladas de cultivos perenes, como macieiras possam inibir doenças como Cancro Europeu e Podridão Carpelar.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito de isolados bacterianos de macieira no controle de *Neonectria ditissima* (Cancro Europeu) e *Fusarium* sp. (Podridão Carpelar) *in vitro*

1.1.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o potencial inibitório dos isolados bacterianos *in vitro*;
- Detectar a capacidade dos isolados bacterianos de produzir sideróforos e enzimas extracelulares;
- Caracterização inicial dos isolados bacterianos;

1.2 JUSTIFICATIVA

No cultivo da maçã, algumas doenças podem levar à perda de produtividade e qualidade. Como os frutos são altamente valorizados por sua aparência estética, a proteção fitossanitária desempenha um papel fundamental, auxiliando assim, na produtividade da cultura. Além dos requisitos estéticos, os mercados de importação também impõem restrições rigorosas de quarentena para impedir a entrada de novos patógenos, o que significa que os produtores lutam para atender aos padrões estabelecidos. Também exigem que os produtos estejam livres de resíduos de agrotóxicos considerados nocivos à saúde humana e ao meio ambiente (STANDNIK; MONDINO; BUTIIGNOL, 2009). Segundo Piero, Tagliari e Saa (2009), os princípios de proteção do meio ambiente e dos recursos naturais também devem ser observados na cadeia produtiva da fruta para atender ao cumprimento da legislação e da segmentação de mercado. Essa situação exige mudanças nos sistemas de produção e a adoção de novas tecnologias que atendam a todas as necessidades para que as atividades se tornem e se mantenham competitivas. A adoção do manejo fitossanitário em pomares tem levado a avanços contínuos nesse sentido.

Nesse contexto, o controle biológico vem como uma alternativa para os produtores, de forma simples e eficaz, no combate a pragas e doenças. Além disso, esse método tem menor impacto ambiental e também se torna uma maneira mais econômica de controle de doenças. Com base nesses aspectos se torna evidente a importância de estudar essas bactérias para o controle de *Neonectria ditissima* e *Fusarium* spp. pelo fatos destas doenças serem de difícil controle, terem se mostrado bastante agressivas e com o intuito de diminuir as perdas na produção dos agricultores que dependem de seus pomares.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A CULTURA DA MACIEIRA

A macieira é nativa da Europa e pertence à família Rosaceae, subfamília Maloidae (Pomoidae), gênero *Malus*, da espécie *Malus domestica*. É uma fruta nobre e mais concentrada na região subtropical e subpolar. O ciclo anual da maçã consiste em duas fases distintas: fase vegetativa e fase produtiva. A fase vegetativa é uma característica da fisiologia vegetal, para ser superada se faz necessários um somatório de horas de frio, cerca de 450 á 550 horas de uma temperatura abaixo de 7,2°C, para a quebra da dormência de gemas, para ocorrer o desenvolvimento de um ramo produtivo (BRAGA; PANDOLFO; PEREIRA, 2001).

Segundo dados mundiais, a China é considerada o maior produtor de maçã do mundo, produzindo quase 45 milhões de toneladas no ano 2020 (Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO)). Os Estados Unidos são o segundo maior produtor, respondendo por 6,2% do total global Maçãs produzidas em 2020. China e Estados Unidos da América produzem juntos mais de 50% do total mundial (ATLASBIG, 2020).

A cultura da macieira no Brasil se concretizou comercialmente, na década de 1970, e até aquela época existiam poucos plantios comerciais, com menos de 100 hectares de pomares espalhados pelo país. Seguindo a iniciativa de alguns produtores pioneiros, incentivos fiscais que permitiram que parte do imposto de renda fosse aplicado no cultivo de pomares e apoio do governo estadual a projetos de desenvolvimento, a cultura da macieira teve impulso, desde a década de 80 (PETRI *et al.*, 2011). Segundo Petri *et al.* (2011), o Brasil é exportador de maçãs desde 1994, e desde 2000 as exportações superaram as importações. Neste sentido, a produção de maçã, não é um evento novo no país, fazendo parte importante da renda agrícola nos estados do Sul, especialmente em Santa Catarina. O estabelecimento da cultura, especialmente na região sul, dá-se pelo fato de a cultura necessitar de quantidade significativa de horas de frio para superar a dormência das gemas (BRAGA; PANDOLFO; PEREIRA, 2001)

A produção de maçã está localizada no Sul do Brasil, envolvendo os três estados, principalmente a parte mais fria da região, incluindo a região de Vacaria no estado do Rio Grande do Sul, São Joaquim e Fraiburgo no estado de Santa Catarina, e Palmas, Paraná (PETRI *et al.*, 2011).

Em Santa Catarina, as duas principais áreas produtoras de maçã são Friburgo e cidades vizinhas (Monte Carlo, Lebon Régis, Tangará, Água Doce e Santa Cecília). Outro importante polo produtor de maçã em Santa Catarina, está localizado na zona central da serra, São Joaquim

e cidades vizinhas (Bom Jardim da Serra, Urubici, Urupema, Bom Retiro e Lages). Nos dois polos de produção, de Santa Catarina, as principais cultivares são a Fuji e a Gala (SEAGRI, 2010).

Segundo o relato de Bleicher *et al.* (1986), os pomares localizados no estado de Santa Catarina, encontram-se em localidades em que a precipitação pluviométrica é bastante expressiva e as temperaturas médias, principalmente na primavera, ficam em torno de 16° C e 25°C. Estas condições de clima são propensas ao desenvolvimento de várias doenças, que quando não controladas a tempo, conferem perdas expressivas na produção, afetando também, de forma significativa, a qualidade dos frutos.

Nos últimos anos, o conceito de qualidade evoluiu. Basicamente, observa-se que o padrão de qualidade da maçã se concentra de duas formas: referente a do produtor e do consumidor. Do ponto de vista do produtor, esse conceito de qualidade, basicamente, está ligado a concepção visual, forma e cor, sendo assim produzir um fruto que atenda às necessidades do consumidor. Já quando se fala no padrão de qualidade do consumidor, a qualidade está relacionada a valores organolépticos, nutricionais e até mesmo medicinal, reconhecidos no fruto.

Para a sociedade, a forma de produção também tem sido um fator de qualidade, de modo que a tecnologia de produção empregada, proteja o meio ambiente e seja sustentável e também, proteja a saúde de trabalhadores e consumidores (STANDNIK; MONDINO; BUTIOGNOL, 2009).

2.2 PRINCIPAIS DOENÇAS DA MACIEIRA

As doenças relacionadas a cultura da macieira são as principais causadoras de problemas fitossanitários relacionados à cultura. A ocorrência dessas está relacionada a três fatores fundamentais: hospedeiro suscetível, patógeno virulento e ambiente favorável (OLIVEIRA, 2022).

Em Santa Catarina, apesar das condições ambientais serem ideais para a cultura da macieira, essas condições, principalmente a pluviométrica, mostra-se também ideal para a proliferação de doenças, principalmente, aquelas causadas por fungos. Esses podem causar doenças de grande significância para a cultura. Algumas das doenças que acometem a cultura são: Cancro Europeu (*Neonectria ditissima*) sendo está caracterizada por ser uma praga quarentenária no estado de Santa Catarina e vem causando grandes danos aos pomares do estado;

e Podridão Carpelar (*Fusarium* sp), considerada uma das principais doenças de verão e nos últimos anos vem sendo relatadas em níveis alarmantes nos pomares das regiões produtoras de maçã do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina (CHAVERRI *et al.*, 2011; SILVEIRA, 2011; OLIVEIRA, 2022).

2.2.1 Cancro Europeu

O cancro europeu é uma doença da macieira que, embora só tenha sido relatada pela primeira vez no Brasil em 2012, era comum na maioria dos países produtores de maçã. O desenvolvimento dessa doença é fortemente influenciado pelo clima. Assim, em algumas regiões, a doença causa grandes prejuízos à produção, mas em outras é secundária (ALVES; NUNES; MENDES, 2014).

A doença é causada pelo fungo *Neonectria ditissima*, do filo Ascomycota, esse fungo é capaz de germinar em uma ampla faixa de temperatura, de 5 a 32°C, mas a faixa ideal está entre 11 e 16°C. De maneira geral, o fungo possui dois tipos de esporos: conídios (forma assexuada) e os ascósporos (forma sexuada). Ambos os tipos têm a capacidade de infectar novas plantas hospedeiras. Nos dois casos, o fungo pode ser disseminado através do vento e também pela chuva. É importante ressaltar que a infecção das macieiras só ocorre quando os esporos são depositados em ferimentos na planta, seja de forma natural ou por tratamento (OLIVEIRA, 2022).

