

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

BIOPROSPECÇÃO DE MICRORGANISMOS EPIFÍTICOS DE  
TANGERINEIRAS CV. MONTENEGRINA PARA O MANEJO DA MANCHA  
PRETA DO CITROS CAUSADA POR *Guignardia citricarpa* KIELY

Alexandre Martins Guimarães  
Engenheiro Agrônomo/UFSM

Dissertação apresentada como um dos requisitos  
à obtenção do Grau de Mestre em Fitotecnia  
Área de Concentração Fitossanidade

Porto Alegre (RS), Brasil.  
Abril de 2008.



O sucesso de algumas pessoas depende do êxito de muitas outras...

*Autor desconhecido.*

“... dedico este trabalho a uma pessoa muito especial que está chegando. Fonte de inspiração de minha vida...”

## AGRADECIMENTOS

O desenvolvimento de qualquer trabalho, não importa a sua natureza, sempre necessitará do auxílio de outras pessoas, seja direta ou indiretamente. Na grande maioria dos trabalhos que tive a oportunidade de observar em minha vida, essa “ajuda externa” foi preponderante, e também, responsável por parte do brilhantismo dos bons resultados alcançados. Diante disso, utilizo deste pequeno espaço para agradecer de coração a “ajuda externa” que recebi para realizar o presente trabalho.

Primeiramente, gostaria de manifestar o meu sincero agradecimento a minha família. No período em que realizei este trabalho, assumi uma profunda dívida com minha esposa VANESSA, pelas infindas horas de carinho, companheirismo e muita paciência. Espero ter a oportunidade de poder retribuir cada gesto e cada minuto de atenção gasto por você, TE AMO. A meus pais, espero ter estado à altura de todo o carinho, afeto e atenção desprendida. A meus queridos irmãos agradeço pela constante vigia.

Agradeço também ao Professor Fábio K. Dal Soglio, pela atenção, pela orientação oportuna e principalmente pelo enorme coração que tens, característica cada vez mais rara.

Aproveito também para agradecer a Deus ao patrimônio coletivo que herdei nesse período, os amigos do peito. Principalmente aqueles que participaram intensamente de minhas angústias, curiosidades, vitórias, etc. Em especial, agradeço a amizade de Isabel Cristina Padula Paz e Rita de Cassia Madail Santin. Acredito que ainda haverá muitos e muitos momentos em que iremos desfrutar desta benção.

Agradeço também a todos os participantes do Grupo de Citricultura Ecológica, principalmente aos agricultores que acreditam neste trabalho.

Para finalizar agradeço a todas as instituições públicas que contribuíram para a minha formação. Procurarei retribuir em cada atuação profissional.

# BIOPROSPECÇÃO DE MICRORGANISMOS EPIFÍTICOS DE TANGERINEIRAS CV. MONTENEGRINA PARA O MANEJO DA MANCHA PRETA DO CITROS CAUSADA POR *Guignardia citricarpa* KIELY<sup>1</sup>

Autor: Alexandre Martins Guimarães

Orientador: Fábio Kessler Dal Soglio

## RESUMO

A citricultura representa um importante segmento sócio-econômico para o Estado do Rio Grande do Sul, onde são desenvolvidos sistemas de cultivo de citros com manejo agroecológico, principalmente pela agricultura familiar. O Grupo de Citricultura Ecológica constitui um grupo de pesquisa participativa, que conta com a participação de agricultores, pesquisadores e extensionistas, e tem por objetivos o desenvolvimento da citricultura agroecológica da região dos Vales do Caí e Taquari. O presente trabalho teve por objetivo realizar bioprospecção de microrganismos epifíticos dos citros com potencial para o controle biológico da doença pinta preta dos citros (PPC), e também caracterizar os mecanismos de antagonismo potencialmente envolvidos na interação dos agentes biocontroladores com *G. citricarpa*. Este trabalho foi realizado no Município de Montenegro – RS, em pomares de bergamoteira cv. Montenegrina, conduzidos sob manejo orgânico. A partir de folhas e frutos foram isolados 24 fungos filamentosos e 17 leveduras, caracterizadas em oito tipos morfológicos. Destes, apenas dois isolados de leveduras e quatro de fungos filamentosos apresentaram, *in vitro*, potencial para o biocontrole de *G. citricarpa*, sendo que um dos isolados de fungos filamentosos foi identificado como *Trichoderma koningii*. Não foi possível observar diretamente o micoparasitismo dos isolados epifíticos testados sobre *G. citricarpa*. Todos os isolados antagonistas à *G. citricarpa* apresentaram atividades quitinásica, glucanásica e proteásica. O mecanismo de antibiose foi observado em todos os isolados, seja pela produção de compostos difusíveis ou voláteis inibitórios à *G. citricarpa*. No mecanismo de competição foi observada a produção de sideróforos por todos os isolados de fungos filamentosos. O isolado epifítico de *T. koningii* apresentou, em condições de campo, redução de 18,58 % na incidência e 63,82 % na severidade da PPC.

---

<sup>1</sup> Dissertação de Mestrado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (91p.) Abril, 2008.

# BIOPROSPECTION OF EPIPHYTE MICROORGANISMS OF CV. MONTENEGRINA TANGERINE ORCHARDS FOR THE MANAGEMENT OF THE CITRUS BLACK SPOT CAUSED BY *Guignardia citricarpa* KIELY<sup>2</sup>

Author: Alexandre Martins Guimarães

Advisor: Fábio Kessler Dal Soglio

## ABSTRACT

Citriculture represents an important socioeconomic segment for the state of Rio Grande do Sul where the agroecological farming of citrus is developed, mainly by family agriculture. The Ecological Citriculture Group is a participative research group in which farmers, researchers and extensionists take part in and it aims at the development of the agroecological citriculture of the Caí Valley and Taquari Valley region. The present work aimed at performing a bioprospection of epiphytic microorganisms of citrus with a potential for the biological control of the citrus black spot disease (PPC), as well as characterizing the mechanisms of antagonism involved in the interaction of the biocontrol agents with *G. citricarpa*. This work was carried out in the town of Montenegro, Rio Grande do Sul in cv. Montenegrina tangerine orchards, conducted under organic farming. 24 filamentous fungi and 17 yeasts isolates were isolated from leaves and fruits, characterized in eight morphological types. Of these, only two yeast and four filamentous fungi isolates presented, *in vitro*, potential for the biocontrol of *G. citricarpa*, one of the filamentous fungi isolates was identified as *Trichoderma koningii*. It was not possible to directly observe the mycoparasitism of the epiphyte isolates tested on *G. citricarpa*. All the isolates antagonists of *G. citricarpa* presented quitinase, glucanase and protease activities. The antibiosis mechanism was observed in all the isolates, whether by the production of diffusible compounds or volatile inhibitors in *G. citricarpa*. In the mechanism of competition the production of siderophores by all of the filamentous fungi isolates was observed. The epiphyte isolate of *Trichoderma koningii* presented, in field conditions, a reduction of 18,58% in the incidence and 63,82% in the severity of the citrus black spot.

---

<sup>2</sup> Master of Science dissertation in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (91p.) April, 2008.

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	7
2.1 Importância e distribuição da pinta preta do citros.....	7
2.2 Etiologia.....	8
2.3 Sintomatologia.....	9
2.4 Epidemiologia.....	11
2.5 Controle.....	14
2.6 Microrganismos epifíticos e seu habitat.....	15
2.7 Controle biológico de doenças de plantas.....	17
2.7.1 Mecanismos de interações antagonísticas.....	18
2.7.2 Metabólitos secundários envolvidos nas interações antagonísticas.....	21
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	25
3.1 Obtenção de isolados de <i>Guignardia citricarpa</i> .....	25
3.2 Obtenção de microrganismos epifíticos de plantas de bergamoteira cv. Montenegrina.....	26
3.3 Avaliação do potencial antagonístico <i>in vitro</i> dos isolados de microrganismos epifíticos à <i>Guignardia citricarpa</i> .....	28
3.3.1 Seleção de antagonistas.....	28
3.4 Determinação dos mecanismos de antagonismo.....	29
3.4.1 Avaliação <i>in vitro</i> da ação de micoparasitismo.....	29
3.4.2 Avaliação da produção de enzimas hidrolíticas.....	30
3.4.2.1 Avaliação da atividade quitinásica e glucanásica em meio líquido.....	30
3.4.2.2 Avaliação da atividade proteásica em meio líquido.....	32
3.4.3 Avaliações <i>in vitro</i> de antibiose.....	33
3.4.3.1 Experimento com filtrado de cultura.....	33
3.4.3.1.a Crescimento dos isolados epifíticos antagonistas em meio líquido e obtenção de filtrados.....	33
3.4.3.1.b Avaliação <i>in vitro</i> do efeito de filtrados de cultura sobre o desenvolvimento de <i>Guignardia citricarpa</i> .....	34
3.4.3.2 Avaliação <i>in vitro</i> da produção de metabólitos voláteis sobre o desenvolvimento de <i>Guignardia</i>	



<i>citricarpa</i> .....	34
3.4.3.3 Avaliação <i>in vitro</i> da competição por Nutrientes.....	35
3.4.3.3.a Detecção de sideróforos.....	35
3.5 Identificação dos isolados antagonistas à <i>Guignardia citricarpa</i> .....	36
3.6 Avaliação do desempenho do isolado epifítico de <i>Trichoderma     koningii</i> Oudem. (1902) no controle biológico da pinta preta do citros em pomar de bergamoteira cv. Montenegrina.....	37
3.6.1 Produção massal de <i>Trichoderma koningii</i> .....	37
3.6.2 Preparo da suspensão de esporos de <i>Trichoderma koningii</i> para aplicação no campo.....	38
3.6.3 Aplicações de <i>Trichoderma koningii</i> em pomares de bergamoteira cv. Montenegrina.....	38
3.6.4 Avaliação de incidência e severidade da pinta preta do citros.....	39
3.6.5 Dados Climáticos.....	40
3.7 Análise estatística dos dados.....	40
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
6.1 Obtenção de isolados de <i>Guignardia citricarpa</i> .....	41
6.2 Obtenção de microrganismos epifíticos de plantas de bergamoteira cv. Montenegrina.....	43
6.3 Avaliação do potencial antagonico <i>in vitro</i> dos isolados de microrganismos epifíticos à <i>Guignardia citricarpa</i> .....	47
6.3.1 Seleção de antagonistas.....	47
6.3.2 Avaliação <i>in vitro</i> da ação de micoparasitismo dos isolados epifíticos antagonistas à <i>Guignardia citricarpa</i> .....	53
6.3.3 Avaliação da atividade quitinásica, glucanásica e proteásica em meio líquido.....	55
6.3.4 Avaliações <i>in vitro</i> da antibiose.....	61
6.3.4.1 Experimentos com filtrado de cultura.....	61
6.3.4.2 Avaliação <i>in vitro</i> da produção de metabólitos voláteis sobre o desenvolvimento de <i>Guignardia                 citricarpa</i> .....	63
6.3.5 Avaliação <i>in vitro</i> da competição por nutrientes.....	66
6.3.5.1 Detecção de sideróforos.....	66
6.4 Avaliação do desempenho do isolado de <i>Trichoderma koningii</i> no controle biológico da pinta preta dos citros em pomar de bergamoteira cv. Montenegrina.....	69
7. CONCLUSÕES.....	78
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	79
9. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS.....	81

## RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
1. Tipos morfológicos de colônias de fungos filamentosos e de leveduras, obtidos a partir do filoplano de bergamoteiras cv. Montenegrina, localizadas no município de Montenegro/RS. Porto Alegre, RS, 2007.....	45
2. Desempenho dos isolados de fungos filamentosos epifíticos de bergamoteira cv. Montenegrina, conduzidas sob manejo orgânico, no confronto direto com <i>Guignardia citricarpa</i> , em placas de Petri. Porto Alegre, RS, 2007. ....	50
3. Atividades quitinásica, glucanásica e proteásica dos isolados epifíticos de bergamoteira cv. Montenegrina, antagonistas à <i>Guignardia citricarpa</i> . Valores seguidos de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey 5%. Porto Alegre, RS, 2007.....	56
4. Produção de sideróforos pelos isolados epifíticos de bergamoteira cv. Montenegria, antagonistas à <i>Guignardia citricarpa</i> . Porto Alegre, RS, 2007.....	67

## RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
1. Detalhe do fungo fitopatogênico <i>Guignardia citricarpa</i> . (A) Picnidios crescendo sobre fragmento de casca de bergamoteira cv. Montenegrina, observado em microscópio estereoscópio, no aumento de 20 x; (B) Colônia de <i>G. citricarpa</i> pertencente ao grupo 1 (com coloração branca da borda da colônia); (C) Colônia de <i>G. citricarpa</i> pertencente ao grupo 2 (com coloração escura da borda da colônia). Porto Alegre, RS, 2007. ....	42
2. Pareamento de cultura dos isolados epifíticos de bergamoteira cv. Montenegrina com <i>Guignardia citricarpa</i> . (A) isolado de <i>Trichoderma koningii</i> sobrepondo colônia do patógeno após 4 dias da inoculação; (B e B') isolado B4 (colônia branca) mostrando crescimento micelial sobre a colônia do patógenos aos 15 dias da inoculação; (C e C') isolado B5; (D) isolados B3 limitando crescimento micelial do patógeno; (E) isolados de levedura Y7 restringindo crescimento do patógeno; (F) isolado de levedura Y 3 com ausência de ação antagonista à <i>G. citricarpa</i> , mostrando crescimento micelial do patógeno sob área com presença de colônia do isolado Y3; (G) colônia de <i>G. citricarpa</i> . Porto Alegre, RS, 2007.....	49
3. Diâmetro ( $\emptyset$ ) médio da colônia de <i>Guignardia citricarpa</i> quando contraposta com isolados de fungos filamentosos epifíticos de bergamoteira cv. Montenegrina, conduzidas sob manejo orgânico. A legenda se refere aos isolados. Barras seguidas de mesma letra não diferiram entre si pelo teste de Tukey 5%. Porto Alegre, RS, 2007.....	50
4. Diâmetro ( $\emptyset$ ) médio da colônia de <i>Guignardia citricarpa</i> quando contraposta com isolados de leveduras epifíticas de bergamoteira cv. Montenegrina, conduzidas sob manejo orgânico. A legenda se refere aos isolados. Barras seguidas de mesma letra não diferiram entre si pelo teste de Tukey 5%. Porto Alegre, RS, 2007. ....	52
5. Análise em microscopia óptica da região de contato de hifas do fitopatógeno <i>Guignardia citricarpa</i> e de hifas de isolados de fungos filamentosos epifíticos de bergamoteira cv. Montenegrina antagonistas a <i>G. citricarpa</i> , conforme método de Martins-Corder & Melo (1998), modificado. Setas pretas indicam hifa do fitopatógeno e setas coloridas indicam hifas dos isolados antagonistas. (A) Hifas de <i>G. citricarpa</i> e do isolado de <i>Trichoderma koningii</i> (x100). (B) Hifas de <i>G. citricarpa</i> e do isolado B4 com crescimento paralelo (x100). (C) Região de contato entre hifas de <i>G. citricarpa</i> e do isolado B5 (x40). Porto Alegre, RS, 2007. ....	55

6. Diâmetro ( $\emptyset$ ) médio da colônia de <i>Guignardia citricarpa</i> quando inoculada juntamente com discos de papel filtro contendo filtrados de cultura dos isolados B5, B4, B3 e de <i>Trichoderma koningii</i> , e também de levedura Y7 e Y8, epifíticos de bergamoteira cv. Montenegrina, segundo método de Feio <i>et al.</i> (2004). A legenda se refere aos isolados. Barras seguidas de mesma letra não diferiram entre si pelo teste de Tukey 5%. Porto Alegre, RS, 2007.....	62
	Página
7. Efeito <i>in vitro</i> de compostos voláteis liberados pelos isolados epifíticos B5, B4, B3, <i>Trichoderma koningii</i> , Y7 e Y8 de bergamoteira cv. Montenegrina, sobre o diâmetro ( $\emptyset$ ) médio da colônia de <i>Guignardia citricarpa</i> . Controle 1 - para fungos filamentosos; controle 2 - para leveduras. Barras seguidas de mesma letra não diferiram entre si pelo teste de Tukey 5%. Porto Alegre, RS, 2007.....	64
8. Detecção de sideróforos em filtrados de cultura dos isolados epifíticos de bergamoteira cv. Montenegrina: (A) controle; (B) tratamento positivo. A coloração amarelada indica a presença de sideróforos. Porto Alegre, RS, 2007.....	67
9. Box plot da distribuição dos valores de severidade (A) e incidência (B), em porcentagem, da pinta preta dos citros, sobre plantas de bergamoteira cv. Montenegrina, tratadas com e sem o agente biocontrolador epifítico <i>Trichoderma koningii</i> . Linha no Box indica o valor da mediana. Linha superior do Box representa o quartil superior (75%). A linha inferior do Box representa o quartil inferior (25%). As linhas externas ao Box representam os percentis superior (95%) e inferior (25%). Os pontos representam os valores extremos da distribuição. Porto Alegre, RS, 2007.....	70
10. Valores médios de precipitação pluviométrica (mm) e temperatura ( $^{\circ}$ C), nos meses de Junho a Outubro de 2007. Dados climáticos obtidos pela Estação Agrometeorológica do Centro de Pesquisa de Fruticultura do Município de Taquari – RS. Porto Alegre, RS, 2007. ....	71

## 1 INTRODUÇÃO

A citricultura representa um importante segmento econômico para o Brasil. No Estado do Rio Grande do Sul – RS, a citricultura além de apresentar importância econômica, exerce importante papel social e cultural nas regiões onde está concentrada.