Na cultura, pode se observar, que o fungo afeta, principalmente, as partes lenhosas das plantas, como os ramos do ano e o tronco principal da planta. Quando mais avançada a doença pode afetar os frutos (ALVES; NUNES; MENDES, 2014).

Em pomares, o início da doença pode se dar pela disseminação dos esporos do fungo, através de mudas infectadas ou por pomares adjacentes já infectados. Em alguns casos, os indivíduos infectados podem não apresentar sintomas no momento do plantio de novos pomares. Em pomares já estabelecidos os sintomas, geralmente, levam de dois a três anos para surgir (OLIVEIRA, 2022).

Segundo Alves, Nunes e Mendes (2014), em alguns casos, a principal forma de infecção da doença, dá-se através de ferimentos que se formam durante a queda das folhas no outono. Após esse período, a planta inicia um o processo de autocura natural daquele ferimento. Esse período, em que a planta fica mais susceptível à infecção da doença, dura de um a 28 dias, deixando assim um local de entrada para os esporos do fungo. O patógeno entra nos tecidos

mais internos da planta, no câmbio. Isso resulta em ressecamento ou trincamento da casca que acaba soltando como uma folha papel, deixando assim, visível o lenho no tronco e ramos. O fungo também pode causar estrangulamento e até mesmo levar a morte do ramo (CAMPOS, 2015).

Os primeiros sintomas visíveis de infecção começam com pigmentação vermelha a marrom escuro na casca, no galho ou até mesmo no tronco. Essa lesão acaba por aumentar de tamanho, evoluindo assim, para uma depressão de cor marrom-escuro, com formato ovalado. Em volta do cancro, pode se observar espessamento ou levantamento da casca externa, causando uma espécie de calo (Figura 1). A casca onde aparecem as lesões afundadas, acaba por morrer, seca, racha, solta e se quebra, um sintoma fácil de ser visto (ARAUJO *et al.*, 2016). Pelo fato de o fungo agredir o caule e os ramos principais, os danos são mais agressivos em plantas jovens, quando comparado com plantas mais velhas, em que a infecção pode ser melhor observada em ramos menores. De maneira geral, quando o caule da planta está afetado, seu vigor e seu potencial produtivo fica afetado, tornando-se susceptível à quebra pelo vento (ALVES; NUNES; MENDES, 2014).

Figura 1: Sintomas de Cancro Europeu (*Neonectria ditissima*) em Macieira



Fonte: Embrapa, 2019.

O Cancro é uma doença que varia de local para local. É difícil se ter uma estimativa dos danos e das perdas, pelo fato de atacar todas as etapas da produção. Atualmente, além do controle químico, uma alternativa para o controle desta doença, é a eliminação das plantas infectadas. Em casos extremos cerca de até 10% de um talhão pode ter de ser exterminado (CAMPOS, 2015).

2.2.2 Podridão Carpelar

A podridão carpelar, causada pelo fungo *Fusarium* spp. é uma doença que vem se mostrando de grande importância no Brasil, incidindo na maioria dos principais pomares das regiões produtoras da fruta. Segundo pesquisadores da área, no Brasil, a recomendação de

controle químico não é eficiente para a doença. Essa doença ocorre principalmente na cultivar Fuji. Um dos principais fatos é de que essa cultivar apresenta floração desuniforme e espaçada, frutos achatados e cavidade pistilar aberta e isso acaba por criar condições que facilitam a entrada do patógeno (OLIVEIRA, 2022).

A podridão carpelar é causada por diversos fungos. Os principais são os fungos do gênero *Fusarium* spp, do filo Ascomycota. Ocorre com maior frequência em cultivares com canal calcinar curto e aberto, como a Fuji. A época em que mais se observa a infecção pelo fungo é na floração, em que os frutos apresentam abertura permitindo a entrada até a cavidade dos carpelos, dependendo do vigor das plantas e da qualidade dos frutos. Esses frutos que foram infectados pelo patógeno, não necessariamente apresentam sintomas na colheita. Muitas vezes, essas aparecerão somente na comercialização (SILVA *et al.*, 2018). Nas regiões afetadas pela doença, pode se observar o crescimento de micélio do fungo que ocupa todos os espaços vazios do fruto. Em estágios mais avançados, o fungo colonizará todo o mesocarpo, causando assim, a podridão que se manifesta de dentro para fora (Figura 2). É caracterizada pela formação de micélios de coloração preta ou cinza, ocupando todos os espaços vazios, também sobre as sementes e paredes dos carpelos (BLEICHER *et al.*, 1986; SILVEIRA *et al.*, 2013).

Figura 2: Sintomas de Podridão Carpelar (*Fusarium* spp) em frutos de maçã;



Fonte: Marchetti, 2019

Bleicher *et al.* (1986), observa que a disseminação desta doença é feita através da chuva e do vento. Esse fungo sobrevive saprofiticamente em diferentes substratos. Após a colheita esse fungo pode colonizar o mesocarpo do fruto.

A ocorrência dessa doença é principalmente observada em câmaras frias, onde os frutos reduzem a sua capacidade de conservação. A comercialização dos frutos é muito prejudicada por esta doença, pois quando são cortados, esses apresentarão podridão de tecidos (BLEICHER *et al.*, 1986). Após a colheita, no momento da comercialização, os sintomas de podridão começam a aparecer (SILVEIRA *et al.*, 2013).

A podridão carpelar em maçãs pode causar perdas de até 15% na pós-colheita. Na fase inicial de desenvolvimento, a incidência pode ocorrer em até 40% das maçãs Fuji que foram recém-colhidas, quando expostas a temperaturas ambiente por mais 10 dias, no entanto a incidência da doença pode chegar a 60%. O fungo tem se mostrado de difícil controle, principalmente quando obtém condições climáticas favoráveis para se desenvolver, o que é comum na maioria das regiões produtoras do Brasil (SILVA *et al.*, 2018).

2.3 CONTROLE DE DOENÇAS

O controle das doenças da macieira tem sido baseado no uso de produtos químicos, isso pode trazer consequências como poluição ambiental, aumento dos custos de produção e maior probabilidade de surgimento de populações resistentes. Por isso, diferentes estratégias têm sido desenvolvidas e refinadas para minimizar os impactos ambientais e na saúde humana decorrentes do uso excessivo de agrotóxicos, uma dessas estratégias é o controle biológico (ARAUJO *et al.*, 2019).

2.3.1 Controle Biológico De Doenças

A preocupação da sociedade com o impacto da agricultura com a contaminação causada por agrotóxicos tem alterado o cenário agrícola, resultando em mercados de alimentos produzidos sem o uso de agrotóxicos. Esses aspectos estão fazendo com que a situação do uso de produtos químicos permeie a agenda ambiental de diversos países. Dentre as alternativas para a redução do uso de agrotóxicos o controle biológico é um dos mais discutidos, podendo tanto aproveitar o controle biológico natural, quanto realizar a introdução de um agente de controle biológico (MORANDI; BETTIOL, 2009).

A busca pela redução do uso agrotóxicos nos pomares de maçã tem sido um grande desafio para muitos produtores. Com base nos estudos de entidades de pesquisa o controle biológico de patógenos têm mostrado um grande aliado na diminuição de agrotóxicos nos últimos anos. Um bom exemplo disso é uma empresa de Fraiburgo (SC), a mesma possui cerca de 930 hectares de pomar, e o uso de agrotóxicos já reduziu pelo menos pela metade com o emprego dessa técnica (AGRO LINK 2007; MORANDI; BETTIOL, 2009).

O controle biológico de doenças busca uma redução do inóculo ou da atividade deletéria de algum tipo patógeno, através de um ou mais organismos. O inóculo do patógeno inclui todas as suas estruturas vegetativas (conídios, zoósporos, micélio, etc.) e reprodutivas (ascósporos,

basidiósporos, oósporos, entre outros) enquanto que a atividade patogênica acaba por envolver o crescimento, infectividade, virulência, agressividade, dentre outros atributos responsáveis pelo desenvolvimento e a capacidade de criar danos ao hospedeiro, de uma determinada doença (MORANDI; BETTIOL, 2009; SILVA *et al.*, 2018).

Os organismos utilizados para o controle biológico, também chamados de agentes de controle biológico ou antagonistas interferem na sobrevivência ou atividades deletérias dos patógenos, podendo assim aumentar, de uma forma antagônica, a resistência da planta hospedeira (OLIVEIRA, 2022).