A citricultura gaúcha apresenta características que merecem destaque. A qualidade das frutas frescas encontra-se acima da média nacional, pois as condições edafoclimáticas do RS são responsáveis pela produção de frutos com excelentes características físico-químicas. Outra característica importante diz respeito ao fato de que o RS é um excelente produtor de bergamotas. Também, a citricultura do RS é desenvolvida principalmente pela agricultura familiar que, por característica própria, apresenta grande diversidade no cultivo dos citros, bem como no número de cultivares de bergamoteiras.

Na região da Depressão Central do Estado, principalmente nas áreas localizadas nos vales dos rios Caí e Taquari, são produzidas variedades de bergamoteiras como a Ponkan, o tangor Murcott, a Caí e a Pareci. Também é cultivada a cultivar Montenegrina, que teve sua origem através da seleção dos próprios citricultores dessa região. As diferentes características dessas cultivares conferem inúmeras vantagens, como o escalonamento da produção, uma vez que apresentam diferentes períodos de maturação. Essa diferença prolonga a safra de

bergamotas, com destaque para a Montenegrina por apresentar maturação mais tardia. Assim, o RS encontra-se como um dos principais produtores de bergamotas para o consumo *in natura* no Brasil.

Outra característica importante refere-se à inserção da agricultura familiar na citricultura gaúcha. Nas regiões de maior produção, vales dos rios Caí e Taquari, a citricultura é desenvolvida basicamente pela agricultura familiar. Os agricultores familiares com 2 a 10 hectares de pomares de citros são responsáveis por geração de trabalho e renda que envolve cerca de 60 mil pessoas, entre empregos diretos e indiretos. Assim, a citricultura desenvolvida pela agricultura familiar representa um segmento sócio-econômico de grande relevância para o Estado. A organização de trabalho desses citricultores também merece destaque. A citricultura, nessas regiões, encontra-se organizada em cooperativas e associações. Essa forma de organização dinamiza a cadeia produtiva, facilita ao acesso tecnológico e elimina a figura do atravessador, gerando maior competitividade da bergamota gaúcha.

Embora a citricultura gaúcha apresente qualidades, a grande maioria dos citricultores é dependente de pacotes tecnológicos. Esses pacotes preconizam a utilização massiva de insumos externos à propriedade, muitas vezes recomendando o uso de produtos químicos altamente tóxicos. Essas determinações tecnológicas geram alto custo ambiental, diminuem a rentabilidade da citricultura e contribuem para a exclusão dos agricultores mais carentes.

Diante dessa realidade, alguns citricultores do Vale do Caí começaram a desenvolver experiências alternativas à produção de citros convencional, utilizando métodos de manejo que dispensam agrotóxicos ou fertilizantes químicos industriais. A partir dessa iniciativa, no ano de 1994, um grupo de quinze agricultores familiares fundou a Cooperativa de Citricultores Ecológicos do Vale do Caí (Ecocitrus), que

tem como princípio o protagonismo dos agricultores em toda a cadeia produtiva e também a produção agroecológica.

A estratégia inicial da Ecocitrus foi realizar a transição do sistema de fertilização química dos pomares de citros por um sistema de fertilização orgânica, através da adição de composto orgânico produzido pela própria cooperativa. Mais tarde, iniciaram-se modificações no manejo dos pomares, principalmente no manejo fitossanitário, através do uso de caldas, de extratos de plantas e biofertilizantes para controle de pragas e doenças. Atualmente, o sistema de produção de citros com bases agroecológicas desenvolvido pela Ecocitrus possui aproximadamente 500 hectares de pomares de citros certificados como de manejo orgânico, envolvendo cerca de 70 famílias de agricultores familiares.

No que se refere ao sistema de fertilização dos pomares de citros da Ecocitrus, a transição ocorreu sem grandes problemas. No entanto, os problemas fitossanitários têm impedido o avanço na transição agroecológica e também tem sido motivo de perda para os citricultores. Associado ao fato de não existir recomendações técnicas adaptadas ao sistema de produção de citros agroecológico e as pragas e doenças emergentes nas últimas décadas fizeram com que esses citricultores somassem esforços com a Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, através do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia da Faculdade de Agronomia, com a EMATER/RS, a EMBRAPA Clima Temperado e outras cooperativas e associações de citricultores do Vale do Caí, com o objetivo de desenvolver estratégias e alternativas para a solução dos problemas da citricultura agroecológica. Desse modo, no ano de 2000 foi constituído o Grupo de Citricultura Ecológica - GCE, que envolve as instituições citadas acima e que tem por objetivo o desenvolvimento de uma base científica para a produção de citros agroecológico,

bem como a utilização de metodologias participativas, a fim de aproximar e estimular a troca de conhecimentos entre os citricultores, pesquisadores e extensionistas.

A dinâmica de trabalho do GCE envolve reuniões, dias de campo e assembléias, onde, de forma participativa, os citricultores juntamente com os extensionistas e pesquisadores realizam diagnósticos, apontam problemas e discutem estratégias a serem pesquisadas. Com o conhecimento prático acumulado na produção de citros dos citricultores ecológicos, o conhecimento científico dos pesquisadores da UFRGS e da EMBRAPA Clima temperado, juntamente com a ação articuladora dos extensionistas da EMATER/RS, o GCE tem gerado excelentes experiências de desenvolvimento de pesquisa participativa adaptada às condições locais (Dal Soglio, 2006).

Os principais problemas diagnosticados pelo GCE são de ordem fitossanitária, principalmente a pinta preta dos citros (PPC), causada por *Guignardia citricarpa* Kiely (1948). Segundo relatos de citricultores, essa doença representa um entrave para a comercialização de frutos *in natura*, principalmente para a bergamoteira cv. Montenegrina por apresentar maturação mais tardia, momento em que coincidem no campo condições climáticas favoráveis para a expressão dos sintomas. Entre os prejuízos relacionados à PPC, está a depreciação do aspecto visual das frutas pela formação de pintas pretas nas cascas, inviabilizando a comercialização dos frutos para o mercado de frutas frescas. Além disso, quando no campo a doença apresenta alta severidade, ocorre a queda de frutos, podendo gerar perdas de até 40%.

A ineficiência do manejo dessa doença no sistema agroecológico, também foi avaliada pelo GCE. A principal medida de controle utilizada tem sido a



quimioterapia, através da aplicação da calda bordalesa (0,5% de sulfato de cobre). Entretanto, em anos de condições climáticas favoráveis à doença, a eficiência desse controle tem se mostrado baixa. Além da ineficiência, foi diagnosticado que, devido ao uso excessivo da calda bordalesa, algumas regiões apresentaram altos teores de cobre no solo. Apesar de este elemento ser aceito pela legislação brasileira vigente na produção orgânica, sabe-se que elevados teores no solo podem gerar problemas de nutrição para as plantas de citros. Dessa forma, torna-se necessário o desenvolvimento de novas alternativas de manejo da PPC, as quais foram apontadas pelo GCE como prioridade de pesquisa.

Sendo assim, o GCE idealizou uma linha de pesquisa em controle biológico a fim de desenvolver alternativas ao manejo da PPC. Dentre as estratégias levantadas encontra-se a bioprospecção de microrganismos epifíticos das plantas de citros para serem utilizados no controle biológico do fitopatógeno *G. citricarpa*. O objetivo de selecionar microrganismos epifíticos está relacionado ao fato de que o filoplano (superfície foliar e também a casca do fruto) representa um habitat que abriga inúmeras espécies de fungos filamentosos, leveduras e bactérias (Lindow & Brandl, 2003), como o filoplano das plantas de citros. Dentre esses microrganismos encontra-se aqueles que podem ser utilizados como agentes de controle biológico (Bettiol, 1991). Para isso, foi determinado que o isolamento dos possíveis antagonistas fosse realizado nos próprios pomares de citros dos citricultores envolvidos no GCE, com o objetivo de selecionar antagonistas já adaptados às condições locais.

Isolar antagonistas nos próprios locais em que serão aplicados constitui-se em um elemento de sucesso de um programa de controle biológico de doenças. Antagonistas locais tendem a se adaptar melhor às mudanças no filoplano, como a disponibilidade de nutrientes (Bettiol, 1997), fator mais importante nas variações da

composição da microbiota epifítica (Boddy & Winpenny, 1992). Também, isolados nativos tendem a apresentar maior adaptação às condições climáticas, como intensidades de chuvas, de ventos e de radiação solar. No filoplano podem-se encontrar nutrientes essenciais ao desenvolvimento de muitos microrganismos, como nutrientes inorgânicos, incluindo macro e microelementos e, também uma grande soma de substâncias orgânicas como açúcares, aminoácidos, ácidos orgânicos, fenóis, vitaminas e reguladores de crescimento (Bettiol, 1991). Ainda, utilizar antagonistas já adaptados aumenta sua probabilidade de estabelecimento e de competição com os fitopatógenos, principalmente em substratos ricos em nutrientes.

Outro ponto positivo do isolamento local refere-se à adaptação ao microclima do filoplano, pois há variações rápidas quando comparado ao ambiente da rizosfera, uma vez que a temperatura e a umidade variam amplamente, e os microrganismos ficam expostos à dessecação e à luz solar, havendo exposição ao ar atmosférico e a riscos de serem removidos pela água da chuva (Blakeman, 1985).

Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo: 1) selecionar microrganismos epifíticos do citros com potencial para o controle biológico de *G. citricarpa*, agente causal da PPC; 2) caracterizar os mecanismos de antagonismo potencialmente envolvidos na interação microrganismo epifítico x patógeno; 3) avaliar o efeito de microrganismos epifíticos do citros sobre a PPC, em condições de campo.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Importância e distribuição da pinta preta dos citros

A doença pinta preta dos citros (PPC) ou mancha preta dos citros, causada pelo fungo *Guignardia citricarpa* Kiely [*Phyllosticta citricarpa* (McAlp.) Van der Aa.], foi constatada pela primeira vez na Austrália em 1895 (Sutton & Waterson, 1966). Em 1925, a doença foi identificada na África do Sul tornando-se rapidamente um dos principais problemas fitossanitários em citros (Schutte *et al.*, 1997). A PPC apresenta distribuição global e é restringida apenas por parâmetros climáticos como, por exemplo, temperaturas abaixo de 11°C (Schutte *et al.*, 1997).

No Brasil a PPC foi descrita pela primeira vez no Estado de São Paulo, em 1940. Até a década de 70 a doença passou despercebida, certamente devido à uma temporária redução do inóculo inicial do patógeno causada pela redução dos pomares pela tristeza dos citros. Entretanto, em 1986 a doença foi constatada no Estado do Rio Grande do Sul (Vale do Caí) causando sérios danos à citricultura da região (Goes *et al.*, 1988). Segundo Feichtenberger & Spósito (2004), atualmente esta doença encontra-se presente nos Estados do Rio de Janeiro, São Paulo, Rio Grande do Sul, Minas Gerais, Espírito Santo, Santa Catarina, Amazonas e Paraná.

A pinta preta dos citros possui alta dispersão geográfica no Estado de SP, devido às condições favoráveis à produção de inóculo (Fundecitros, 2000). Segundo relatos de citricultores da região do Vale do Caí – RS, a PPC representa um dos

principais problemas fitossanitários da cultura (Laux, 2006). Essa doença, considerada praga quarentenária nos países produtores e consumidores, restringe a comercialização de material de propagação, mudas e frutos. A presença da doença tem gerado restrições fitossanitárias impostas por países importadores, como a Comunidade Européia (Aguilar-Vildoso, 2002).

A importância econômica da PPC reside no fato de a mesma atacar os frutos das variedades de citros mais apreciadas para o consumo *in natura*, principalmente a laranja Pêra e a bergamota cv. Montenegrina, depreciando-as economicamente através de manchas que, mesmo limitadas à região da casca (flavedo), inviabilizam a comercialização (Goes, 2002). A PPC pode também causar queda prematura dos frutos reduzindo a produção (Klotz, 1988; Spósito, 2003).

## 2.2 Etiologia da pinta preta dos citros

O fungo causador da pinta preta dos citros é um Ascomiceto, Loculoascomiceto, Dothideales, Dothideacea (Kiely, 1948). O patógeno foi primeiramente descrito por McAlpine em 1889 (McConie, 1964) na sua forma assexuada, sendo denominado de *Phoma citricarpa* McAlpine. Em seguida, surgiu uma nova denominação *Phyllosticta citricarpa* (McAlp.) van der Aa (sin.= *Phyllosticta citricarpa* (McAlp.) Petrak.). O estágio sexual do patógeno foi descoberto por Kiely, em 1948, sendo chamado de *Guignardia citricarpa* Kiely (Kotzé, 1996).

No ano de 1964, McConie descreveu duas variantes de *G. citricarpa* morfológicamente semelhantes, com ocorrência nos citros, sendo uma delas patogênica e a outra considerada endofítica. Entretanto, atualmente sabe-se que a forma endofítica é uma outra espécie denominada de *Guignardia mangiferae* A.J.

Roy (1968) (anamófica: *Phyllosticta capitalensis*), que apresenta padrões distintos quanto à taxa de desenvolvimento vegetativo em meios de cultura, coloração de colônias e morfologia de conídios (Baayen *et al.*, 2002).

O fungo *G. citricarpa* pode infectar folhas, frutos e ramos de citros por meio de seus dois tipos de esporos, os esporos assexuados (picnidiósporos) que se desenvolvem em folhas e frutos da planta e os esporos sexuais (ascósporos), que se desenvolvem em folhas em decomposição no solo (Fundecitrus, 2000). Com exceção da laranja azeda (*Citrus aurantium* L.) e seus híbridos, todas as espécies de citros são suscetíveis a *G. citricarpa*. Os limoeiros também são suscetíveis e grandes perdas podem ocorrer em laranja doce (*Citrus sinensis* L.), pomelo (*Citrus paradisi* Macf.) e tangerineiras (*Citrus deliciosa* Tenore.) (Kotzé, 1981).

### **2.3 Sintomatologia da pinta preta dos citros**

O sintoma característico da PPC é a formação de uma lesão de centro acinzentado com bordos salientes marrom-escuro e um halo amarelo ao redor, observados nas folhas e nos frutos. As lesões produzidas restringem-se ao flavedo, prejudicando a comercialização de frutas frescas (Goes, 1998). A doença pode apresentar um período de latência de seis a oito meses, dependendo da cultivar de citros e das condições climáticas (Whiteside *et al.*, 1993).

Os primeiros sintomas aparecem durante a maturação dos frutos (Goes *et al.*, 1990). Feichtenberger *et al.* (1997) e Fundecitrus (2000) condicionam a manifestação dos sintomas e a epidemia em folhas, ramos e frutos, à radiação solar combinada às altas temperaturas (20 a 24°C). Esse fato ainda não foi bem elucidado, mas supõe-se que o patógeno se beneficia com o aumento da temperatura (Mconie, 1964) e o aumento da intensidade luminosa (Brodrick & Rabie, 1970).

Atualmente, há vários tipos de sintomas da PPC podendo ser agrupados em falsa melanose, mancha marrom ou mancha sardenta, mancha virulenta e mancha preta ou dura, sintoma mais típico (Fundecitrus, 2000). Segundo Timmer *et al.* (2000), a literatura internacional cita quatro sintomas diferentes, porém, no Brasil já foram relatados seis tipos em laranjeiras. O sintoma de mancha dura geralmente começa a aparecer no período em que inicia a mudança da coloração dos frutos, apresentando lesões com centro necrótico deprimido, marrom claro e as bordas salientes marrom-escuras. Em frutos mais verdes, a lesão é circundada por um halo amarelado. Já em frutos mais maduros, a lesão é circundada por um halo esverdeado. Uma característica típica dessa lesão é a presença de pontos negros em seu interior, que se constituem nos corpos de frutificação do fungo, os picnídios. O sintoma de falsa melanose apresenta manchas escuras e pequenas, dispersas ou agregadas nos frutos. Na mancha sardenta, as lesões são pequenas, deprimidas e avermelhadas, geralmente ocorrendo no período de maturação dos frutos e na pós-colheita. A mancha rendilhada constitui-se de lesões superficiais que atingem grandes áreas dos frutos, quando ainda se apresentam verdes, sem a presença de corpos de frutificação. A mancha trincada está associada à presença do ácaro da falsa ferrugem (*Phyllocoptruta oleivora* Ashm, 1879), no qual as lesões são arredondadas, ocorrendo em frutos ainda verdes. Com a maturação dos frutos, as lesões apresentam trincas em sua superfície, sem corpos de frutificação.

Já a mancha virulenta é um sintoma caracterizado pela coalescência das lesões dos diferentes tipos de sintomas, atingindo, portanto, grandes áreas da superfície dos frutos (Fundecitrus, 2000). Até o momento, não são conhecidos os processos fisiológicos que levam à formação dos diferentes tipos de sintomas da doença e sua expressão em diferentes períodos de desenvolvimento do fruto.

Conforme Aguilar-Vildoso (2002), com a formação das estruturas reprodutivas do patógeno nos frutos, ocorre a lesão e o fruto perde o valor de mercado para consumo de fruta fresca. Ocorre, ainda, o aumento na acidez do fruto devido às lesões da PPC, diminuindo assim a qualidade dos mesmos para a indústria. Entretanto, a elevação da acidez deve-se ao fato da colheita antecipada pelos citricultores, a fim de proporcionar escape dos sintomas no campo, enviando para indústria frutos imaturos.

#### **2.4 Epidemiologia da pinta preta dos citros**

Segundo Kotzé (1988), os fatores que afetam a epidemia da pinta preta dos citros são a quantidade de inóculo disponível, as condições climáticas, o ciclo de crescimento da planta e estágio de desenvolvimento do fruto.

O ciclo da doença é bem definido, possuindo os ciclos primário e secundário. No ciclo primário, ocorre a fase sexual da *G. citricarpa*, cujas estruturas infectivas são os ascósporos que introduzem a doença na área e iniciam a epidemia. Os peritécios, estruturas responsáveis pela formação dos ascos e ascósporos, só podem ser encontrados completos e maduros em folhas em estado de decomposição intermediário. A produção de ascósporos é dependente do momento da desfolha, da velocidade de decomposição das folhas e está diretamente relacionada com as temperaturas e precipitações prevalentes (Alcoba *et al.*, 2000). Os peritécios não são encontrados em lesões de frutos e folhas, distribuem-se de forma isolada ou agregada, têm formato globoso, coloração castanho escuro, 95-125 µm de diâmetro, ostíolo não papilado, circular, com 10-17,5 µm de diâmetro e pseudoparáfises ausentes. Os ascos são cilíndricos clavados (40-64 X 12-15 µm), de parede bitunicada, contendo oito ascósporos unicelulares, hialinos, multigutulados,

cilíndricos com o centro dilatado (12,5-16 X 4,5-6,5  $\mu\text{m}$ ) e apêndices hialinos nas duas extremidades obtusas (Feichtenberger *et al.*, 1997; Baldassari *et al.*, 2001). Os ascósporos liberados são ejetados em uma altura de 1 cm, carregados por correntes de ar e disseminados a longas distâncias (Kotzé, 1963). A produção de esporos sexuais no ciclo primário é de suma importância para a sobrevivência do fungo, devido à sua maior variabilidade genética e tolerância ao ressecamento.

Já o ciclo secundário é caracterizado pela fase assexual do fungo (*Phyllosticta citricarpa*), no qual os picnidiósporos são responsáveis pelo incremento da doença na planta (Aguilar-Vildoso, 2002; Kiely, 1948). Na fase anamórfica, *G. citricarpa* produz picnídios em lesões de frutos e folhas e, ocasionalmente, no pedúnculo de frutos. Os picnídios são de coloração marrom-escuro ou preta, solitários ou agregados, globosos (115-190  $\mu\text{m}$  de diâmetro), apresentando um ostíolo levemente papilado e circular, de 12-14,5  $\mu\text{m}$  de diâmetro (Feichtenberger *et al.*, 1997). Os picnidiósporos apresentam forma ovóide a elíptica (8-10,5 X 5,5-7  $\mu\text{m}$ ) ou subglobosos, são hialinos, unicelulares, multigutulados, com um apêndice (5-10  $\mu\text{m}$ ) hialino em uma das extremidades (Feichtenberger *et al.*, 1997; Baldassari *et al.*, 2001). Segundo Smith (1996), os picnidiósporos também são produzidos em frutos maduros. Os picnidiósporos são as principais estruturas responsáveis pela disseminação do fungo à curta distância, e estão envolvidos por uma substância mucilaginosa que é facilmente solubilizada e transportada pela água das chuvas, orvalho ou irrigação, atingindo a superfície de órgãos suscetíveis, podendo iniciar novas infecções (Kotzé, 1981; Robbs *et al.*, 1985).

Segundo Kotzé (1981), o período crítico de suscetibilidade dos frutos para a PPC ocorre desde a fase de chumbinho até cerca de seis meses após a queda das pétalas e a doença é severa em plantas mais velhas e, com o envelhecimento do



pomar de citros, a incidência tende a aumentar. Na África do Sul, o período crítico para a infecção ocorre após a queda das pétalas e estende-se até quatro a cinco meses de desenvolvimento dos frutos. No Brasil, esse período parece ser mais longo (Kotzé, 1988). De acordo com Baldassari (2001), a janela de suscetibilidade das laranjas 'Natal' e 'Valência' à infecção é de pelo menos seis meses.

Segundo Kotzé (1988), os esporos sexuais e assexuais germinam na superfície de órgãos suscetíveis e produzem tubo germinativo e apressório do qual se origina um delgado grampo de penetração (“peg”) que penetra na cutícula, dando origem a uma pequena massa de micélio entre a cutícula e a epiderme do órgão infectado. Nessa região, o micélio subcuticular quiescente do fungo pode permanecer dormente por até doze meses. Essa dormência ou infecção latente pode ser interrompida quando o fruto atingir seu tamanho final e ou quando a folha, já caída, começar a se decompor. O patógeno, então, cresce, a partir do micélio subcuticular, e coloniza tecidos mais internos, produzindo os sintomas típicos da doença (McConie, 1967).

## **2.5 Controle da pinta preta dos citros**

Dentre as medidas clássicas de controle da pinta preta dos citros, é recomendado o plantio de mudas sem sintomas da PPC, a remoção de frutos temporões infectados antes do início da florada, a fim de reduzir a fonte de inóculo. Também recomenda-se o uso de irrigações no inverno para prevenir a queda excessiva de folhas (para o estado de São Paulo), nutrição adequada e uso de fungicidas (Feichtenberger *et al.*, 1997).

Para o controle químico, são recomendados fungicidas protetores (à base de cobre ou ditiocarbamatos) e/ou sistêmicos (principalmente benzimidazóis e os

translaminares como as estrobilurinas), associados a óleo mineral ou vegetal, com em média quatro pulverizações, a partir da queda das pétalas (Fundecitrus, 2000). Segundo Rodrigues *et al.* (2006), devido ao baixo número de fungicidas eficazes no controle da PPC e pela ação específica que eles exercem sobre o patógeno, tem-se gerado alta pressão de seleção sobre as populações do *G. citricarpa*, vindo a resultar na seleção de isolados resistentes em curto período de tempo. Ghini & Kimati (2000) comentam sobre a seleção de isolados resistentes ao fungicida benomil e Rodrigues *et al.* (2006) observaram a existência de isolados de *G. citricarpa* resistentes à fungicidas do grupo dos benzimidazóis, em área com elevada frequência de aplicações destes fungicidas.

## **2.6 Microrganismos epifíticos e seu habitat**

Estudos têm contribuído para um melhor entendimento dos fatores físicos, químicos e microbiológicos da superfície foliar das plantas (Olive & Kevin, 2002). Segundo Bettiol (1991) tem sido relatada a existência de grandes populações microbianas vivendo na superfície das folhas, sendo denominadas de populações de microrganismos epifíticos, como as populações de bactérias, leveduras e fungos filamentosos. Dentre essas populações encontram-se as que são capazes de influenciar o processo de infecção de folhas, caules e frutos das espécies fitopatogênicas e, pela a ação de atividades antagonísticas, promovem o controle biológico natural. Assim, o estudo sobre o controle biológico de doenças da parte aérea de plantas, voltou-se a essa categoria de microrganismos, como por exemplo, o controle biológico da lixa-preta do coqueiro através dos microrganismos epifíticos *Acremonium alternatum* Link (1809) e *Acremonium persicinum* (Nicot) W. Gams (1971) (Sudo, 1989).

Com o avanço dos estudos sobre a superfície foliar das plantas houve a necessidade de denominar esta região. Logo, Last (1955) determinou que a região que compreende o ambiente logo acima da superfície das folhas, cerca de 0,5 a 1 cm, fosse denominada de filosfera e a superfície física de filoplano. Esta terminologia foi criada em analogia aos termos rizosfera e rizoplano (Bettiol, 1991). Todavia, ainda há poucos estudos sobre as características da filosfera e do filoplano, e suas interações com a microbiota epifítica. Essa carência de informações, dificulta o entendimento sobre a dinâmica populacional da microbiota epifítica nativa e também exótica de determinadas plantas, o que dificulta as investigações no controle biológico de doenças da parte aérea de plantas.

A microbiota epifítica do filoplano pode ser classificada em residentes e casuais (Leben, 1965). A microbiota residente é aquela que é capaz de se multiplicar no filoplano, sem afetar o hospedeiro, e a microbiota casual corresponde àquela que se apresenta em trânsito no filoplano, sem multiplicar-se (Baker & Cook, 1974).

O filoplano se apresenta como um habitat ímpar, diferindo do ambiente dos solos (Baker & Cook, 1974). A umidade e a temperatura no filoplano apresentam variações devido à exposição solar, ao ar atmosférico, às chuvas, à localização das folhas na planta. As modificações no microclima do filoplano culminam em constante sucessão da microbiota epifítica (Burrage, 1971).

A disponibilidade de nutrientes no filoplano também apresenta variações (Bettiol, 1991), sendo um fator determinante na competição entre as populações epifíticas (Baker & Cook, 1974). Segundo Bettiol (1991), a origem dos nutrientes no filoplano é diversa, podendo advir de exsudados foliares, resíduos orgânicos, grãos de pólen, secreções de afídios, entre outras. Assim, com o desenvolvimento da folha

ocorrem mudanças na disponibilidade de nutrientes, aumentando com o passar do tempo.

Dessa forma, segundo Bettiol (1991), a variação do microclima e da disponibilidade de nutrientes no filoplano afeta as populações microbianas epifíticas e o seu conhecimento constitui em ponto chave para o sucesso de programas de controle biológico de doenças da parte aérea de plantas. Segundo Morris & Rouse (1985), pode-se alterar um ecossistema, como o filoplano, para favorecer um aumento do tamanho da população dos antagonistas nativos, a fim de contribuir para o controle biológico de uma certa doença, porém, essa estratégia requer o profundo conhecimento das características do filoplano. O controle dessas alterações, associado à utilização inundativa de microrganismos já adaptados às condições do filoplano, caracteriza-se em um ponto positivo para o controle biológico de doenças.

## **2.7 Controle biológico de doenças de plantas**

A filosofia do controle biológico considera doença de plantas como algo mais do que uma íntima interação do patógeno, hospedeiro e influências do ambiente, mas sim como o resultado de uma interação entre o hospedeiro, patógeno, ambiente e uma variedade de microrganismos não-patógenos, que também repousa nos sítios de infecção e que apresenta potencial para limitar a atividade do patógeno, ou aumentar a resistência do hospedeiro (Cook & Baker, 1983).

Várias são as definições do controle biológico de doenças de plantas. O controle biológico pode ser conceituado como sendo o controle de um microrganismo por meio de outros microrganismos (Bettiol, 1991). Cook & Baker (1983) apresentam uma definição mais ampla, definindo-o como sendo “a redução da soma de inóculo ou das atividades determinantes da doença provocadas por um

patógeno, realizada através de um ou mais organismo que não o homem”. No entanto, estes autores sugerem a possibilidade da ação antrópica em prol do controle biológico, através do uso de várias estratégias como as práticas culturais e o melhoramento genético da planta, a fim de criar ambiente favorável ao biocontrolador e adaptar a planta às atividades antagonistas.

A utilização do controle biológico em doença da parte aérea de plantas é comumente empregada através da introdução de antagonistas no filoplano (Bettiol, 1991). Todavia, o sucesso dessa prática encontra-se calcado na capacidade do antagonista em se multiplicar e colonizar o filoplano (Blakeman & Fokkema, 1982). Segundo Bettiol (1991), as chances de êxito, nessas condições, são aumentadas quando se utiliza antagonistas originários do filoplano em que serão inoculados, pois possuem mecanismos de sobrevivência já adaptados, diminuindo a necessidade de serem reaplicados com maior frequência.

### **2.7.1 Mecanismos das interações antagonísticas**

Segundo Henis & Chet (1975), o equilíbrio ecológico entre determinados microrganismos em um dado habitat é dependente de uma série de fatores. Dentre esses fatores, estão as interações microbianas, que podem apresentar caráter neutro, benéfico ou detriminal (Bettiol, 1991). As interações envolvidas no controle biológico de fitopatógenos são determinadas pelos mecanismos de antagonismo. Esses mecanismos podem ser divididos em competição, parasitismo, antibiose, predação, hipovirulência e indução de defesa do hospedeiro (Cook & Baker, 1983). É provável que os diferentes mecanismos atuem em sinergia durante uma interação antagônica (Punja & Utkhede, 2003). O conhecimento da natureza desses mecanismos é determinante para potencializar o controle biológico de doenças. (Blakeman &

Fokkema, 1982). Em atividades de bioprospecção de agentes microbianos com potencial antagônico a um determinado fitopatógeno, os mecanismos de antagonismos mais importante são o parasitismo, a antibiose e a competição.