Em culturas que possuem importância econômica, como frutíferas por exemplo, existe uma grande quantidade de perdas, principalmente pela alta susceptibilidade à infecção que as frutas possuem, sendo a maioria das doenças causadas por fatores ambientais e também por danos mecânicos causados durante a colheita e a armazenagem. Em muitos casos esses fatores são bem importantes na ocorrência de doenças causadas por microrganismos, principalmente fungos e bactérias, que são favorecidos por danos físicos e fisiológicos. A utilização de microrganismos, que atuam sobre patógenos na forma de antagonistas é de suma importância para controlar doenças que causam danos em frutíferas (OLIVEIRA, 2022).

O controle biológico através de substâncias produzidas por bactérias, tem se demonstrado uma alternativa ao uso de agrotóxicos. Os principais mecanismos de ação das bactérias contra fitopatógenos, parasitismo direto ou predação, a antibiose, a competição por nutrientes e por sítios, pelo estímulo da resistência do hospedeiro, produção de enzimas extracelulares. Dentre as principais enzimas capazes de realizar o controle de fungos fitopatogênicos, estão as Lipases e Quitinases. Essas duas enzimas são capazes de degradar a parede celular de fungos, pelo fato de que os principais componentes são quitina e lipídeos. Assim, as enzimas atuarão sobre esses compostos causando degradação do fungo. Alguns autores citam as bactérias do gênero *Pseudomonas* do grupo fluorescentes e algumas não fluorescentes, como um dos principais antagonistas mais eficazes no controle de doenças, assim como outras do gênero como *Bacillus* spp., *Streptomyces* spp. e algumas representantes da família das Enterobacteriaceae. O controle biológico se dá, principalmente, pela ação de metabólitos produzidos pela bactéria que acaba controlando o desenvolvimento de muitos patógenos causadores de doenças (MORANDI; BETTIOL, 2009; OLIVEIRA, 2022).

O elemento ferro (Fe) é importante tanto para o desenvolvimento de plantas e de microrganismos. A competição contínua por esse elemento pode ser responsável pela diminuição do desenvolvimento de vários patógenos. Os sideróforos, são compostos produzidos

por vários microrganismos, que possuem alta atividade quelante, especialmente com relação ao ferro férrico (OLIVEIRA, 2022). Esses compostos, que são moléculas orgânicas que possuem baixo peso molecular e são sintetizadas por microrganismos, atuando como agentes quelantes de metais que capturam o ferro ferroso insolúvel de diferentes habitats, fazendo assim, com que o mesmo fique indisponível para outros microrganismos, podendo atuar de forma indireta no controle de patógenos (AMARAL *et al.*, 2020).

2.4 RIZOBACTERIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO

Rizobactérias são microrganismos que são capazes de colonizar as raízes de plantas e também suas rizosferas, podendo ser simbiontes ou saprófitas de vida livre. Os benefícios que RPCPs podem ser observados em diversas culturas. A promoção de crescimento em plantas pode ocorrer de diferentes maneiras. Diretamente no crescimento, pela produção de fitormônios (como auxinas, giberelinas, etilenos, entre outros.) e aumento da disponibilidade de alguns nutrientes, através da fixação de N₂ ou até mesmo pela solubilização de P (SOTTERO *et al.*, 2006). Indiretamente, através da competição por nutrientes com um determinado patógeno, produção de sideróforos e antibióticos, resistência induzida a doenças (SOTTERO *et al.*, 2006)

Rizobactérias promotoras do crescimento, podem ser uma alternativa para o manejo de vários tipos de patógenos, muitos habitantes do solo, que são considerados de difícil controle. As rizobactérias são conhecidas, não só por atuarem na promoção de crescimento de plantas, mas também, pela diminuição da quantidade de doenças em várias culturas. Quando se fala em controle de doenças, o mesmo pode ocorrer por meio de competição por espaço, nutrientes e nicho ecológico ou pela produção de substâncias que podem causar o controle de patógenos (como algumas enzimas, Lipases e Quitinases, por exemplo) ou até mesmo levando a um processo de indução de resistência sistêmica (IRS) (ROCHA; MOURA, 2013).

Um dos gêneros mais conhecidos é o *Bacillus*, o mesmo é apontado como um dos grupos mais eficientes quando se fala na solubilização de fosfato, dessa forma o mesmo é capaz de produzir alguns fitormônios, e esses mecanismos em conjunto, resultam em um efeito significativo na produção de várias culturas (RODRIGUES, 2019).

3 MATERIAL E MÉTODOS

O referente trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Santa Catarina, localizada no município de Curitibanos, e utiliza dos seguintes métodos:

3.1 ISOLAMENTO E ESTOCAGEM DAS BACTÉRIAS DE MACIEIRA

O primeiro passo foi fazer o isolamento de bactérias. Os isolados foram retirados, por processo de diluição seriada, de solo, folhas e frutos de pomares localizados na cidade de São Joaquim-SC. Depois de isoladas, as bactérias foram purificadas separadamente, repicados em meio LB (Lurian Bertani) sólido, até obtenção de culturas puras. Foram obtidas 23 isolados bacterianos. Depois da purificação, foram estocadas. Essas foram colocadas para crescer em 5mL de meio LB líquido a 26° C. Após 24 horas, 1 mL da suspensão bacteriana, juntamente a 1 mL de glicerol 80%, foram dispostos em crio-tubos que foram estocados a -20 °C. Todos os processos foram realizados em câmara de fluxo laminar.

3.2 ESTOCAGEM DOS FUNGOS *Neonectria ditissima* e *Fusarium* spp.

O material contendo os fungos foi enviado pelo pesquisador Felipe Augusto Moretti Ferreira Pinto da Epagri do município de São Joaquim. Das placas de Petri com os fungos *Neonectria ditissima* (relacionado a doença conhecida como Cancro Europeu) e *Fusarium* sp (causador da doença conhecida como Podridão Carpelar), foram repicadas alíquotas em novas placas de Petri contendo meio BDA (Batata, Dextrose, Ágar), e posteriormente, meio Sabouraud. Após a purificação, os fungos foram estocados.

3.3 TESTE GRAM

Para se iniciar a caracterização, quanto ao tipo de parede celular e o formato das células das 23 bactérias isoladas, foi realizado o Teste Gram. Em 5 mL de meio LB líquido, as 23 bactérias foram repicadas e colocadas a 26 ° C, por um período entre 24-48 horas, dependendo da bactéria. Após esse período, com o auxílio de uma alça de platina, realizou-se o processo de “esfregaço”, em que a alça é mergulhada na suspensão bacteriana e “esfregada” sobre uma lâmina. Após a realização desse processo de coloração de Gram, onde os isolados foram expostos primeiramente por 90 minutos ao Cristal Violeta, 90 minutos ao Lugol, 30 segundos

ao Álcool e 90 minutos ao composto Fuccina. (MADIGAM *et al.*, 2003). Após, as lâmina foram levadas até o microscópio e foi observado a coloração das células, onde os isolados bacterianos com coloração vermelha são caracterizados como gram negativas e os isolados com coloração azul/rocha são caracterizados como gram positivos. E também foi possível observar o formato cada um dos 23 isolados.

3.4 TESTE DE ANTAGONISMO *in vitro* DOS ISOLADOS BACTERIANOS

Esse teste foi realizado no laboratório de microbiologia da UFSC, campus Curitibanos. De placas de BDA (Batata, Dextrose, Ágar) contendo os fungos, *Neonectria ditíssima* e *Fusarium* spp foram retirados discos de micélios de 1 mm que foram introduzidos ao centro de outras placas contendo meio BDA. Essas foram incubados em BOD, a temperatura de 18° C.

Após 48 horas, foi realizada a repicagem de cada um dos fungos, inserindo um disco de 1 mm da colônia fúngica, no centro de novas placas contendo BDA. Concomitantemente, os 23 isolados bacterianos, foram repicados, individualmente, em tubos contendo 5 mL de meio LB (Luria Bertani) líquido (pH 7,0), por 48 horas em 27 °C. Após esse período, foram adicionadas de 50 µL da suspensão de cada um dos 23 bactérias em pontos equidistantes das placas contendo os crescimentos fúngicos, como demonstrado na figura 3 (PEREIRA, 2021).

Figura 3: Realização do teste antagônico *in vitro*



Fonte: O Autor, 2022.

As avaliações foram realizadas a partir do terceiro dia após a inoculação das bactérias, com intervalo de três dias entre cada avaliação, totalizando nove dias. Nessa etapa, foi realizada a análise qualitativa, observando-se a presença/ausência de halos de inibição ao crescimento

fúngico. As bactérias que apresentaram halo de inibição foram selecionadas para análise quantitativa.

Na análise quantitativa foram feitas as medidas, utilizando-se uma régua milimetrada, para o cálculo do grau de inibição (GI), conforme Rodrigues (2019):

$$GI = \{[(D_{tf} - D_{cf}) / D_{tf}] / H_i\}$$

- **GI = Grau de Inibição;**
- D_{tf} = Diferença entre o tamanho do fungo na placa sem a presença do controle (bactéria);
- D_{cf}=Diferença entre o tamanho do fungo na placa com a presença do controle (bactéria);
- H_i = Halo de Inibição, descontando o tamanho da colônia bacteriana.

3.5 AVALIAÇÃO DE MECANISMOS DE EFEITO INDIRETO NO CRESCIMENTO DE PLANTAS

3.5.1 Produção de Sideróforos

Para a identificação da produção de sideróforos, foi utilizado o meio “blue ágar”. O primeiro passo foi a preparação da solução CAS (Cromo Azurol S), em que 60,5 mg de CAS foram dissolvidos em 50 mL de água destilada e misturada com 10 mL da solução Ferro III. Durante a agitação dessa solução, foi adicionado lentamente 72,9 mg de HDTMA (Brometo de Cetrimônio), que foi, previamente, dissolvido em 40 mL de água destilada. A mistura azulada foi autoclavada.

A preparação da solução de ferro utilizada no meio, foi realizada da seguinte forma: 27 mg de FeCl₃6H₂O foi dissolvido em uma mistura já fria de 83,5 µL de HCl e 50 mL de água destilada. Depois essa mistura foi completada a 100 mL de água.

Foi preparado Meio Mínimo (MM). Após a realização destes processos foi misturado 750 mL de água destilada, 100 mL do MM, 30,24 g de Pipes, volume de solução de NaOH, para elevar o pH a 6,8 e 15 a 18 g de ágar. Essa mistura passou por autoclavagem.

Após o resfriamento foi adicionado 30 mL da solução casaminoácidos, previamente esterilizada por filtração em membrana 0,2 µm. Foi feito a mistura da solução corante, agitado levemente, sem formar espuma até chegar a um volume de 1 L. Esse meio foi distribuído em placas de Petri autoclavadas.

As 23 bactérias foram previamente repicadas em meio LB líquido, e deixadas para crescer por 24 até 48 horas, dependendo do crescimento de cada bactéria, a 26°C. Após esse período, com o auxílio de uma pipeta automática, 50 µL de cada suspensão bacteriana foi adicionada a placa contendo o meio “blue ágar”. Cada placa continha quatro bactérias distribuídas em pontos equidistantes da mesma. Foram feitas quatro repetições de cada placa, posteriormente essas placas foram levadas para a estufa, 26°C pelo período de 24 até 48 horas. A percepção da produção de sideróforos se dá, pela presença de um hálo amarelado ao redor da bactéria (SCHWYN, NEILANDS, 1987).

3.5.2 Produção de enzimas extracelulares

3.4.2.1 Lipases

Em um primeiro momento, os 23 isolados foram colocados para crescer em 5 mL de meio LB líquido, por 24 até 48 horas temperatura de 26 °C. Em seguida, com o auxílio de uma pipeta automática, 50 µL da suspensão bacteriana foi transferida para quatro pontos equidistantes da placa contendo meio mínimo (MM) (COVE, 1966), acrescidos 0,001% de Rodamina B com 1% de azeite de oliva. Cada placa recebeu quatro isolados em pontos equidistantes. Cada conjunto de isolados possuía quatro repetições. A detecção da atividade enzimática foi determinada pela presença de pontos fluorescentes em torno ou sobre a colônia bacteriana, quando submetidas a uma lâmpada ultravioleta (365 nm). Os ácidos graxos produzidos pela hidrólise de lipídeos, ao reagir com a Rodamina B, formam um composto fluorescente (RODRIGUES, 2019).

3.4.2.2 Quitinase

Para a avaliação de produção desta enzima, foi utilizada uma metodologia similar a da produção de Lipases, no entanto, foi adicionado ao MM (COVE, 1966), 0,8% de quitina coloidal e 0,078% de NH₄NO₃. A atividade das enzimas extracelulares foi observada através da presença de um halo transparente em volta da colônia bacteriana formada na placa (RODRIGUES, 2019).

3.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os testes que foram realizados neste trabalho, foram avaliados em delineamento inteiramente casualizado (DIC), em que foram realizadas cinco repetições. Os dados foram submetidos à ANOVA, teste F, em nível de 5% de significância, e quando significativo, submetidos ao teste de médias Scott-Knott, através do programa Sisvar versão 5.6.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS DOS ISOLADOS BACTERIANOS

Após o isolamento e purificação se obteve um total de 23 isolados bacterianos. O isolado M8 foi o que obteve maior diferença em relação aos demais, tendo sua coloração voltada para o laranja. As demais bactérias tiveram coloração voltado para o branco. As colônias tiveram um formato bem delimitadas, e arredondadas. Contudo, foi observado que a bactéria M5 teve um formato mais irregular. Com relação ao tempo de crescimento das bactérias, observou-se que os isolados M1, M2, M3, M11 e M23, cresceram em 48 horas, enquanto os demais cresceram em 24 horas.

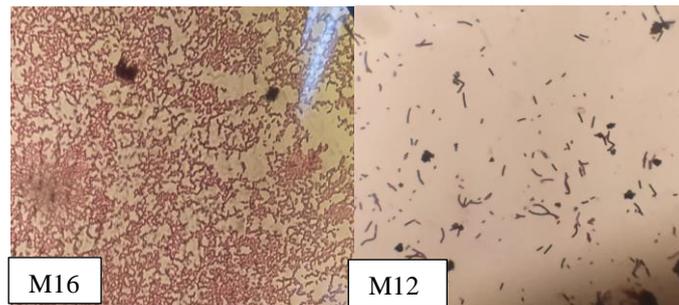
Tabela 1: Características fenotípicas dos isolados bacterianos

Isolados	Gram	Formato
M1	-	bastonete
M2	+	bastonete (alongado)
M3	+	bastonete (alongado)
M4	-	bastonete
M5	-	bastonete
M6	-	bastonete
M7	-	bastonete
M8	+	bastonete
M9	+	bastonete (alongado)
M10	+	bastonete (alongada)
M11	+	bastonete (alongado)
M12	+	bastonete (pequeno)
M13	+	bastonete (alongado)
M14	-	bastonete
M15	-	bastonete
M16	-	bastonete (pequeno)
M17	-	bastonete
M18	-	bastonete (pequeno)
M19	-	bastonete (pequeno)
M20	+	bastonete (alongado)
M21	+	bastonete
M22	-	bastonete (pequeno)
M23	-	bastonete

Fonte: O Autor, 2022.

Com relação ao resultado do teste de Gram, é possível observar que dos 23 isolados bacterianos, dez são Gram-positivos (43%). Com relação ao formato, todos os isolados bacterianos têm o mesmo formato de bastonete, tendo somente a diferença de tamanho entre esses como demonstrado na tabela 1. A figura 3 demonstra alguns dos exemplos de cada grupo.

Figura 3: Teste de Gram dos isolados bacterianos.



Fonte: O Autor, 2022.

Esse teste é o início para a identificação, pois para o processo ser completo é necessária uma série de análises, incluindo o sequenciamento de genes como 16SRNAr, para poder identificar, pelo menos, em nível de gênero, caso seja uma bactéria conhecida.

4.2 MECANISMOS DE PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE EFEITO INDIRETO

4.2.1 Produção de Sideróforos

Com relação a produção de sideróforos, após a realização das transferências das bactérias para o meio, após o período de 24 horas, foi possível observar que dos 23 isolados bacterianos, 13 desses foram capazes de produzir essas substâncias, e capturar o ferro presente no meio, como mostrado na figura 4, ou seja, 56% das bactérias mostraram resultados positivos. Os isolados que apresentaram resultado positivo foram: M4, M5, M6, M7, M11, M14, M15, M16, M17, M19, M20, M21, M22 e M23. A produção de sideróforos também pode estar relacionada à ação indireta de estímulo ao crescimento vegetal, através da indisponibilidade de Fe para o crescimento de fitopatógenos e dessa forma, o patógeno não encontra condições para se desenvolver, pela falta desse nutriente (VOLPIANO, 2017).