O mecanismo de parasitismo é caracterizado como o fenômeno de um microrganismo parasitar o outro (Bettiol, 1991). Para fungos, o micoparasitismo apresenta-se como um processo complexo que envolve uma sequência de eventos, incluindo o reconhecimento, ataque, penetração e posterior morte do hospedeiro. Espécies de *Trichoderma* podem exercer o biocontrole parasitando vários fungos fitopatogênicos. Esse mecanismo é realizado pela presença de enzimas hidrolíticas como as quitinases, glucanases e proteases que degradam a parede celular (Harman *et al.*, 2004). Numa relação de micoparasitismo ocorrem, por parte do agente biocontrolador, modificações morfológicas, como a formação de apressório que servem para penetrar no hospedeiro (McIntyre *et al.* 2004 apud Benítez, *et al.*, 2004). Após a penetração são introduzidas enzimas capazes de degradar a parede celular e também antibióticos como o peptaibols, que irão proporcionar a penetração da hifa do biocontrolador no lúmen do fungo parasitado e posteriormente, extraindo seu conteúdo celular (Howell, 2003).

Já o mecanismo de antibiose pode ser definido como uma interação entre microrganismos na qual um ou mais metabólitos de baixo peso molecular produzidos por um organismo, têm efeito danoso sobre o outro (Bettiol, 1991). Esses metabólitos podem atuar na inibição do crescimento ou germinação e também em nível celular pela inibição das atividades do microrganismo, podendo ser letais a este.

Vários trabalhos têm demonstrado a ação de antibióticos no controle biológico de doenças. Cullen & Andrews (1984) correlacionaram a produção do antibiótico chetomin por *Chaetomium globosum* Kunze (1817) no antagonismo à

*Venturia inequalis* (Cooke) G. Winter (1875) sobre plântulas de maçã. Testes *in vitro* e *in vivo* mostraram que o antagonismo à *Drechslera dictyoides* (Drechsler) Shoemaker (1978) está relacionado com a produção de metabólitos inibidores produzidos por isolados bacterianos (Anusuya & Sullia, 2001). Muitas espécies do gênero *Trichoderma* produzem metabólitos tóxicos não voláteis que impedem o crescimento de muitos fitopatógenos. Dentre esses destacam-se o ácido harzianico, alameticinas, tricholinas, peptaibol, 6-pentil-a-pirona, massoilactona, viridina, gliovirina, glisopreninas, ácido heptelídico, entre outros (Benítez et al., 2004). Em geral, isolados de *Trichoderma virens* (J.H. Mill., Giddens & A.A. Foster) Arx (1987), eficientes como biocontroladores, são capazes de produzir gliovirina (Harman, 2000). O sucesso do biocontrole de *Gaeumannomyces graminis var. tritici* J. Walker (1972), por *Trichoderma harzianum* Rifai (1969) à produção do antibiótico pyrone.

Segundo Howell (2003), a combinação de enzimas hidrolíticas e antibióticos resulta no aumento da atividade antagônica. Esse autor relatou os efeitos sinérgicos entre uma endoquitinase de *T. harzianum* e gliotoxina, e também entre enzimas hidrolíticas e peptaibols sobre a germinação de *Botrytis cinérea* Pers. (1794). Segundo Wiest *et al.* (2002), peptaibols e enzimas hidrolíticas apresentam sinergismo ao inibir o crescimento de fungos fitopatogênicos.

O mecanismo de competição pode ser entendido como a interação entre dois ou mais organismos empenhados em uma mesma ação, como crescer e buscar nutrientes. A escassez de nutrientes é a causa mais comum para a morte de microrganismos, sendo a competição por nutrientes uma característica importante para o controle biológico de fitopatógenos (Chet *et al.*, 1997). Muitos fungos filamentosos captam ferro e, quando este é pouco disponível, podem excretar

compostos de baixo peso molecular como, por exemplo, os sideróforos (Eisendle *et al.*, 2004). Algumas espécies de *Trichoderma* são eficientes produtores de sideróforos que capturam o ferro, não possibilitando o uso deste por outros fungos (Chet & Inbar, 1994).

O gênero *Trichoderma* tem uma alta capacidade de capturar nutrientes quando comparado com outros organismos. É capaz de obter energia a partir de diferentes fontes de açúcares como polímeros derivados de estruturas fúngicas, destacando a celulose, glucanas, quitinas, entre outros (Chet *et al.* 1994 apud Benítez, *et al.*, 2004).

Segundo Delgado *et al.* (2003), o transporte de glucose através da parede celular pode ser crucial na competição por nutrientes. Isolado de *T. harzianum*, habitante de solos pobres em nutrientes e com baixo nível de glucose, pode expressar o gene Gtt1 que facilita o transporte de glucose através da membrana celular. Segundo Benítez *et al.* (2004), o papel desse gene no antagonismo permite que fungos antagonistas possam obter energia a partir de polímeros hidrolisados e transportar açúcares rapidamente para dentro da célula.

### **2.7.2 Metabólitos secundários envolvidos nas interações antagonísticas**

Muitos microrganismos são capazes de produzir uma ampla variedade de compostos com comprovada atividade biológica, sob condições normais ou extremas (Saxena & Pandey, 2001), e muitos desses compostos são enzimas e têm a sua produção durante o metabolismo secundário, não sendo essenciais para o crescimento do organismo, ainda que em muitos casos auxiliem na sobrevivência em condições naturais (Martin & Demain, 1980). Os antibióticos, produtos naturais orgânicos de baixo peso molecular produzidos por microrganismos, apresentam



atividade contra outros microrganismos em baixas concentrações (Demain, 1999; Benítez *et al.*, 2004).

Muitos desses compostos têm grande importância no controle biológico de doenças e, segundo Gimenez *et al.* (2000), podem ser considerados como potentes praguicidas. Dentre os metabólitos secundários de importância no controle biológico destacam-se as enzimas hidrolíticas. A importância dessas enzimas, como as quitinases, glucanases e proteases produzidas por *Trichoderma* spp. tem sido amplamente estudada (Howell, 2003).

As quitinases pertencem a um vasto grupo de glicosídeos. Essas enzimas são classificadas em famílias, baseado na similaridade da sequência de aminoácidos (Theis & Stahl, 2004). Em geral, as quitinases catalisam a degradação da quitina e agem frequentemente como endoquitinases, produzindo quitina-oligosacarídeos de 2-6-N-acetil-glucosamina (Stintzi *et al.*, 1993). Vários microrganismos são capazes de crescer sobre quitina e secretar quitinases para usar a quitina como fonte de carbono (Wang *et al.*, 2002). As quitinases também podem exercer outras funções como a indução de defesa em plantas contra fitopatógenos, como as proteínas RP-3 (Proteínas Relacionadas à patogênese) (Theis & Stahl, 2004).

Glucanos são o segundo maior componente da parede celular dos fungos. As enzimas glucanases hidrolisam diferentes glucanos, sendo consideradas como potentes proteínas antifúngicas (Theis & Stahl, 2004). Estudos têm mostrado que as glucanases inibem a germinação de esporos ou o crescimento de fungos fitopatogênicos em sinergismo com as quitinases (El-Katatny *et al.*, 2001). As glucanases também participam dos processos de defesa das plantas e a  $\beta$ -1,3 glucanase é caracterizada como proteína RP-2 dentro da planta (Linthorst *et al.*, 1990).

Howell (2003) menciona que as quitinases e glucanases atuam quebrando os polissacarídeos, as quitinas e as  $\beta$ -glucanas da parede celular fúngica, reduzindo a rigidez com posterior degradação total.

É comum a produção de proteases por fungos filamentosos (Howell, 2003). A importância das proteases nos processos de micoparasitismo também já foi constatada em fungos como o nematófago *Pochonia chlamydosporia* (Goddard) Zare & W. Gams (2001) (Segers *et al.*, 1994) e o entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokín (1883) (St. Leger *et al.*, 1995). Espécies de *Trichoderma* são conhecidas como produtoras de proteases (Haab *et al.*, 1990). A atividade proteolítica de *T. viride* foi observada no biocontrole de *Sclerotium rolfsii* Sacc. (1911) em solo autoclavado (Rodriguez-Kabana, 1978) e também de *Botrytis cinerea* Pers. (1794) (Silva-Ribeiro, 2001). Proteases estão envolvidas na degradação de proteínas da parede celular dos fungos (Goldman *et al.*, 1994). Segundo Howell (2003), no controle biológico de *B. cinerea* por *T. harzianum*, sobre folhas de feijoeiro, as proteases apresentam importante papel. As proteases quebram as enzimas hidrolíticas dos fitopatógenos em cadeias de peptídeos e/ou aminoácidos e, por meio disso, destroem a capacidade do patógeno de atacar a célula da planta. Também, sua importância tem sido reforçada com o isolamento de novas proteases super-expressadas a partir de isolados de *T. harzianum* (Suárez *et al.* 2004 apud Benítez *et al.*, 2004). O isolado T39 de *T. harzianum* produziu proteases sobre folhas de feijão na presença de *B. cinerea*, inibindo a germinação e inativando as enzimas endo-PG e exo-PG produzidas pelo patógeno, consequentemente reduzindo a doença (Elad & Kapat, 1999).

Alem das quitinases, glucanases e das proteases outros metabólitos secundários estão envolvidos nas atividades antagonísticas, como os sideróforos, que

estão diretamente relacionados com o mecanismo de competição. Segundo Renshaw *et al.* (2002), os sideróforos são compostos orgânicos de baixo peso molecular (0,5 a 1,5 Kda), produzidos por muitos fungos e bactérias. São quelantes de alta afinidade com o íon férrico, atuam na solubilização do ferro no ambiente e também auxiliam o transporte do elemento através da bicamada lipídica para dentro da célula, disponibilizando-o para o metabolismo do produtor.

Normalmente os microrganismos habitam ambientes com baixa disponibilidade de ferro devido à solubilidade muito baixa dos sais de ferro em pH próximo a neutralidade. Desse modo, muitos microrganismos aeróbicos e anaeróbicos facultativos evoluíram para a produção de sideróforos quelantes de Fe (III) (Benite *et al.*, 2002), já que o metal é necessário à transferência de elétrons na cadeia respiratória, reações ácido-base e reações de síntese e degradação de DNA. Algumas bactérias estritamente anaeróbias e algumas leveduras, como *Saccharomyces cerevisiae* Meyen (1838), não produzem sideróforos, mas utilizam sideróforos exógenos (Renshaw *et al.*, 2002). Logo, a capacidade de produção do metabólito por agentes de biocontrole é traduzida como uma importante ferramenta na competição por ferro (Bultreys *et al.*, 2001).

A produção de sideróforos é conhecida por apresentar efeitos negativos sobre microrganismos fitopatogênicos devido ao sequestro de ferro, inibindo o crescimento ou a atividade metabólica dos patógenos (Raaska *et al.*, 1999; Calvente *et al.*, 2001). Renshaw *et al.* (2002) relatam o sucesso de um isolado de *Fusarium* spp., não-patogênico, que foi capaz de suprimir o crescimento dos isolados patogênicos de *Fusarium* spp. pela maior produção de sideróforos.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Obtenção de isolados de *Guignardia citricarpa*

O isolamento do patógeno *G. citricarpa* foi realizado conforme a técnica de isolamento por fragmentação (Araújo *et al.*, 2001), modificada. Folhas e frutos de bergamoteira cv. Montenegrina, com sintoma de pinta preta dos citros, foram coletados em pomares conduzidos no manejo agroecológico, localizado no município de Montenegro/RS, armazenados em caixas térmicas contendo gelo e levados até o Laboratório de Microbiologia Fitopatológica, do Departamento de Fitossanidade, Faculdade de Agronomia/UFRGS. Esses materiais vegetais foram lavados em água corrente para eliminar resíduos como poeira e solo. Em seguida, foram cortados fragmentos dos tecidos contendo lesões da doença, tanto de folha como de casca dos frutos, a fim de isolar os picnídios do patógeno. Posteriormente, realizou-se a desinfestação imergindo os fragmentos em álcool 70% por 1 minuto, seguido de hipoclorito de sódio (2 – 4% de cloro ativo) por 3 a 4 minutos e novamente em álcool 70% por 30 segundos. Após, realizou-se o enxágue por duas vezes em água destilada e esterilizada, com plaqueamento de alíquota de 0,5 mL da última lavagem, em meio de cultivo BDA (batata 200g; dextrose 20g; ágar 20g; 1000 mL de água destilada), a fim de verificar a eficiência do processo de desinfestação. Ao término, os fragmentos desinfestados foram incubados em placas de Petri contendo meio de cultura BDA, a

28 ± 2°C e fotoperíodo de 12 horas (lâmpada fluorescente). O processamento do material vegetal coletado não excedeu 48 horas.

Baseado nas características morfológicas descritas por Sutton & Waterston (1966) foram identificadas as colônias de *G. citricarpa*. As colônias foram repicadas até a obtenção de cultura pura e, posteriormente, armazenadas em tubos de ensaio com meio de cultura BDA inclinado e em frascos de vidro contendo solução salina 0,85% esterilizada. Os tubos de ensaio foram mantidos em refrigerador a 4°C e os frascos de vidro em temperatura ambiente.

### **3.2 Obtenção de microrganismos epifíticos de plantas de bergamoteira cv. Montenegrina**

Isolados de fungos filamentosos e leveduras foram obtidos através do isolamento a partir de folhas e frutos de bergamoteira cv. Montenegrina. As coletas foram realizadas em pomares com oito anos, com espaçamento de 4 x 5 m, sob manejo agroecológico empregado pela Ecocitrus. As coletas compreenderam os estádios fenológicos de frutos com aproximadamente 2 cm de diâmetro até frutos na fase de mudança de cor. Embora não tenha sido aplicado nenhum tratamento fitossanitário no período de trinta dias antecedente às coletas, algumas folhas e frutos apresentavam resíduos de calda bordalesa. Os pomares amostrados localizavam-se no município de Montenegro/RS, na propriedade do citricultor Luis Laux.

Foram realizadas quatro coletas em diferentes pomares da propriedade. Para tal, a propriedade foi dividida em três talhões, conforme características do relevo, exposição solar e altitude em que se encontravam os pomares. O talhão 1 representou pomar implantado em uma área de baixada com pouca exposição à ventos. O talhão 2, pomar implantado em área com altitude intermediária e exposição para o norte. Já

o talhão 3 foi caracterizado por pomar implantado em área de maior altitude da propriedade, exposição norte, com frequências maior de ventos. As coletas foram realizadas pelo período da manhã e com no mínimo dois dias após a ocorrência de precipitação.

A metodologia utilizada para o isolamento foi a descrita por Olive & Kevin (2002), modificada. O material vegetal (folhas e frutos verdes) foi coletado e armazenado em caixas térmicas contendo gelo e levados até o laboratório. As folhas e os frutos verdes foram cortados em fragmentos de aproximadamente 5 cm e transferidos para frascos Erlenmeyer de 500 mL, com 300 mL de solução salina 0,85% autoclavada. Em seguida, os frascos Erlenmeyer foram submetidos ao ultrassom por 3 segundos. Posteriormente, os frascos foram transferidos para agitador orbital a 170 rpm, durante 20 minutos, para os frascos contendo fragmentos de folhas, e 30 minutos para os frascos com fragmento de frutos. Das suspensões resultantes (água de lavagem), foram retiradas alíquotas de 0,5 mL e distribuídas nos meios de cultura próprios para isolamento de fungos filamentosos e leveduras. Os microrganismos isolados foram repicados até a obtenção de colônia pura e então armazenados em tubos de ensaio com meio de cultura BDA inclinado, a temperatura de 4°C.

O meio de cultura utilizado para o isolamento dos fungos filamentosos foi o BDA acrescido de antibiótico estreptomicina 0,03g/L. Já o meio para isolamento de leveduras foi o meio Yeast Extract Peptone Dextrose - YEPD (Extrato de levedura 10g, Peptona 10g, Dextrose 20g, 1000 mL água destilada) com pH corrigido para 4,5 com ácido láctico.