Figura 4: Produção de Sideróforos por isolados bacterianos



Fonte: O Autor, 2022

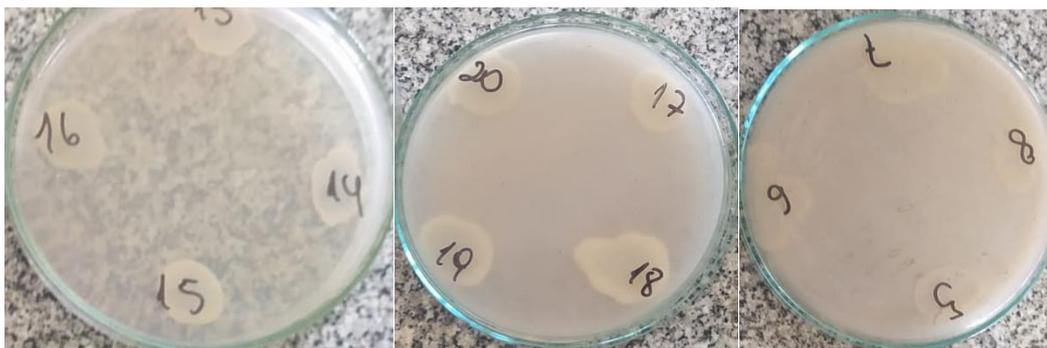
Tian *et al.* (2009) observaram que foram isoladas 354 bactérias da rizosfera da cultura do tabaco e cerca de 85% dessas foram produtoras desse composto. Quando se compara os resultados, observou-se que um número significativo de bactérias produtoras de sideróforos pode ser encontrado em diferentes culturas. Volpiano (2017) observou em seu trabalho com *Rhizobium* spp, no controle de *Sclerotium (Athelia) rolfsii* no feijoeiro, que dos isolados bacterianos, quatro daqueles foram capazes de produzir esse composto, dentre esses, foi observado que uma das estirpes estudada, está relacionada com o controle do fungo, através da capacidade inibidora do crescimento do micélio do fungo.

4.2.2 Produção de enzimas extracelulares

4.1.2.1 Quitinase

Os resultados para a produção de quitinase foram negativos para os 23 isolados bacterianos. Esses cresceram no meio, mas não foi observada a formação de halo transparente ao volta da bactérias, que significa produção dessa enzima. Alguns trabalhos da literatura já demonstraram esse resultado, como no trabalho de Rodrigues (2019), em que os testes com *Bacillus* spp., também demonstraram negativos para a produção desta enzima. Entretanto, todos os isolados cresceram no meio como observado na figura 5, sugerindo ajustes na metodologia

Figura 5: Teste de produção de quitinase



Fonte: O Autor, 2022

Apesar dos resultados não mostrarem a produção dessa enzima não se pode descartar a importância da mesma para o controle biológico de pragas e doenças. Segundo o relato de

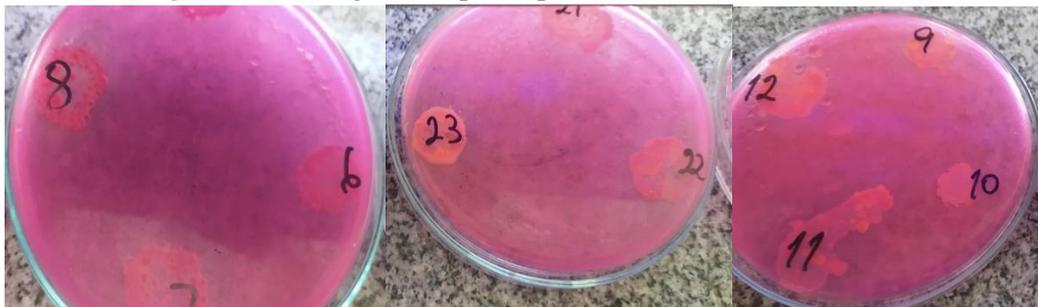
Rodrigues (2019), que realizou esse mesmo teste, a enzima, quando produzida por isolados bacterianos, pode ser usada na seleção de agentes do controle de fungos.

Os fungos filamentosos, em geral, possuem parede celular composta, principalmente, de quitina associada a proteínas e outros carboidratos. A enzima quitinase atua sobre esse composto, degradando-a e assim causando a lise celular. A produção desse composto demonstra as habilidades que algumas bactérias tem em parasitar fungos e degradar hifas e esporos (ZUCCHI, DE MELO, 2009)

4.1.2.1 Lipases

A maioria das bactérias isoladas de macieira foram capazes de produzir essas enzimas, como demonstrado na figura 6. Em seu trabalho Oliveira (2022) demonstrou que das seis rizobactérias estudadas por ele, quatro dessas foram capazes de produzir esse composto, e que, uma teve efeito inibitório no fungo *Fusarium* spp.

Figura 6: Produção de lipases por isolados bacterianos de macieira



Fonte: O Autor, 2022

As bactérias que obtiveram resultados positivos apresentaram pontos luminescentes, quando expostas a luz UV (Ultra Violeta). Dentre as 23 bactérias isoladas, 16 dessas foram capazes de produzir a enzima, ou seja, 69%. Em alguns casos, essas enzimas são relacionadas ao controle de fitopatógenos, como fungos, pois podem ser capazes de degradar os lipídeos da parede celular desses microrganismos. Os autores Rocha e Moura (2013) observaram em seu trabalho com rizobactérias, que das bactérias testadas no controle de *Fusarium* spp., a maioria testada apresentou a produção da enzima.

Segundo Rodrigues (2019) ainda existe um escasso número de trabalhos sobre a utilização de lipases produzidas por bactérias, no controle de pragas e doenças de plantas. Porém, já se sabe que o uso de fungos e bactérias com capacidade de produzir extracelularmente lipases é crescente, uma vez que essas enzimas apresentam a capacidade de romper a cutícula

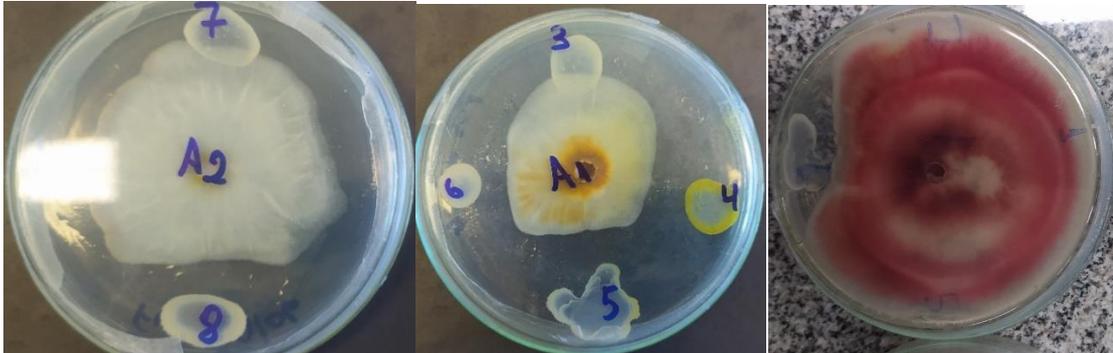
do seu hospedeiro (ERTHAL JUNIOR, 2011). Da mesma forma, essas enzimas produzidas por bactérias podem atuar sobre um fungo fitopatogênico, degradando, assim, a parede celular (MORA, CASTILO, FRAGA, 2016).

4.3 AVALIAÇÃO DE ANTAGONISMO *in vitro* DE ISOLADOS BACTERIANOS

4.3.1 Inibição ao *Fusarium* spp

O teste qualitativo de antibiose mostrou que das 23 bactérias testadas, nove possuíram a capacidade de inibir o crescimento do fungo *Fusarium* spp (Figura 7), sendo essas: M4, M5, M6, M8, M9, M12, M15, M 21 e M232.

Figura 7: Inibição ao fungo *Fusarium* spp pelos isolados bacterianos



Fonte: O Autor, 2022.

No teste quantitativo das nove bactérias que apresentaram halo de inibição ao crescimento do fungo, seis isolados inibiram entre 27 a 42% e as demais foram capazes de inibir até 60% do desenvolvimento do fungo (Tabela 2). Observou-se que o isolado que obteve a maior Grau de Inibição, foi M9, com 60,66% de inibição do crescimento do fungo.

Tabela 2: Comparação entre os testes de produção de Sideróforos e Lipases, e antibiose ao fungo *Fusarium* spp

Isolados bacterianos	GI%	Produção de Lipases	Produção de Sideróforos
M1	0,00 c	-	-
M2	0,00 c	-	-
M3	0,00 c	-	-
M4	0,00 c	+	+
M5	31,61 b**	-	+
M6	27,32 b**	-	+
M7	41,83 b**	+	+
M8	0,00 c	+	-
M9	53,82 a*	+	-
M10	60,66 a*	-	-
M11	0,00 c	+	-
M12	0,00 c	+	+
M13	58,99 a*	+	-
M14	0,00 c	+	+
M15	0,00 c	+	+
M16	46,03 b**	-	+
M17	0,00 c	+	+
M18	0,00 c	+	-
M19	0,00 c	+	+
M20	0,00 c	+	+
M21	0,00 c	+	+
M22	43,42 b**	+	+
M23	0,00 c	+	+

Fonte: O Autor, 2022.

Nota:** Inibição de 20 a 50 %. *Inibição acima de 50 %. GI = Grau de Inibição. Valores seguidos de letras iguais na coluna não se diferem estatisticamente

Quando comparado o resultado deste teste, com o teste de produção de sideróforos, pode-se observar que dos nove isolados bacterianos que mostraram potencial de inibir o fungo, sete tiveram resultado positivo na produção dessa substância. Essa pode ter sido uma das formas de controle ao fungo. Além disso, quando se observa os testes de Lipases, também pode-se observar que das bactérias que apresentaram resultados positivos, sete dessas também tiveram a capacidade de inibir o fungo, como demonstrado na tabela 2.

Durante a realização dos testes, observou-se que houve mudança de coloração do fungo, quando foi alterada sua temperatura de crescimento. Observou-se que o fungo, quando submetido à temperatura de 18°C, a coloração era branca, e na temperatura anterior de 23°C, era rosada. A temperatura foi alterada, pois foi observado que o fungo se desenvolvia mais rapidamente em temperatura inferior. Em alguns testes, o isolado M4, um inibidor do patógeno,

demonstrou uma coloração amarelada que pode ser observada também no fungo. Isso se pode estar relacionado a substâncias produzidas pelo isolado, que não foi possível detectar através dos testes realizados.

Lisboa (2020) relatou em seu trabalho com rizobactérias isoladas no Cerrado brasileiro, que das cento e doze rizobactérias avaliadas, 88,4 % foram capazes de mostrar, pelo menos, algum tipo de atividades enzimáticas, evidenciando a utilidade dessas, como forma de controle biológico de doenças, do mesmo modo que no presente estudo. Um dos isolados foi, identificado como *Burkholderia teritorii*, apresentou antibiose.

Melo e Valarini (1995) testaram o potencial de inibição do fungo *Fusarium solani*, através de isolados bacterianos oriundos da rizosfera da cultura do pepino. Os autores observaram que mesmo em culturas diferentes, o isolamento de bactérias que coexistem com plantas, se torna uma forma eficaz de controlar várias doenças.

4.3.2 Inibição de *Neonectria ditissima*

Foi realizado o teste de inibição de *Neonectria ditissima* (agente causador da doença do Cancro Europeu) pelos isolados *in vitro*. O estudo desse fungo se torna importante, pelo fato de que pouco se conhece de suas características e o método de controle é ineficiente. Os produtos químicos não conseguem efetuar controle de forma eficiente.

Esse fungo é bastante novo no Brasil, mas tem se tornado um problema relevante para a produção de maçã no país (ALVES; NUNES; MENDES, 2014), justificando a busca por controles alternativos e eficientes.

Os resultados dos testes de antibiose mostraram que dos 23 isolados bacterianos, sete foram capazes de controlar o fungo, nos testes qualitativo, em que se observou a formação de halo de inibição. Observou-se que 30% das bactérias isoladas foram capazes de controlar o desenvolvimento do patógeno, como demonstrado na tabela 3. Na quantificação da inibição, os isolados M5, M6, M11, M12, M14, M17 e M23 foram capazes de inibir o crescimento do fungo após 10 dias de crescimento e a que o isolado M5 obteve o maior Grau de Inibição, em comparação com os demais, com 66,01% de inibição ao desenvolvimento do fungo *in vitro*.

Tabela 3: Produção de Sideróforos e Lipases e antibiose ao fungo *Neonectria ditissima* pelos isolados

Isolados bacterianos	GI%	Produção de Lipases	Produção de Sideróforos
M1	0,00c	-	-
M2	0,00c	-	-
M3	0,00c	-	-
M4	0,00c	+	+
M5	66,01a*	-	+
M6	44,99b**	-	+
M7	0,00c	+	+
M8	0,00c	+	-
M9	0,00c	+	-
M10	0,00c	-	-
M11	55,53a*	+	-
M12	56,65a*	+	+
M13	0,00	+	-
M14	56,65a*	+	+
M15	0,00c	+	+
M16	0,00c	-	+
M17	57,42a*	+	+
M18	0,00c	+	-
M19	0,00c	+	+
M20	0,00c	+	+
M21	0,00c	+	+
M22	0,00c	+	+
M23	32,35b**	+	+

Fonte: O Autor, 2022.

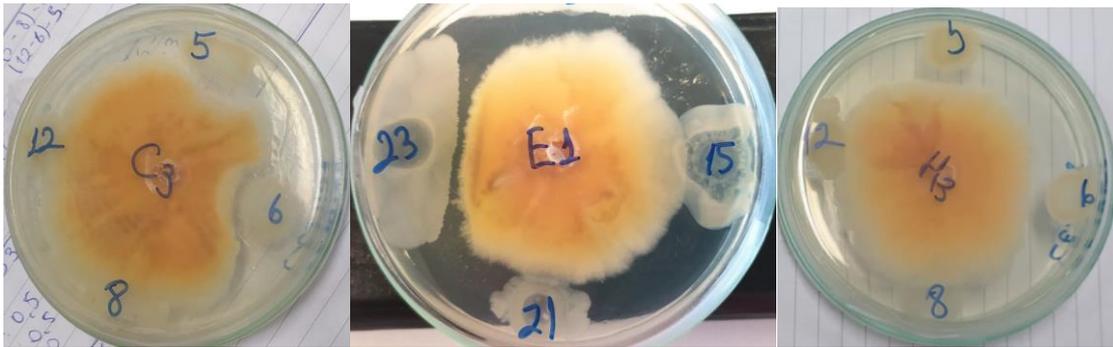
Nota:** Inibição de 30 a 45 %. *Inibição acima de 45 %. GI = Grau de Inibição.

Valores seguidos de letras iguais na coluna não se diferem estatisticamente

O crescimento desse fungo foi um pouco mais lento, quando comparado com *Fusarium*. Neste caso, os dois fungos cresceram a mesma temperatura de 18 °C.

As bactérias controlaram de forma eficaz o desenvolvimento desse fungo, como se pode observar na figura 8. Não foi observado nenhuma mudança na coloração do fungo, como relatado no teste de *Fusarium* com a bactéria M4. Esse isolado não inibiu o crescimento de *N. ditissima*.

Figura 8: Capacidade de inibição do fungo *Neonectria ditissima*



Fonte: O Autor, 2022.

Quando comparado com os demais testes efetuados, pode-se observar que dos isolados testados que foram efetivos no controle do fungo, oito foram positivos para produção de sideróforos e sete para a produção de lipases. Pode-se observar ainda que o isolado M23 teve um significativo resultado para o controle do fungo, além de resultado positivo para produção de lipases e sideróforos.

Costa (2010) relatou em seu trabalho com bactérias endofíticas de folhas de feijoeiro comum que observou quarenta e nove isolados que apresentaram um nível de antagonismo contra os patógenos. Ele relatou ainda que análise de enzimas e da produção de sideróforos dos isolados que tiveram um efeito antagonico, mostrou que sete foram produtores de sideróforos. Com relação ao restante dos isolados, com atividade de antagonismo, apresentaram resultados negativos para a produção dos compostos.

5 CONCLUSÃO

Como promotores de crescimento de efeito indireto, destacou-se os isolados M4, M5, M6, M8, M9, M12, M15, M21 e M23, que foram eficientes no controle do fungo *Fusarium* spp, podendo ainda ser destacado o isolado M9, com GI de 60,66%. Nesse mesmo contexto, observou-se que o efeito dos isolados M5, M6, M11, M12, M14, M17 e M23 foram responsáveis pela inibição do fungo *Neovectria ditissima in vitro* e o isolado M5 se destacou dos demais, com um GI de 66,01%. Destacou-se ainda os isolados M5, M6, M12 e M23 que foram responsáveis pelo controle de ambos fungos.