### **3.3 Avaliação do potencial antagonístico *in vitro* dos isolados de microrganismos epifíticos à *Guignardia citricarpa***

Os experimentos foram elaborados com o objetivo de, inicialmente, realizar a seleção de antagonistas à *G. citricarpa* e, posteriormente, determinar os diferentes mecanismos de antagonismo envolvidos na interação. O pareamento de culturas foi o método utilizado para seleção de antagonistas e avaliaram-se o micoparasitismo, a antibiose e a competição como mecanismos de antagonismo. Todos os experimentos *in vitro* foram mantidos a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 12 horas (lâmpada fluorescente).

#### **3.3.1 Seleção de antagonistas**

Para realizar a seleção dos isolados epifíticos procedeu-se o confronto direto dos mesmos com o patógeno *G. citricarpa* através da metodologia do pareamento de culturas proposta por Bell *et al.* (1982) e Mariano (1993). Para a seleção de isolados de fungos filamentosos, em uma das extremidades de uma placa de Petri contendo meio CDA (cenoura 200g; dextrose 200g; ágar 20g; 1000 mL de água destilada), a 1 cm da borda, foi colocado um disco de 8 mm de meio contendo micélio e esporos de *G. citricarpa* e na outra extremidade da placa, a 1 cm da borda, um disco de 8 mm de meio BDA contendo micélio do isolado epifítico e as placas incubadas por sete dias.

Para a seleção de isolados de leveduras, um disco de 8 mm de meio contendo micélio e esporos de *G. citricarpa* foi colocado no centro de uma placa de Petri com meio CDA. Distantes dois centímetros do patógeno foram colocados os isolados de leveduras através de duas estrias, uma de cada lado do patógeno, com auxílio de uma alça de platina. As placas foram incubadas por quinze dias.

Decorrido o período de incubação, as avaliações para os isolados de fungos filamentosos foram realizadas de acordo com os critérios de Bell *et al.* (1982), que propõem notas para classificar o desempenho dos antagonistas. As notas obedeceram a uma escala de 1 a 5. A nota 1 representa o crescimento do antagonista por toda a placa de Petri; a nota 2, o crescimento do antagonista sobre 2/3 da placa. A nota 3 representa o crescimento até a metade da placa pelo antagonista e pelo patógeno. Na nota 4 o patógeno cresce sobre 2/3 da placa e na nota 5 o patógeno cresce por toda a placa de Petri. Para que os isolados epifíticos fossem considerados como antagonistas eficientes, estes deveriam, ao menos, restringir o crescimento do patógeno, com notas menor ou igual a 2. Os isolados com notas maior ou igual a 3 foram considerados como ineficientes. Além da escala de notas avaliou-se a capacidade de inibição do patógeno pela medida do diâmetro médio da colônia.

Para avaliar a capacidade antagônica dos isolados de levedura utilizou-se como critério a medida do diâmetro médio da colônia do patógeno. Foi considerado como antagonista, o isolado que restringiu significativamente o crescimento do patógeno, em relação ao controle. Os experimentos foram realizados com cinco repetições por isolado e o controle consistiu-se apenas do patógeno.

### **3.4 Determinação dos mecanismos de antagonismo**

#### **3.4.1 Avaliação *in vitro* da ação de micoparasitismo**

O experimento para avaliar o micoparasitismo dos isolados de fungos filamentosos à *G. citricarpa* foi realizado em triplicata, com base na metodologia descrita por Martins-Corder & Melo (1998), modificada. Inicialmente, no centro de uma placa de Petri contendo meio CDA foi colocado uma lamínula esterilizada e



coberta com uma fina camada de meio de cultura CDA. Após, um disco de meio de cultura de 8 mm contendo micélio de *G. citricarpa* foi colocado, a 1 cm da borda da placa e incubado por sete dias. Decorrido esse período foi colocado na outra extremidade da placa, um disco de meio de cultura BDA de 8 mm contendo micélio do isolado antagonista e incubado até o período em que ocorresse o contato entre a hifa de antagonista e a do patógeno. Decorrido o contato entre as hifas, a lamínula foi retirada da placa, colorida com corante Floxina 1% e observada em microscópio óptico, em aumento de 400 e 1000x e fotografada com câmera digital CyberShot H-1 Sony. Apenas os isolados que apresentaram, no teste de confronto direto, crescimento micelial sobre a colônia de *G. citricarpa*, participaram deste ensaio.

### **3.4.2 Avaliação da produção de enzimas hidrolíticas**

A produção de enzimas hidrolíticas foi determinada em meio líquido, com o objetivo de detectar e quantificar a produção de quitinase, protease e glucanase produzidas pelos isolados que se mostraram eficientes no antagonismo.

#### **3.4.2.1 Avaliação da atividade quitinásica e glucanásica em meio líquido**

A análise da atividade quitinásica e glucanásica foi baseada no método de Miller (1959), o qual mede a liberação de açúcares redutores a partir da hidrólise de quitina coloidal (Sigma®) e da laminarina (Sigma®), respectivamente, pelo uso de ácido dinitrosalicílico – DNS.

Primeiramente, os isolados fúngicos filamentosos foram crescidos em meio de cultura mineral Mandel & Reese (1960), modificado (peptona bacteriológica 0,1%;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,2%;  $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$  0,14%;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,03%; uréia 0,03%; glicose

3%;  $\text{CaCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  0,03%; micélio seco da *Cilindrocladium gracile* 0,5%; 100  $\mu\text{L}$  de solução de elemento traço, pH 6,0). O micélio seco de *C. gracile* foi obtido pela colocação de três discos de 8 mm de meio BDA contendo micélio do fungo, em frascos Erlenmeyer contendo 100 mL de meio BDA, incubados durante sete dias com agitação orbital (150 rpm). Após, o micélio foi filtrado em papel Whatman n° 1, seco em estufa a 70°C e triturado. A solução de elemento traço foi obtida a partir da solução de sais de Mandel & Reese (1960) (5%  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 1,5%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 1,4  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 2%  $\text{CaCO}_3$ ). Os isolados de levedura foram crescidos em meio Mineral suplementado com micélio seco da *C. gracile* 0,5% ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,7g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,3g;  $\text{MgSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0,5g;  $\text{FeSO}_4$  0,01g;  $\text{ZnSO}_4$  0,001g;  $\text{MnCl}_2$  0,001g; micélio seco da *C. gracile* 0,5%, 1000 mL de água destilada) (Hsu & Lockwood, 1975). Após o crescimento foi colocado 1 mL de meio de cultura em tubos Eppendorf e centrifugado por cinco minutos a 14000 rpm.

Para análise da atividade quitinásica e glucanásica colocaram-se, em tubo de ensaio, 100  $\mu\text{L}$  de amostra (sobrenadante do meio de cultura) e 550  $\mu\text{L}$  de tampão citrato de sódio 50 mg/mL pH 4,8 e, após homogeneização, foram colocados em banho-maria a 50°C. Em seguida foram adicionados 250  $\mu\text{L}$  de quitina coloidal 0,5% para avaliação da atividade quitinásica, 250  $\mu\text{L}$  de laminarina 0,5% para avaliação da atividade glucanásica, também à temperatura de 50°C, e incubados por uma hora. Após esse período, adicionou-se 1 mL de DNS (ácido 3,5 dinitrosalicílico 10,6 g; NaOH 19,8 g; 1416 mL de água destilada, dissolução a quente com posterior adição de 7,6 g de fenol (fundido a 50°C) e 8,3g de metabissulfito de sódio) ainda no banho-maria, seguido da adição de 100 $\mu\text{L}$  de glicose 0,5 mg/mL. Em seguida, a solução foi fervida por 5 minutos e, após resfriar, foram acrescentados 2 mL de água destilada e realizado a leitura em espectrofotômetro a  $\lambda = 545 \text{ nm}$ . O controle consistiu da

solução sem a adição de quitina coloidal, para a avaliação da atividade quitinásica, e de laminarina, para a avaliação da atividade glucanásica, à reação. Para determinação da atividade enzimática foi preparada uma curva de calibração com glicose nas concentrações de 0,0; 0,05; 0,1; 0,2; e 0,3 mg/mL.

Uma unidade de atividade enzimática (U) corresponde a liberação de 1  $\mu\text{mol}$  de glicose/mL/min.

#### **3.4.2.2 Avaliação da atividade proteásica em meio líquido**

A determinação da atividade proteásica foi baseada no método de Sarath *et al.* (1989) utilizando Azocaseína (Sigma®) 2% como substrato. Os isolados fúngicos filamentosos foram crescidos em meio de cultura Mineral de Mandel & Reese (1960), modificado, e os isolados de levedura foram crescidos em meio Mineral (Hsu & Lockwood, 1975). Primeiramente, o substrato foi dissolvido em água destilada e centrifugado a 14000 rpm, pelo período de 10 min. Em seguida, em um tubo Eppendorf de 1,5 mL foram colocados 150  $\mu\text{L}$  da amostra (sobrenadante do meio de cultura), juntamente com 250  $\mu\text{L}$  de azocaseína, misturado gentilmente e incubado em banho-maria a 25° por 30 min. Após, foi adicionado ácido tricloroacético 10%, para cessar a reação, e deixado descansar por 15 min. Decorrido esse período, foi centrifugado a 14000 rpm, por 5 min. Depois o sobrenadante foi transferido para outro tubo Eppendorf contendo 1,4 mL de NaOH 1M.

Foi preparado um branco para cada amostra, adicionando os mesmos reagentes da reação anterior na seguinte ordem: 1°) 150  $\mu\text{L}$  de Tampão Fosfato pH 6,2 (solução I: 31,2 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  em 1000 mL de água destilada; solução

II: 35,6 gde  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  em 1000 mL de água destilada; solução final: 920 mL da solução I e 80 mL da solução II); 2º) 150  $\mu\text{L}$  da amostra; 3º) 1,2 mL de ácido tricloroacético; 4º) 250  $\mu\text{L}$  de substrato; 5º) depois o sobrenadante foi transferido para outro tubo Eppendorf contendo 1,4 mL de NaOH 1M. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a  $\lambda = 440 \text{ nm}$ .

Uma unidade da atividade proteásica (U) foi definida como sendo a quantidade de enzima requerida para produzir uma absorbância de 1 unid/30 min, a  $\lambda = 440 \text{ nm}$  e a 25°C.

### **3.4.3 Avaliações *in vitro* de antibiose**

As avaliações da antibiose procederam-se pelos dos testes de filtrado de cultura e teste para avaliação da produção de metabólitos voláteis dos isolados antagonistas.

#### **3.4.3.1 Experimentos com filtrado de cultura**

##### **a) Crescimento dos isolados epifíticos antagonistas em meio líquido e obtenção de filtrados**

Três isolados de fungos filamentosos e dois isolados de levedura com ação antagonica comprovada foram utilizados para obtenção de filtrado de cultura. Três discos de cultura de 8 mm de diâmetro, contendo micélio de cada isolado de fungo filamentosos foram colocados para crescimento em frascos Erlenmeyers de 250 mL, contendo 50 mL de meio de cultura BD (batata 200 g; dextrose 20 g; 1000 mL de água destilada), durante sete dias, com agitação orbital (150 rpm). Os isolados de

levedura foram colocados em frascos Erlenmeyers de 250 mL, contendo 50 mL de meio de cultura YEPD, durante três dias, com agitação orbital, a 150 rpm.

Após a incubação, cada cultura foi filtrada por duas vezes em papel Whatman n° 1 esterilizado e então passada em membrana filtrante de acetato celulose com poros de 0,2 µm, por duas vezes, obtendo-se assim as fases líquidas denominadas de filtrados.

#### **b) Avaliação *in vitro* do efeito de filtrados de cultura sobre o crescimento de *Guignardia citricarpa***

O experimento foi realizado com base no protocolo de Feio *et al.* (2004). Discos de 5 mm de papel filtro esterilizados foram imersos no filtrado de cultura, secos ao ar e colocados em número de dois por placa, um de cada lado e à distância de 1 cm do disco de cultura de 8 mm de diâmetro de *G. citricarpa*.

A medida do diâmetro da colônia do fitopatógeno foi realizada, com auxílio de paquímetro, aos quinze dias após a colocação. Foram utilizadas seis repetições e o controle consistiu na utilização dos discos de papel filtro embebidos apenas no meio de cultura sem crescimento dos isolados testados.

#### **3.4.3.2 Avaliação *in vitro* da produção de metabólitos voláteis sobre o desenvolvimento de *Guignardia citricarpa***

Os experimentos para avaliação da produção de metabólitos voláteis foram realizados de acordo com metodologia de Dennis & Webster (1971), modificada. Um disco de 8 mm de meio contendo micélio e esporos de *G. citricarpa* foi colocado em um dos lados de uma placa de Petri com divisória ao meio. No outro lado da placa

foram colocados os isolados antagonistas. Para os isolados fúngicos filamentosos, colocou-se um disco de 8 mm de meio BDA contendo micélio e, para os isolados de levedura foram feitas estrias com o auxílio de uma alça de platina em meio YEPD. As placas foram vedadas com filme plástico PVC. Após a incubação por quinze dias foi efetuada a mensuração do diâmetro da colônia de *G. citricarpa*, com o auxílio de um paquímetro. Foram utilizadas seis repetições para cada tratamento e o controle consistiu apenas do patógeno.

### **3.4.3.3 Avaliação *in vitro* da competição por nutrientes**

#### **a) Detecção de sideróforos**

Para determinar a competição por nutrientes foi avaliada a produção de sideróforos pelos isolados antagônicos, através da técnica universal para detecção de sideróforos proposta por Schwyn & Neilands (1987). Inicialmente, todos os materiais utilizados para o desenvolvimento dos ensaios foram lavados com HCl 6M e, após, imersos em água deionizada por período de oito horas e enxaguados em água deionizada.

Os isolados de fungos filamentosos foram cultivados em meio de cultura BD (batata 200g; dextrose 20g; 1000 mL água destilada e deionizada), incubados por cinco dias. Os isolados de levedura foram cultivados em meio king B (peptona 20 g; glicerol 10 g; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,5 g; Mg SO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 1,5 g; 1000 mL de água destilada) (King *et al.*, 1954), por 72 h, sob agitação.

Após o período de incubação, foi retirado 0,5 mL do sobrenadante de cada isolado e centrifugado por 10 minutos, a 14000 rpm, em tubo Eppendorf. Em seguida, foi acrescentado 0,5 mL da solução indicadora de cromo azurol S (CAS). O

preparo da solução de CAS foi realizado da seguinte maneira: 1º) preparou-se solução com a mistura de 6 mL de solução de HDTMA (brometo de hexadeciltrimetilamônio) 10 mM a 30 mL de água; 2º) sob agitação foram acrescentados 1,5 mL de solução férrica ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  1 mM preparada em HCl 0,01N) e 7,5 mL de solução de cromo azurol S 2 mM; 3º) separadamente, foram dissolvidos 4,307 g de piperazina anidra em 20 mL de água e após dissolvida por completo foi acrescida de 6,25 mL de HCl; 4º) foi adicionado, a solução de piperazina, o restante dos componentes já preparados e o volume completado para 100 mL.

A mudança de cor da mistura de sobrenadante-indicador de azulada para amarelo-avermelhado, em um prazo de 15 minutos, indicou a produção de sideróforos pelos isolados.

### **3.5 Identificação dos isolados epifíticos antagonistas à *Guignardia citricarpa***

A identificação, em nível de gênero, dos fungos filamentosos foi realizada com base nos caracteres morfológicos. Apenas um isolado do gênero *Trichoderma* teve a espécie identificada, através da chave proposta por Gams & Bissett (1998).

### **3.6 Avaliação do desempenho do isolado de *Trichoderma koningii* Oudem. (1902) no controle biológico da pinta preta dos citros em pomar de bergamoteira cv. Montenegrina**

O isolado de *T. koningii* foi testado a campo, como agente de biocontrole da pinta preta dos citros. Optou-se por testar apenas esse isolado em condições de

campo, por apresentar rápido crescimento, alta esporulação e por motivos estruturais de trabalho, não sendo possível trabalhar com mais de um isolado. O experimento foi realizado, em pomar de bergamoteira cv. Montenegrina, enxertada sobre *Poncirus trifoliata*, com oito anos, espaçamento de 4 x 5 m, no município de Montenegro-RS, latitude 29° 38' 08" S e longitude 51° 28' 23.5" O, altitude de 100 m acima do nível do mar. A propriedade pertence ao citricultor Luis Laux, membro da Cooperativa Ecocitrus e do Grupo de Citricultura Ecológica - GCE.