Com relação à produção de lipase, 16 isolados foram capazes de produzir essa enzima. Observou-se que os isolados produtores de lipases M4, M8, M9, M12, M15, M21 e M23 inibiram o fungo *Fusarium* spp. e M11, M12, M14, M17 e M23 controlaram o crescimento de *Neovectria ditissima*. Com relação à produção de sideróforos, observou-se que 13 isolados foram capazes de produzir esse composto. Dentre esses, os isolados M4, M5, M6, M12, M15, M21 e M23 foram capazes de inibir o fungo *Fusarium* spp., enquanto M5, M6, M12, M17 e M23 controlaram o fungo *Neovectria ditissima*. Destacou-se o isolado M23 que além de controlar os dois fungos, foi capaz de produzir sideróforos e lipases. Esses dados são promissores aos estudos dos métodos de biológicos de controle aos fungos testados, sendo necessário aprofundar estudos sobre os mecanismos dos isolados e seus efeitos sobre esses e outros fungos fitopatogênicos, além de seu efeito *in vivo*

REFERÊNCIAS

- AGRO LINK. **Controle biológico melhoram a qualidade da maçã em SC.** 2007. DIÁRIO CATARINENSE. Disponível em: https://www.agrolink.com.br/noticias/controles-biologicosmelhoram-qualidade-da-maca-em-sc_53425.html. Acesso em: 20 maio 2022.
- ALVES, Silvio André Meirelles; NUNES, Claudia Cardoso; MENDES, Rodolfo. Cancro europeu das pomáceas. In: AGAPOMI, 245., 2014, [S.L]. **Proceedings [...]**. [S.L]: Sândalo, 2014. p. 10-11.
- ALVES, Silvio André Meirelles; NUNES, Claudia Cardoso. AVANÇOS NO MANEJO DO CANCRO EUROPEU EM MACIEIRA. In: ENFRUTE, 16., 2019, Fraiburgo-Sc. **Trabalho apresentado em congresso.** [S.I]: Embrapa Uva e Vinho, 2019. p. 43-47. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/1114536/1/XVIEnfruteMeirelles20194347.pdf>. Acesso em: 18 maio 2022.
- AMARAL, Mayan Blanc et al. Produção de sideróforos em estirpes bacterianas isoladas de *Paspalum* sp. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE AGROECOLOGIA, 11., 2020, São Cristóvão, Sergipe. **Trabalho apresentado em congresso.** São Cristóvão, Sergipe: Cadernos de Agroecologia, 2020. v. 15, p. 1-4. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/1126789/1/Producao-de-sideroforos-em-estirpes-bacterianas-isoladas-de-Paspalum.pdf>. Acesso em: 25 nov. 2022.
- ARAUJO, Fabio Fernando et al. de Bioprospecção de rizobactérias promotoras de crescimento em *Brachiaria brizantha*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, [s. l], v. 41, n. 3, p. 521-527, 09 set. 2011. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbz/a/nVQrb6VggBk7yct3hgHhggx/?lang=pt&format=pdf>. Acesso em: 21 out. 2021.
- ARAUJO, Leonardo *et al.* **Doenças da macieira e da pereira.** Belo Horizonte: Epagri, 2016. 14 p. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Mateus-Pasa/publication/309414271_Doencas_da_macieira_e_da_pereira/links/580f51f308aee15d4911e7d6/Doencas-da-macieira-e-da-pereira.pdf. Acesso em: 20 maio 2022.
- ARAUJO, Leonardo et al. Sistema de alerta e previsões para o controle das doenças da macieira no estado de Santa Catarina. **Agropecuária Catarinense**, [S.L.], v. 32, n. 1, p. 86-91, 2019. Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina. <http://dx.doi.org/10.22491/rac.2019.v32n1.12>.
- ATLASBIG. **Principais países produtores de maçã.** 2020. Disponível em: <https://www.atlasbig.com/pt-br/paises-por-producao-demaca#:~:text=Em%20todo%20o%20mundo%20s%C3%A3o,323%20toneladas%20de%20produ%C3%A7%C3%A3o%20anual..> Acesso em: 20 maio 2020.
- BERNARDES, Tatiely Gomes. **Use of growth regulators and biological control of fungi in the common bean cultivated in succession to different cover crops.** 2008. 63 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2008.

BUYSENS, S et al. Involvement of Pyochelin and Pyoverdine in Suppression of Pythium-Induced Damping-Off of Tomato by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2. **Applied And Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 62, n. 3, p. 865-871, mar. 1996. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.62.3.865-871.1996>.

BLEICHER, Jorge et al. Doenças da Macieira. In: DOCUMENTAÇÃO-DID/EMPASC, Departamento de Informação. **Manual da Cultura da Macieira**. Florianópolis: EMPASC, Cap. 16. p. 380-442, 1986.

BRAGA, Hugo José; J, Vamilson Prudêncio da Silva; PANDOLFO, Cristina; PEREIRA, Emanuela Salum. **Zoneamento de riscos climáticos da cultura da maçã no estado de Santa Catarina**. **Revista Brasileira de Agrometeorologia**, Passo Fundo, v. 9, n. 3, p. 439-445, 15 ago. 2001. Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/pesquisa/agromet/pdf/revista/cap7.pdf>. Acesso em: 09 maio 2022.

BRUISSON, Sébastien. et al.; **Endophytes and Epiphytes From the Grapevine Leaf Microbiome as Potential Biocontrol Agents Against Phytopathogens**. Department of Biology, University of Fribourg, Fribourg, Switzerland, 2019 Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.02726/full>. Acesso em: 05 novembro de 2021.

CAMPOS, Jonatas da Silva. **Características Morfo-Fisiológicas de *Neonectria Ditissima* e Controle Químico de Cancro Europeu em Macieira**. 2015. 110 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Produção Vegetal, Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2015.

CANAL AGRO.; **Maçã: Santa Catarina espera colher 550 mil toneladas na safra 20/21**. 2021 Disponível em: <https://summitagro.estadao.com.br/noticias-do-campo/maca-santacatarina-espera-colher-550-mil-toneladas-na-safra-20-21/>. Acesso em: 05 de outubro de 2021.

COSTA, Leonardo Emanuel de Oliveira. **DIVERSIDADE GENÉTICA, ANTAGONISMO MICROBIANO E PRODUÇÃO DE FITASES POR BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DE FOLHAS DE FEIJOEIRO COMUM (*Phaseolus vulgaris*)**. 2010. 110 f. Tese (Doutorado) - Curso de Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2010.

COVE, D. J. The induction and repression of nitrate reductase in the fungus *Aspergillus nidulans*. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 113, p. 51-56, 1966.

CHAVERRI, P. et al. Delimitation of *Neonectria* and *Cylindrocarpon* (Nectriaceae, Hypocreales, Ascomycota) and related genera with *Cylindrocarpon*-like anamorphs. **Studies In Mycology**, [S.L.], v. 68, p. 57-78, mar. 2011. Westerdijk Fungal Biodiversity Institute. <http://dx.doi.org/10.3114/sim.2011.68.03>.

OLIVEIRA, Thiago Alves Santos de et al. Biocontrole de doenças pós-colheita de frutas. 2015. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Zayda-Moreira-2/publication/283505400_Biocontrole_de_doencas_pos-colheita_de_frutas/links/563bd75608ae45b5d2869f17/Biocontrole-de-doencas-pos-colheita-de-frutas.pdf. Acesso em : 18 de outubro 2022.

ERTHAL JUNIOR, Milton. **Controle biológico de insetos pragas**. Seminário Mosaico Ambiental: Olhares sobre o Ambiente, Campos dos Goytacazes, 2011. Disponível em <<http://www.essentiaeditora.iff.edu.br/index.php/sMosaicoAmbiental/article/download/2180/1243>> Acesso em 01 novembro 2022

KRETZSCHMAR, Aike Anneliese et al. EFEITO DE FITORREGULADORES SOBRE A INCIDÊNCIA DE PODRIDÃO CARPELAR EM MAÇÃS “FUJI”. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - Sp, v. 29, n. 3, p. 414-418, dez. 2009.

LISBOA, Paulo Henrique Gomes. **CARACTERIZAÇÃO DE RIZOBACTÉRIAS ASSOCIADAS À *Solanum lycocarpum* St. Hil. QUANTO AO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO PARA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL, ENZIMAS E AGENTES ANTIMICROBIANOS**. 2020. 82 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia, Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2020.

MADIGAM, Michael T. et al. **Microbiologia de Brock**. 10. ed. São Paulo: Prentice Hall, 2003.

MELO, I S. de; VALARINI, P. J.. Potencial de rizobactérias no controle de *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. em pepino (*Cucumis sativum* L.). **Scientia Agricola**, [S.L.], v. 52, n. 2, p. 326-330, ago. 1995. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-90161995000200020>.

MELO, Itamar Soares de. **Rizobactérias**. Agência Embrapa de Informações Tecnológicas-Embrapa. Disponível em: https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agricultura_e_meio_ambiente/arvore/CONTA_G01_53_210200792814.html. Acesso em: 15 out. 2021.

MONDINO, Pedro *et al.* **Manual de indentificación de enfermedades de manzana en poscsecha**. Montevideo-Uruguai: Cytel, 2009. 67 p.

MORANDI, Marcelo Augusto Boechat; BETTIOL, Wagner. Controle Biológico de Doenças de Plantas no Brasil. In: AMBIENTE, Embrapa Meio (ed.). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa, 2009. Cap. 1. p. 8-14.