O pomar está instalado sobre relevo plano, com quebra vento constituído por mata nativa. Os tratos culturais e o manejo fitossanitário do pomar seguem as descrições técnicas empregadas na produção agroecológica pela Ecocitrus. Entretanto, nos dois meses que antecederam o experimento não foi empregado nenhum tratamento fitossanitário, bem como durante o ensaio. O pomar apresenta histórico de alta incidência da doença PPC. O ensaio foi conduzido nos meses de junho a outubro de 2007.

### **3.6.1 Produção massal de *Trichoderma koningii***

O isolado de *T. koningii* foi multiplicado em placas de Petri de 15 cm de diâmetro, contendo meio de cultura BDA acrescido de antibiótico estreptomicina 0,03g/L, incubado por sete dias, a  $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$  e fotoperíodo de 24 horas para estimular a esporulação. Após a incubação, as placas de Petri foram raspadas com auxílio de espátula metálica esterilizada e lavadas com solução salina 0,85%, a fim de coletar micélio e esporos do fungo. Das raspagens obteve-se uma suspensão concentrada de esporos que foi armazenada em refrigeração por até quatro dias.



### **3.6.2 Preparo da suspensão de esporos de *Trichoderma koningii* para aplicação no campo**

A suspensão de esporos de *T. koningii* aplicada no campo foi obtida pela diluição em água da suspensão concentrada de esporos. Inicialmente, foi determinado o número de UFC/mL da suspensão concentrada de esporos pelo método de diluição serial, com quatro repetições. Após, foi ajustado para que a suspensão aplicada no campo apresentasse  $1 \times 10^7$  UFC/mL.

### **3.6.3 Aplicações de *Trichoderma koningii* em pomares de bergamoteira cv. Montenegrina**

O experimento consistiu na aplicação semanal do isolado de *T. koningii* sobre a copa das plantas, exceto nos períodos de precipitação pluviométrica. Foram realizadas 18 aplicações, com início no dia 06/06/2007 e término dia 08/10/2007. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com sete repetições. A unidade experimental foi definida como sendo uma planta de bergamoteira. A escolha das plantas de bergamoteira se deu por sorteio.

Com auxílio de pulverizador costal manual, foi aplicado na copa da planta, o volume de calda de 2,5 litros por planta de bergamoteira, volume necessário para atingir o ponto de escorrimento. O controle consistiu na aplicação de água destilada.

### **3.6.4 Avaliação da incidência e severidade da pinta preta do citros**

A incidência e a severidade da PPC foram avaliadas em frutos maduros. Para isso, coletaram-se todos os frutos do quadrante norte de cada planta e, estes foram

depositados em caixas devidamente identificadas. De cada caixa, foram amostrados, de forma aleatória, 10 frutos para a análise da incidência e da severidade. Optou-se por realizar a coleta no quadrante norte de cada planta, por este apresentar maior expressão dos sintomas da doença.

A incidência foi quantificada pela proporção de frutos que apresentavam, pelo menos, uma lesão na superfície da casca. Para fins de análise, foi utilizada a média dos valores da incidência de 10 frutos, resultando em sete valores médios de incidência para cada tratamento. A incidência foi expressa em porcentagem.

A severidade da doença foi determinada pela área com lesão no fruto, expressa em porcentagem, dos mesmos 10 frutos em que foi avaliada a incidência. Para tal, fotografou-se o lado com maior expressão dos sintomas da doença, de cada fruto, com câmera digital CyberShot H-1 Sony. Após, as imagens foram transferidas para um microcomputador e editadas no programa CorelDRAW 12, com o objetivo de padronizar as lesões presentes nos frutos, marcando tanto a área necrosada como o halo amarelado. Posteriormente à edição, as imagens foram processadas no programa *ASSESS*, a fim de quantificar a área do fruto com lesão. Para realizar as comparações entre os tratamentos, foram utilizados os valores de severidade de cada fruto, totalizando 70 valores para cada tratamento.

### **3.6.5 Dados Climáticos**

Os dados climáticos foram obtidos na Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária – Fepagro, Centro de Pesquisa de Fruticultura.

### **3.7 Análise estatística dos dados**

Os dados dos ensaios *in vitro* foram analisados através de One-Way ANOVA, com pós teste de Tukey 5%, utilizado o programa estatístico SPSS 16.

Para verificar a existência de diferenças estatísticas entre os dados de incidência e de severidade, empregou-se o teste não paramétrico de Mann-Whitney, uma vez que os dados apresentaram ausência de normalidade. A análise foi realizada no programa estatístico Bioestat 4.0.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Obtenção de isolados de *Guignardia citricarpa*

Com o isolamento foram obtidos cinco isolados de *G. citricarpa* a partir de folhas e sete isolados a partir de frutos. Segundo Baayen *et al.* (2002), *G. citricarpa* pode apresentar variações nas características da colônia, como a produção de diferentes pigmentos no meio de cultura e também diferenças na coloração da borda da colônia, podendo apresentar coloração escura ou clara. Como a literatura não relata a existência de diferenças entre isolados obtidos de folhas e de frutos, optou-se em não diferenciar os isolados quanto à sua origem no isolamento. Porém, com base nas características mencionadas por Baayen *et al.* (2002), os isolados de *G. citricarpa* foram catalogados em dois grupos morfológicos: o grupo 1, compreendendo os isolados que apresentaram coloração branca na borda da colônia, quando crescidos em meio de cultura CDA e o grupo 2, isolados com coloração escura na borda da colônia (Figura 1).

Para caracterização dos isolados, foram observadas as características das colônias, como coloração e taxa de crescimento, e também foram observadas as características dos picnídios que se encontravam no centro das lesões dos materiais vegetais que foram utilizados para o isolamento, conforme descrições realizadas por Feichtenberger *et al.* (1997) e Baayen *et al.* (2002). Além disso, foram observadas as características dos conídios e também das espermásias dos isolados, através de

microscópio óptico, e estas comparadas com as características de um isolado endofítico de *Guignardia mangiferae* A.J. Roy, cedido pelo Dr. João Lúcio de Azevedo, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”/USP. Todas as características observadas nos isolados obtidos neste trabalho, estavam de acordo com as descrições do fungo *G. citricarpa* realizada por Baayen *et al.* (2002).

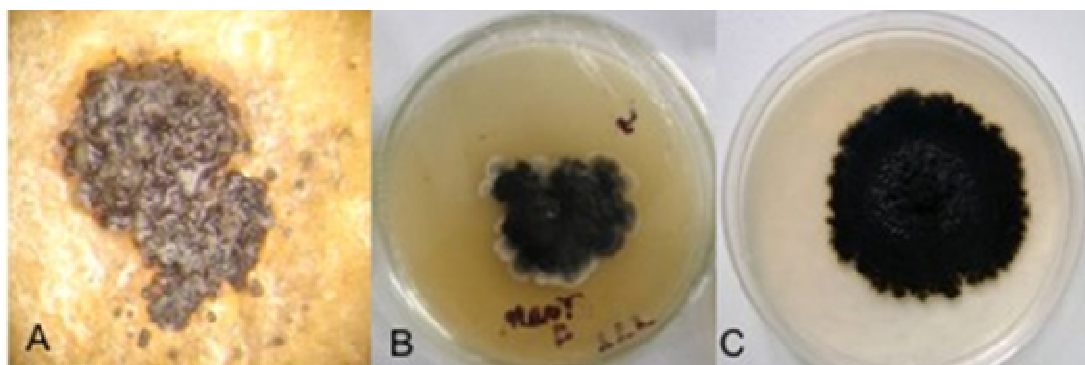


Figura 1: Detalhe do fungo fitopatogênico *Guignardia citricarpa*. (A) Picnídios crescendo sobre fragmento de casca de bergamoteira cv. Montenegrina, observado em microscópio estereoscópio, no aumento de 20 x; (B) Colônia de *G. citricarpa* pertencente ao grupo 1 (com coloração branca da borda da colônia); (C) Colônia de *G. citricarpa* pertencente ao grupo 2 (com coloração escura da borda da colônia). Porto Alegre, 2007.

Segundo Baayen *et al.* (2002) a morfologia da colônia de *G. citricarpa* é diferente da colônia do endófito cosmopolita *G. mangiferae*. Esses autores também relatam a presença de mucosidade sobre os conídios de *G. mangiferae* como uma diferença do o fungo *G. citricarpa*. No presente trabalho, não foi observada a presença de mucosidade na parede dos conídios dos isolados obtidos, entretanto, essa característica foi observada no isolado de *G. mangiferae*. Conforme Kiely (1948) a biologia e a ecologia de *G. mangiferae* diferem da de *G. citricarpa*. O fitopatógeno *G. citricarpa* não produz peritécios férteis sobre meio sólido (Kiely, 1948). Nos

isolados obtidos não foi observada a produção de peritécios, sendo que no isolado endofítico essas estruturas foram observadas.

Para determinar com precisão que os isolados obtidos neste estudo tratavam-se do fitopatógeno *G. citricarpa*, deveriam ter sido cumpridas todas as etapas relacionadas nos postulados de Koch. Todavia, não foram realizados testes de patogenicidade com os isolados obtidos neste trabalho. Entretanto, com o isolamento da lesão, tanto em folha como em fruto, e também pelos caracteres morfológicos, pode-se concluir que os isolados obtidos neste trabalho referem-se à *G. citricarpa*.

#### **4.2 Obtenção de microrganismos epifíticos de plantas de bergamoteira cv. Montenegrina**

A partir do isolamento foram obtidos 24 isolados de fungos filamentosos e 17 de leveduras, caracterizados em oito tipos morfológicos (Tabela 1). A identificação dos isolados de fungos filamentosos foi realizada por meio da taxonomia clássica, identificando até gênero, sendo que um isolado foi classificado até espécie, *Trichoderma koningii* Oudem (1902). Os isolados de levedura não foram identificados.

A predominância entre os isolados de fungos filamentosos foi de gêneros considerados patogênicos às plantas cítricas, como *Penicillium*, *Alternaria*, *Fusarium* e *Aspergillus*, representando 75%. A predominância desses gêneros reflete as condições fitossanitárias dos pomares onde foram realizadas as coletas, pois além da doença PPC, também apresentavam problemas como a morte das brotações e a mancha de *Alternaria*, causada por *Alternaria* spp., e problemas com *Penicillium* spp., como o bolor verde (Feichtenberger *et al.*, 1997; Timmer *et al.*, 2000).

Tabela 1. Tipos morfológicos de colônias de fungos filamentosos e de leveduras, obtidos a partir do filoplano de bergamoteiras cv. Montenegrina, localizadas no município de Montenegro/RS. Porto Alegre, RS, 2007.

<b>Microrganismos epifíticos</b>			
<b>Grupos</b>	<b>Características</b>	<b>Isolados</b>	<b>Identificação</b>
Grupo 1	Colônia branca, rápido crescimento	B1, B2	<i>Fusarium</i> spp.
		B3, B6, B7	Fungo não identificado
Grupo 2	Colônia branca, lento crescimento	B4, B5	Fungo não identificado
Grupo 3	Colônia branca, rápido crescimento, esporos verdes	TC1	<i>Trichoderma koningii</i>
Grupo 4	Colônia cinza, rápido crescimento	AL1, AL2, AL3	<i>Alternaria</i> spp.
Grupo 5	Colônia branca, rápido crescimento, esporos preto	AP4, AP1, AP2	<i>Aspergillus</i> spp.
Grupo 6	Colônia verde, rápido crescimento	P1, P2, P3, P4, P5, P6	<i>Penicillium</i> spp.
Grupo 7	Colônia rosa, rápido crescimento	R1, R2, R3, R4	<i>Fusarium</i> spp.
Grupo 8	Colônia creme opaca	Y1, Y2, Y3, Y4, Y5, Y6, Y7, Y8, Y9, Y10, Y11, Y12, Y13, Y14, Y15, Y16, Y17	Levedura não identificada

Sabe-se que algumas espécies do gênero *Penicillium* são utilizadas como agentes de controle biológico de insetos, como *Penicillium corylophilum* Dierckx (1901) (De Senna Nunes *et al.*, 2002), e também no controle biológico de doenças de plantas causadas por *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. (1881) e *Fusarium oxysporum* E.F. Sm. & Swingle, como o agente *Penicillium claviforme* Bainier (1905) (Ethur *et al.*, 2007). Todavia, devido à importância das doenças causadas nos citros por espécies desses gêneros, todos os isolados foram desprezados para os testes de seleção de antagonismo à *G. citricarpa*, até mesmo os isolados do gênero *Penicillium*, devido à falta de condições para identificação das espécies de todos os isolados.

O isolamento de apenas uma espécie do gênero *Trichoderma*, identificada como *T. koningii*, pode estar relacionado ao fato de este gênero ser mais comumente encontrado em ambientes de solo do que da parte aérea de plantas. Entretanto, isolados do gênero *Trichoderma* podem estar presentes tanto em ambientes relacionados ao filoplano (Lisboa *et al.*, 2007) como também no interior de plantas, assumindo forma endofítica, como foi verificado em trabalho realizado por Rubini (2003).

O ambiente do filoplano pode ser caracterizado como sendo um ambiente desfavorável para a microbiota epifítica, sendo que ocorrem rápidas alterações no potencial osmótico, no suprimento de água e de nutrientes, variações na temperatura e alterações na intensidade de radiação ultravioleta (Blakeman, 1985). Essas características podem explicar o baixo percentual de isolados do gênero *Trichoderma* obtidos neste trabalho.

O isolamento de fungos filamentosos que não produzem estruturas reprodutivas em meio sintético é frequente no estudo de microrganismos endofíticos



(Azevedo *et al.*, 2000; Pena, 2000; Rubini, 2003; Sartori, 2003). No presente trabalho foram observados isolados de fungos filamentosos sem esporulação, representando 20,83%. Em trabalho de isolamento de fungos filamentosos epifíticos de flores de macieira realizado por Sartori (2003), também foram encontrados grupos de fungos com crescimento micelial e sem esporulação, caracterizados como *Mycelia sterilia*, com frequência de isolamento de 14% em pomares orgânicos, 5% em pomares conduzidos sobre o sistema de produção integrada e 0% em pomares convencionais. Esses resultados sugerem que fungos filamentosos caracterizados como *Mycelia sterilia* também podem ser considerados como residentes de filoplano de plantas e que suas populações respondem negativamente a tratamentos fitossanitários como, por exemplo, a aplicação de fungicidas.

Com relação às leveduras epifíticas houve superioridade no número de isolados em comparação ao número de isolados de fungos filamentosos. Situação semelhante foi observada em trabalho realizado por Sartori (2003), no isolamento de microrganismos epifíticos de plantas de macieira, e também por Souza (2000), avaliando a diversidade microbiana em vinhedos orgânicos e convencionais no Rio Grande do Sul. A predominância de leveduras no filoplano pode ser explicada pela alta capacidade de competição por nutrientes que esses microrganismos apresentam (Bettiol, 1991). Segundo Valdebenito-Sanhueza (2000), há vários fatores que estão relacionados à boa adaptação das leveduras no filoplano, como a utilização dos componentes da cutícula, adaptação morfológica aos diferentes tipos de superfície (topografia do filoplano) dos vegetais e a tolerância aos poluentes, aos óleos essenciais de vegetais e às fitoalexinas.

### **4.3 Avaliação do potencial antagônico *in vitro* dos isolados de microrganismos epifíticos à *Guignardia citricarpa***

#### **4.3.1 Seleção de antagonistas**

Foram considerados para a seleção de antagonismo apenas os isolados de gêneros sem espécies fitopatogênicas à cultura dos citros. Entretanto, como não há relatos da existência de leveduras patogênicas aos citros, todos os isolados de levedura foram testados.

Apesar dos isolados de *G. citricarpa* obtidos neste trabalho terem mostrado algumas características distintas, optou-se, para fins de padronização por utilizar apenas os isolados pertencentes ao grupo 2 (coloração escura na borda da colônia) nos testes para seleção de antagonismo. Tal decisão foi tomada para otimizar o trabalho de seleção, reduzindo-se o número de unidades experimentais. Também, não há relatos na literatura que evidencie correlação entre características da colônia de *G. citricarpa* e o desempenho de agentes de controle biológico.

Dentre os seis isolados de fungos filamentosos testados, quatro apresentaram potencial antagônico, inibindo o crescimento do patógeno e/ou crescendo sobre a colônia do mesmo (Figura 2 e Tabela 2).

Além da escala de notas, também se optou por utilizar o diâmetro médio da colônia de *G. citricarpa*, para determinação mais precisa dos antagonistas promissores. Foi possível observar que o isolado de *T. koningii* apresentou rápido crescimento micelial, não possibilitando crescimento da colônia do fitopatógeno, no qual não ultrapassou o diâmetro inicial de 8 mm (Figura 3).

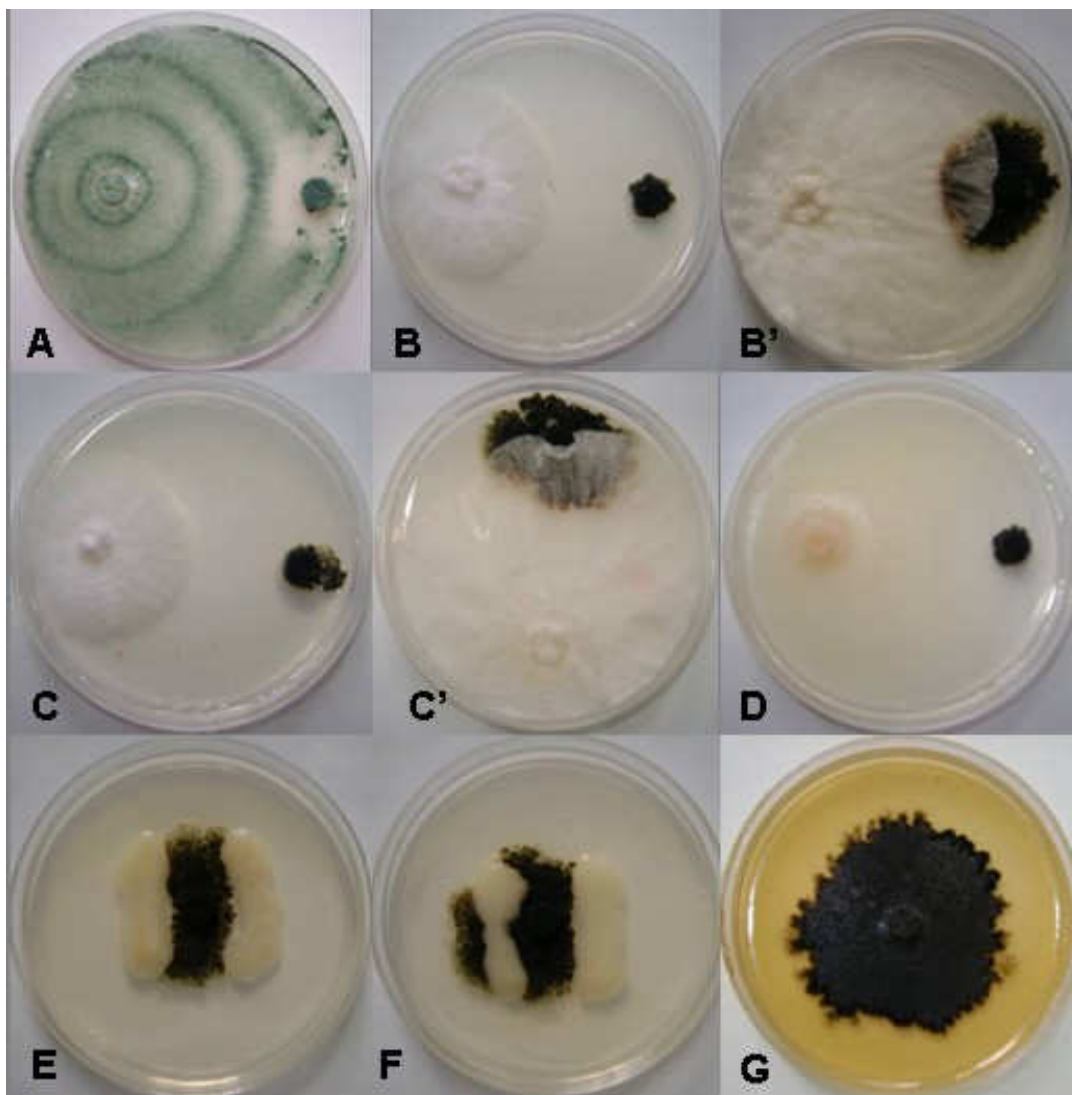


Figura 2. Pareamento de cultura dos isolados epifíticos de bergamoteira cv. Montenegrina com *Guignardia citricarpa*. (A) isolado de *Trichoderma koningii* sobrepondo colônia do patógeno após 4 dias da inoculação; (B e B') isolado B4 (colônia branca) mostrando crescimento micelial sobre a colônia do patógenos aos 15 dias da inoculação; (C e C') isolado B5; (D) isolado B3 limitando crescimento micelial do patógeno; (E) isolados de levedura Y7 restringindo crescimento do patógeno; (F) isolado de levedura Y3 com ausência de ação antagonista à *G. citricarpa*, mostrando crescimento micelial do patógeno sob área com presença de colônia; (G) colônia de *G. citricarpa*. Porto Alegre, RS, 2007.

Tabela 2. Desempenho dos isolados de fungos filamentosos epifíticos de bergamoteira cv. Montenegrina, conduzidas sob manejo orgânico, no confronto direto com *Guignardia citricarpa*, em placas de Petri. Porto Alegre, RS, 2007.

Grupo	Isolados epifíticos	Identificação	Nota <sup>1</sup>
Grupo 1	B3	Fungo não identificado	2
	B6		4
	B7		4
Grupo 2	B4	Fungo não identificado	1
	B5		1
Grupo 3	TC 1	<i>Trichoderma koningii</i>	1

<sup>1</sup> Escala de notas para avaliação do potencial antagonístico de microrganismos: 1 - crescimento do antagonista por toda a placa de Petri; 2 - crescimento sobre 2/3 da placa; 3 - crescimento até a metade da placa; 4 - crescimento do patógeno sobre 2/3 da placa; 5 - crescimento do patógeno por toda a placa de Petri (Bell *et al.*, 1982).

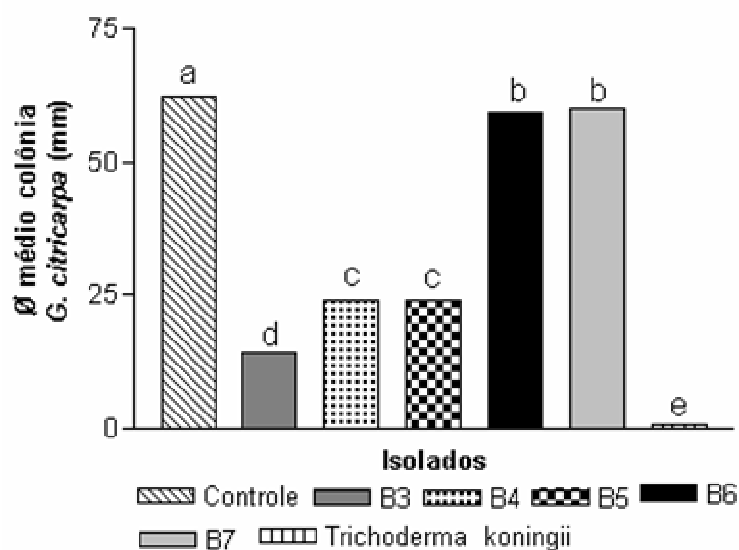


Figura 3. Diâmetro ( $\emptyset$ ) médio da colônia de *Guignardia citricarpa* quando contraposta com isolados de fungos filamentosos epifíticos de bergamoteira cv. Montenegrina, conduzidas sob manejo orgânico. A legenda se refere aos isolados. Barras seguidas de mesma letra não diferiram entre si pelo teste de Tukey 5%. Porto Alegre, RS, 2007.

Os isolados B4, B5 e também o isolado de *T. koningii* receberam nota 1, apresentando crescimento micelial sobre a colônia de *G. citricarpa*, indicando que o micoparasitismo pode ser um dos mecanismos envolvidos nessa interação antagônica. Embora esses três isolados tenham recebido a mesma nota, o isolado de *T. koningii* apresentou crescimento micelial extremamente rápido, sobrepondo à colônia do fitopatógeno em apenas quatro dias, não possibilitando crescimento micelial do fitopatógeno. A sobreposição da colônia do fitopatógeno pelos isolados B4 e B5 aconteceu somente após 15 dias do início do confronto. Com base no crescimento micelial do isolado de *T. koningii* é possível sugerir que o mesmo possua capacidade para um rápido estabelecimento quando aplicado sobre o filoplano, o que constitui-se em uma vantagem para o controle biológico, principalmente para o controle de fitopatógenos com crescimento lento, como é o caso de *G. citricarpa*. Todavia, é importante salientar que o desempenho de um agente de controle biológico *in vitro* não caracteriza sucesso nos resultados *in vivo*, em função das condições adversas que o filoplano apresenta (Bettiol, 1991; Mariano, 1993).

O isolado B3, que recebeu nota 2, não apresentou crescimento micelial sobre o fitopatógeno, apenas inibindo seu crescimento. Esse resultado indica que o isolado, nas condições trabalhadas, não apresentou capacidade de micoparasitismo, sugerindo a atuação de outros mecanismos na interação antagônica com *G. citricarpa*, como antibiose e competição.

Vários trabalhos têm demonstrado o potencial de espécies do gênero *Trichoderma* para serem utilizados no controle biológico de doença de plantas (Elad, 2000; Harman *et al.*, 2004; Xiao-Yan *et al.*, 2006; Lisboa *et al.*, 2007). Entretanto, há poucos estudos sobre a ação de *Trichoderma* sobre *G. citricarpa*. Rodrigues (2006)

observou ação antagonista de espécie do gênero *Trichoderma* sobre *G. citricarpa*, na qual o isolado reduziu o crescimento do fitopatógeno *in vitro*. Entretanto, o isolado de *Trichoderma* spp. testado naquele trabalho foi proveniente do ambiente solo e possivelmente presente baixa capacidade adaptativa às condições do filoplano, o que implica em maior incerteza quanto à sua eficiência se aplicado na parte aérea. Já em nosso trabalho, a obtenção de um isolado de *T. koningii* no filoplano de bergamoteira com capacidade antagonista comprovada à *G. citricarpa*, em testes *in vitro*, constitui uma inovação no desenvolvimento do controle biológico da doença PPC. Conforme Bettioli (1991), agentes de controle biológico nativos tendem a apresentar melhor desempenho em campo, quando comparados a agentes exóticos.

Dos isolados de leveduras testados, apenas os isolados Y7 e Y8 provocaram redução do crescimento de *G. citricarpa* (Figura 4). Os demais isolados não restringiram o crescimento do fitopatógeno, mostrando não haver nenhum mecanismo de antagonismo eficiente contra *G. citricarpa*, nas condições testadas.

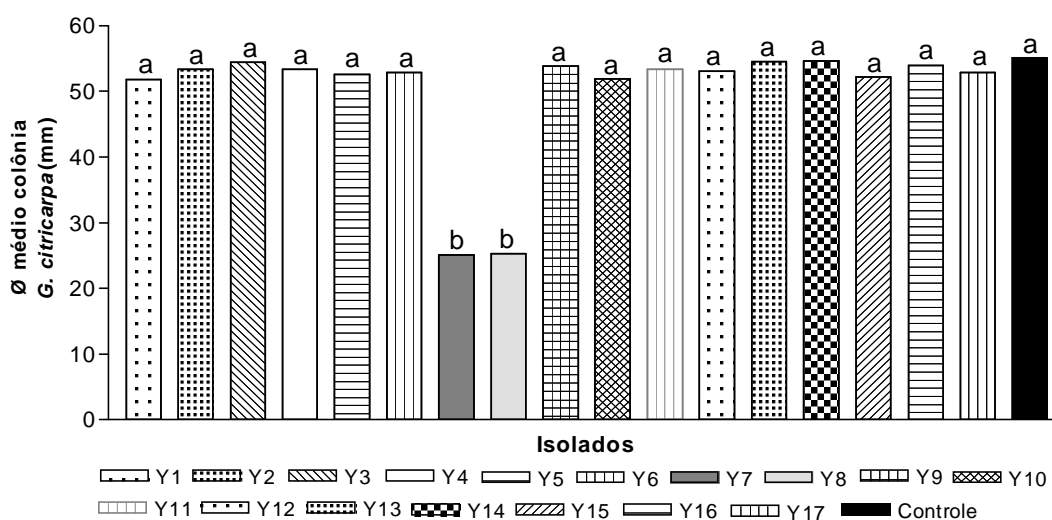


Figura 4. Diâmetro ( $\emptyset$ ) médio da colônia de *Guignardia citricarpa* quando contraposta com isolados de leveduras epifíticas de bergamoteira cv. Montenegrina, conduzidas sob manejo orgânico. A legenda se refere aos isolados. Barras seguidas de mesma letra não diferiram entre si pelo teste de Tukey 5%. Porto Alegre, RS, 2007.

A utilização de leveduras no controle biológico de fitopatógenos que afetam a parte aérea das plantas ou os frutos em pré ou pós-colheita tem sido demonstrada por vários autores (Droby *et al.*, 1991; Valdebenito-Sanhueza *et al.*, 2000). Segundo Valdebenito-Sanhueza *et al.* (2000), o principal mecanismo de ação utilizado pelas leveduras é a competição por espaço e nutrientes. Os resultados obtidos pelos isolados Y7 e Y8 sugerem que houve ação de competição por espaços e nutrientes com *G. citricarpa* (Figura 2), fato demonstrado pelo comportamento do patógeno, que apresentou crescimento micelial apenas na região onde não havia a presença de colônias dos isolados de levedura.

Além dos mecanismos de competição possivelmente desenvolvidos pelos isolados de levedura Y7 e Y8, outros mecanismos também podem estar envolvidos, como a presença de enzimas líticas. Wisniewski *et al.* (1991) sugeriram que a presença da atividade glucanásica em meios de cultura de leveduras, induzida por parede celular fúngica, estaria envolvida em antagonismo à fitopatógenos, uma vez que enzimas como glucanases e quitinases são relatadas como enzimas que degradam a parede celular de fungos (Stintzi *et al.*, 1993; Theis & Stahl, 2004).

#### **4.3.2 Avaliação *in vitro* da ação de micoparasitismo dos isolados epifíticos de fungos filamentosos antagonistas à *G. citricarpa***

Apenas os isolados de fungos filamentosos que mostraram crescimento micelial sobre a colônia de *G. citricarpa* participaram do ensaio para avaliar a ação de micoparasitismo, que foram os isolados B4, B5 e o de *T. koningii*. Com base na metodologia utilizada, não foram observadas evidências de interação direta de micoparasitismo dos isolados testados neste trabalho (Figura 5).