MOREIRA, Rafaela Regina. **Bacillus spp. E Pseudomonas spp. no biocontrole de *Colletotrichum* do grupo *Cutatum*, causador da mancha foliar de glomerella em macieira**. 2013. 108 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Agronomia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

MORA, Margy A. Esparza.; CASTILHO, Almiro. M. Conteiro.; FRAGA, Marcelo. E. Fungos entomopatogênicos: enzimas, toxinas e fatores que afetam a diversidade. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**. v.18, n.3, p. 335-349, 2016. Disponível em <<http://www.deag.ufcg.edu.br/rbpa/rev183/rev18312.pdf>> Acesso em 01 de novembro de 2022

OLIVEIRA, João Ricardo Gonçalves de. **Estabelecimento de Plantas Ornamentais Tropicais Micropropagadas: Estudando a Viabilidade de Aplicação de Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMA) e/ou Rizobactérias Promotoras de Crescimento (RPCP)**. 2009. 86 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Biologia dos Fungos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2009. Disponível em: <https://attena.ufpe.br/bitstream/123456789/401/2/jrgo.pdf>. Acesso em: 21 out. 2021.

PAGNO, Roberta Soldatelli. **Avaliação do potencial antagônico de isolados de *Bacillus spp.* no controle de fungos fitopatogênicos, causadores de podridões no período pós-colheita da maçã**. 2009. 104 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2009.

PEREIRA, Alice Rafaela. **Controle biológico de *Sclerotium cepivorum* mediado por *Bacillus spp.* na cultura do Alho (*Allium sativum*)**. 2021. 47 f. TCC (Graduação) - Curso de Agronomia, Universidade Federal de Santa Catarina, Curitibanos, 2021. Disponível em: https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/228338/TCC_ALICEPEREIRA.pdf?sequence=1&isAllowed=y. Acesso em: 15 out. 2021.

PETRI, José Luiz *et al.* Avanços na cultura da macieira no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, [S.L.], v. 33, n. 1, p. 48-56, out. 2011. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s010029452011000500007>.

PICOLOTTO, Luciano. **Fruticultura 1: cultura da macieira**. Curitibanos: Universidade Federal de Santa Catarina, 2021. 18 slides, color.

PIERO, Robson M. ; TAGLIARI, Paulo; SAA, Cesar F.. Situação e desafios do cultivo de maçã orgânica. In: STANDNIK, Marciel J. (ed.). **Manejo Integrado de Doenças da Macieira**. Florianópolis – Sc: Cca-Ufsc, 2009. Cap. 10. p. 175-190.

RATZ, Raquel Jacheline *et al.* Potencial biotecnológico de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas no cultivo de milho e soja. **Engevista**, [S.I.], v. 19, n. 4, p. 890-905, nov. 2017. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Henan-Michelim-2/publication/326798418_POTENCIAL_BIOTECNOLOGICO_DE_RIZOBACTERIAS_PROMOTORAS_DE_CRESCIMENTO_DE_PLANTAS_NO_CULTIVO_DE_MILHO_E_SOJA/links/5c18e15c4585157ac1cb2bd7/POTENCIAL-BIOTECNOLOGICO-DE-RIZOBACTERIAS-PROMOTORAS-DE-CRESCIMENTO-DE-PLANTAS-NO-CULTIVO-DE-MILHO-E-SOJA.pdf. Acesso em: 21 out. 2021.

ROCHA, Dediel Júnior A.; MOURA, Andréa B.. Controle biológico da murcha do tomateiro causada por *Ralstonia solanacearum* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* por rizobactérias. **Tropical Plant Pathology**, [S.L.], v. 38, n. 5, p. 423-430, out. 2013. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1982-56762013005000025>.

RODRIGUES, Sabrina. **Bacillus spp. como promotores de crescimento e no controle de Sclerotium cepivorum in vitro**. 2019. 40 f. TCC (Graduação) - Curso de Agronomia, Universidade Federal de Santa Catarina, Curitibanos, 2019. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/197814/TCC%20SABRINA%20RODRIGUES%202019.1.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 21 out. 2021.

SOTTERO, Adriana Nanô; FREITAS, Sueli dos Santos; MELO, Arlete Marchi Tavares de; TRANI, Paulo Espíndola. Rizobactérias e alface: colonização rizosférica, promoção de crescimento e controle biológico. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, [S.L.], v. 30, n. 2, p. 225-234, abr. 2006. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-06832006000200004>.

SILVA, Janaiana Catarina da et al. MATURAÇÃO E CONTROLE DE PODRIDÃO CARPELAR EM MAÇÃS 'FUJI' COM FUNGICIDAS E SUBSTÂNCIAS ALTERNATIVAS. **Revista da Jornada da Pós-Graduação e Pesquisa-Congrega**, [S.L.], v. 15, n. 15, p. 1271-1280, out. 2018

SILVEIRA, Fabiane Nunes et al. Relação entre características morfológicas de frutos e incidência de podridão carpelar em clones de macieira 'Gala' e 'Fuji' sobre diferentes porta-enxertos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, [S.L.], v. 35, n. 1, p. 75-85, mar. 2013. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-29452013000100010>.

SCHÄFER, Ezequiel Lena. **Avaliação de microrganismos promotores de crescimento e proteção na cultura soja (Glycine max)**. 2017. 40 f. TCC (Graduação) - Curso de Agronomia, Departamento de Estudos Agrários da Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul - Unijuí, Ijuí, 2017. Disponível em: <https://bibliodigital.unijui.edu.br:8443/xmlui/bitstream/handle/123456789/4537/Ezequiel%20Lena%20Sch%c3%a4fer.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 15 out. 2021.

SEAGRI. **Informativo Técnico**. 2. ed. [S.I]: Sagri, 2010. 13 p. Disponível em: https://web.bndes.gov.br/bib/jspui/bitstream/1408/2534/1/InformativoSEAGRI_n.2,%20nov.2010.pdf. Acesso em: 16 maio 2022.

SILVA, Janaiana Catarina da et al. MATURAÇÃO E CONTROLE DE PODRIDÃO CARPELAR EM MAÇÃS 'FUJI' COM FUNGICIDAS E SUBSTÂNCIAS ALTERNATIVAS. **Revista da Jornada de Pós-Graduação e Pesquisa-Congrega**, [S.I.], v. 15, n. 15, p. 271-280, out. 2018. Disponível em: <http://revista.urcamp.edu.br/index.php/rcjppg/article/view/2903>. Acesso em: 20 maio 2022.

SILVEIRA, Fabiane Nunes et al. **RELAÇÃO ENTRE CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE FRUTOS E INCIDÊNCIA DE PODRIDÃO CARPELAR EM CLONES DE MACIEIRA 'GALA' E 'FUJI' SOBRE DIFERENTES PORTA-**

ENXERTOS. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 35, n. 1, p. 75-85, mar. 2013. Disponível em:
<https://www.scielo.br/j/rbf/a/MHMkfmrg9XrpVc3P8MC6NqM/?format=pdf&lang=pt>.
Acesso em: 21 maio 2022.

SCHWYN, Bernhard; NEILANDS, J. B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. **Analytical biochemistry**, v. 160, n. 1, p. 47-56, 1987.

STANDNIK, Marciel J.; MONDINO, Pedro; BUTIOGNOL, César A.. Bases conceituais da proteção do cultivo da Macieira. In: STANDNIK, Marciel J. (ed.). **Manejo Integrado de Doenças da Macieira**. Florianópolis – Sc: Cca-Ufsc, 2009. Cap. 1. p. 1-20.

TALAMINI, Viviane; BOGO, Amauri. Epidemiologia e sistema de previsão de doenças da macieira. In: STANDNIK, Marciel J. (ed.). **Manejo Integrado de Doenças da Macieira**. Florianópolis – Sc: Cca-Ufsc, 2009. Cap. 2. p. 21-43.

TIAN, Fang et al. GENETIC DIVERSITY OF SIDEROPHORE-PRODUCING BACTERIA OF TOBACCO RHIZOSPHERE. **Brazilian Journal Of Microbiology**. Tai'an, Shandong, People's Republic Of China, p. 276-284. fev. 2009.

VIEIRA JÚNIOR, José Roberto *et al.* **Rizobactérias como agentes de controle biológico e promotores de crescimento de plantas**. 2013. Embrapa. Disponível em:
https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1018841/1/doc155rizobacteria_s.pdf. Acesso em: 21 out. 2021.

VOLPIANO, Camila Gazolla. **Rhizobium spp. para o controle biológico do fungo fitopatogênico Sclerotium (Athelia) rolfsii no feijoeiro (Phaseolus vulgaris L.)**. 2017. 61 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pósgraduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2017.

ZUCCHI, Tiago Domingues; DE MELO, Itamar Soares. **Controle biológico de fungos aflatoxigênicos**. 2009. Disponível em:

<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/579993/1/2009CL03.pdf> Acesso em: 21 out. 2022.