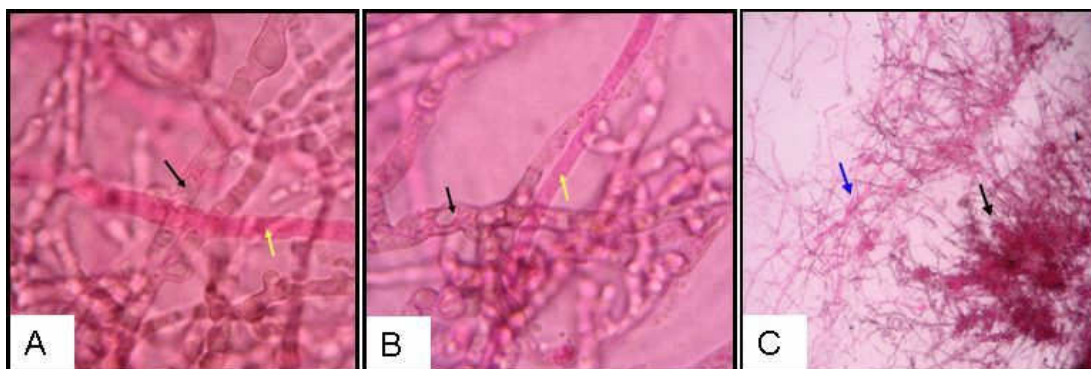


Figura 5. Análise em microscopia óptica da região de contato de hifas do fitopatógeno *Guignardia citricarpa* e de hifas de isolados de fungos filamentosos epifíticos de bergamoteira cv. Montenegrina antagonistas a *G. citricarpa*, conforme método de Martins-Corder & Melo (1998), modificado. Setas pretas indicam hifa do fitopatógeno e setas coloridas indicam hifas dos isolados antagonistas. (A) Hifas de *G. citricarpa* e do isolado de *Trichoderma koningii* (x100). (B) Hifas de *G. citricarpa* e do isolado B4 com crescimento paralelo (x100). (C) Região de contato entre hifas de *G. citricarpa* e do isolado B5 (x40). Porto Alegre, RS, 2007.

As observações em microscopia óptica revelaram o crescimento conjunto de hifas do fitopatógeno e dos isolados antagonistas. Todavia, não foi possível observar entrelaçamento e/ou perfurações das hifas dos isolados antagonistas nas hifas de *G. citricarpa*, o que comumente ocorre em observações de microscopia eletrônica de varredura (Harman *et al.*, 2004).

Segundo Boland (1990), a habilidade de antagonismo dos agentes de controle biológicos tem sido investigada nos últimos anos, como sendo processo essencial para a utilização racional das propriedades biológicas potencialmente envolvidas em interações de antagonismo, como por exemplo, os processos de micoparasitismo. Algumas espécies de *Trichoderma* têm recebido especial atenção por apresentar capacidade de competição com fungos fitopatogênicos, rápida taxa de crescimento micelial e antagonismo direto através do enrolamento de hifas e penetração, com secreção de antibióticos deletérios aos hospedeiros (Jeffries & Young, 1994). De



Marco *et al.* (2000) observaram o enrolamento de hifas de *T. harzianum* em hifas de *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer (1943), seguido de penetração, assim como El-Katany *et al.* (2001) também observaram resultados similares contra *Sclerotium rolfsii* Sacc. (1911) e Innocenti *et al.* (2003) com *Rhizoctonia cerealis* E.P. Hoeven (1977). Segundo Chet (1987), o micoparasitismo realizado por espécies de *Trichoderma* constitui-se em um processo complexo, no qual o antagonista cresce até o hospedeiro, enrolando-se em suas hifas e em alguns casos penetrando nelas.

Gupta *et al.* (1999) observaram vários modos de interação de hifas e redução do crescimento micelial do fitopatógeno *Botryodiplodia theobromae* Pat. (1892) com isolados de *Trichoderma* spp. e *Gliocladium virens* J.H. Mill., Giddens & A.A. Foster (1958). No entanto, esses autores não observam interação física entre as hifas do seu isolado de *T. koningii* e do fitopatógeno, não apresentando enrolamento na hifa nem penetração. Todavia, os autores observaram degradação da parede celular do fitopatógeno e atribuíram o fato à possível presença de enzimas hidrolíticas liberadas pelo antagonista, pois como relatado por Bell *et al.* (1982), logo que é sinalizado o contato com o patógeno, os genes envolvidos na produção de enzimas hidrolíticas do agente de biocontrole são ativados. Martins-Corder & Melo (1998) consideraram como interação de micoparasitismo não apenas o fenômeno de enrolamento de hifas e penetração, mas também o crescimento paralelo das hifas do antagonista e do patógeno, como também a formação de estruturas semelhantes a ganchos crescendo em direção às hifas do hospedeiro. Neste trabalho, não foi observado a formação de estruturas em forma de ganchos pelos isolados epifíticos testados, mas observou-se o crescimento paralelo de hifas. Diante disso, pode-se sugerir que interações de micoparasitismo possam ter ocorrido ente os isolados testados e *G. citricarpa*.

### 4.3.3 Avaliação da atividade quitinásica, glucanásica e proteásica em meio líquido

As atividades das enzimas quitinases, glucanases e proteases dos isolados epifíticos com potencial antagonista a *G. citricarpa* estão sumarizadas na tabela 3. Os isolados epifíticos que apresentaram maior atividade quitinásica foram os isolados B5 e B4 com 9,52 e 9,00 U, respectivamente. Já *T. koningii* e B3 apresentaram 2,02 e 1,57 U, respectivamente.

Tabela 3. Atividades quitinásica, glucanásica e proteásica dos isolados epifíticos de bergamoteira cv. Montenegrina, antagonistas à *Guignardia citricarpa*. Valores seguidos de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. Porto Alegre, RS, 2007.

ISOLADOS ANTAGONISTAS	ENZIMAS		
	Quitinase (U <sup>*</sup> )	Glucanase (U <sup>*</sup> )	Protease (U <sup>**</sup> )
<b>Fungos Filamentosos</b>			
<i>Isolado B5</i>	9,52 a	10,73 a	0,006 e
<i>Isolado B4</i>	9,00 a	10,45 a	0,042 c
<i>Isolado B3</i>	1,57 b	1,42 b	0,008 e
<i>Trichoderma koningii</i>	2,02 b	2,03 b	1,748 a
<b>Leveduras</b>			
<i>Isolado Y7</i>	1,19 b	1,12 b	0,047 b
<i>Isolado Y8</i>	1,18 b	1,13 b	0,029 d

\* Uma unidade da atividade enzimática (U) corresponde a liberação de 1 µmol de glicose/mL/min, a 50°C.

\*\* Uma unidade da atividade proteásica (U) foi definida como sendo a quantidade de enzima requerida para produzir uma absorbância de 1 unid/30 min, a  $\lambda = 440$  nm e a 25°C.

Pesquisas têm sugerido que a produção de enzimas quitinolíticas por isolados de *T. harzianum*, estejam diretamente relacionadas com atividades antifúngicas (Chet, 1987; Harman *et al.*, 1993). Em trabalho realizado por El-Katatny *et al.* (2000), observou-se correlação entre a atividade das enzimas quitinase e  $\beta$ -1,3-glucanase com a inibição de *S. rolfii* pelo isolado T24 de *T. harzianum* sugerindo o envolvimento dessas enzimas no processo de biocontrole.

No presente trabalho, observou-se considerável atividade quitinásica pelo isolado epifítico de *T. koningii*, expressando valores superiores aos encontrados por De Marco *et al.* (2003) ao avaliar a atividade quitinásica de isolados de *Trichoderma* spp., obtendo um máximo de 0,39 U. No entanto, comparando o resultado do isolado epifítico de *T. koningii* com os resultados encontrados por Elad & Kapat (1999), observa-se que o isolado epifítico apresentou menor atividade quitinásica que o isolado de *T. harzianum*, o qual apresentou o valor de 8,14 U. Apesar do isolado epifítico de *T. koningii* utilizado neste trabalho ter produzido cerca de  $\frac{1}{4}$  da atividade quitinásica do isolado utilizado no trabalho de Elad & Kapat (1999), o mecanismo de micoparasitismo parece estar envolvido na inibição de *G. citricarpa*, uma vez que o antagonista reduziu o crescimento micelial do patógeno e apresentou sobreposição micelial da colônia do mesmo.

Segundo Gooday (1971), em geral todos os organismos que contém quitina em sua constituição são produtores de quitinases, as quais são previamente requeridas para a morfogênese da parede celular. A produção da enzima requer, por parte do organismo, alto gasto energético. Esse fato pode explicar a baixa taxa de crescimento dos isolados epifíticos B5 e B4 nos testes de confronto *in vitro* com *G. citricarpa*, pois esses isolados apresentam alta atividade quitinásica, o que provavelmente acarreta em um alto gasto energético. Todavia, como não foi possível realizar a identificação desses isolados, também não foi possível realizar comparações com outros autores. Cabe salientar que apenas a verificação da atividade quitinásica de um dado isolado antagonista, não significa obrigatoriamente que desenvolva interações de micoparasitismo. Assim, estes resultados representam um primeiro passo na caracterização dos mecanismos de antagonismo envolvidos em uma interação antagônica, sendo necessário à caracterização dos tipos de quitinases.

Os isolados de leveduras apresentaram as menores atividades quitinásicas, com 1,19 U para o isolado Y7 e 1,18 U para o isolado Y8. A avaliação da produção de enzimas por leveduras que possam estar relacionadas ao biocontrole é pouco comum. Ting *et al.* (2008), ao analisar a atividade quitinásica do agente de controle biológico *Cryptococcus laurentii* (Kuff.), no controle de *Penicillium expansum* Link (1809), observou valores próximos a 8 U. Os autores comentam que o mecanismo de competição por espaço e nutrientes é o mais utilizado por *C. laurentii* em interações antagônicas com *P. expansum*. Todavia, sugerem que a alta atividade quitinásica observada pelo agente biocontrolador pode estar diretamente relacionada com o controle de *P. expansum*. Já no presente trabalho, a baixa atividade quitinásica dos isolados Y7 e Y8 pode sugerir que o principal mecanismo de antagonismo à *G. citricarpa* seja o mecanismo de competição por espaço e nutrientes. Porém, testes mais específicos devem ser realizados para confirmar essa hipótese.

A avaliação de atividade glucanásica dos isolados epifíticos apresentou comportamento semelhante à atividade quitinásica, com os isolados epifíticos B5 e B4 mostrando maior atividade glucanásica, seguidos dos isolados de *T. koningii* e B3. Os isolados Y7 e Y8 apresentaram menores atividades glucanásicas (Tabela 3).

O mecanismo antifúngico das glucanases está relacionado à digestão de  $\beta$ -glucanos da parede celular dos fungos (Theis & Stahl, 2004). As glucanases quebram os polissacarídeos responsáveis pela rigidez da parede celular dos fungos, conseqüentemente destruindo sua integridade (Howell, 2003). Elad & Kapat (1999) observaram produção de 0,74 U de atividade glucanásica, com isolados de *T. harzianum*. Já o isolado epifítico de *T. koningii* apresentou 2,03 U neste trabalho, podendo ser explicado pelo fato de que isolados de *Trichoderma* apresentam aumentos significativos na produção de  $\beta$ -1,3- glucanases quando crescidos em meio

de cultura suplementado com parede celular de fungos (Noronha & Ulhoa, 1996). Já os isolados epifíticos B5 e B4 apresentam valor de atividade glucanásica superiores ao resultado do isolado de *T. koningii*, o que vem a reforçar a explicação da baixa taxa de crescimento micelial pelos isolados epifíticos B4 e B5, em função do maior gasto energético.

A atividade proteásica dos isolados epifíticos neste trabalho não apresentou comportamento semelhante às atividades quitinásica e glucanásica. O isolado de *T. koningii* apresentou a maior atividade, com valor de 1,748 U. Elad & Kapat (1999) encontraram atividade proteásica de 0,06 U para o isolado T39 e 0,05 U para o isolado NCIM1185 de *T. harzianum*. Esses resultados mostram-se inferiores ao resultado obtido pelo isolado de *T. koningii* neste trabalho.

A produção de proteases é comum entre fungos, como os do gênero *Trichoderma* (Hagspiel *et al.*, 1989; Haab *et al.*, 1990; Manonmani & Joseph, 1993; Geremia *et al.*, 1993). Segundo Howell (2003), a ação das proteases tem sido relacionada ao biocontrole de *B. cinerea*, na qual as proteases atuam inativando as enzimas hidrolíticas produzidas pelo patógeno sobre folhas de feijoeiro. As proteases desempenham importante papel na degradação de proteínas da parede celular dos fungos, bem como atuam na quebra das enzimas hidrolíticas dos fitopatógenos, em cadeias de peptídeos e/ou aminoácidos, restringindo a efetividade do fitopatógeno em colonizar a planta (Rodriguez-Kabana *et al.*, 1978).

Dessa forma, os valores de atividade proteásica apresentados pelo isolado de *T. koningii* neste trabalho, reforçam a hipótese de que o mecanismo de micoparasitismo possa estar envolvido na interação antagônica com *G. citricarpa*.

Pode-se sugerir que a baixa atividade proteásica dos isolados epifíticos B5 e B4 também esteja relacionada com o seu lento crescimento micelial, uma vez que *G.*

*citricarpa* poderia secretar compostos tóxicos de natureza protéica no meio de cultura. Esses compostos poderiam retardar o avanço dos antagonistas, sendo que a atividade proteásica dos mesmos não seria suficiente para a degradação de parte protéica destes compostos tóxicos.

De maneira geral, o isolado epifítico B3 apresentou menor atividade enzimática, com exceção apenas da atividade proteásica, a qual o isolado epifítico B5 apresentou a menor atividade. Esses resultados podem ser relacionados com os resultados obtidos no teste de pareamento de culturas com *G. citricarpa*, no qual o isolado B3 foi pontuado com nota 2, não apresentando crescimento micelial sobre a colônia do patógeno. Segundo Duffy & Défago (1997), os fitopatógenos não se apresentam estáticos frente às estratégias utilizados pelos agentes de controle biológico. Segundo os autores, alguns fitopatógenos podem degradar compostos antimicrobianos produzidos por agentes de biocontrole, suprimindo temporariamente a ação antagonista. A hidroxilação de compostos de hidrocarbonetos constitui-se em uma estratégia que muitos fungos utilizam para eliminar metabólitos tóxicos (Kinderlerer, 1993). Assim, sugere-se que o baixo desempenho do isolado epifítico B3 no teste de pareamento possa estar relacionado às baixas atividades enzimática e/ou a algum mecanismo de detoxificação desenvolvido por *G. citricarpa*. Além da capacidade de detoxificação, muitos fungos fitopatogênicos apresentam a capacidade de produzir compostos tóxicos contra agentes de biocontrole (Duffy & Défago, 1997), como em trabalho relatado por Lewis & Lumsden (1995), no qual metabólitos produzidos por *Rhizoctonia solani* J.G. Kühn (1858) reduziram o crescimento micelial e a produção de conídios dos antagonistas *T. harzianum*, *Trichoderma hamatum* (Bonord.) e *T. viride*. A produção de vários tipos de micotoxinas também ocorre em defesa a antagonistas, com micotoxinas multifuncionais que protegem o

microrganismo contra antibióticos e stresses ambientais (Stormer *et al.*, 1998). Geralmente esses fenômenos ocorrem em fungos com crescimento lento (Lewis & Lumsden, 1995), como o patógeno *G. citricarpa*, mecanismos muitas vezes desenvolvidos como medida de adaptação, viabilizando o estabelecimento em condições hostis.

#### **4.3.4 Avaliações *in vitro* de antibiose**

##### **4.3.4.1 Experimentos com filtrado de cultura**

Dos filtrados de cultura testados apenas os filtrados dos isolados B3 e Y8 afetaram o crescimento micelial de *G. citricarpa*, com diferenças significativas ao controle (Figura 6).

A ação de antibiose ocorre durante interações envolvendo compostos difusíveis de baixo peso molecular produzidos pelos agentes de controle biológico, inibindo o crescimento dos fitopatógenos (Benítez *et al.*, 2004). Muitas espécies de *Trichoderma* produzem metabólitos antimicrobianos, como ácido harziânico, tricolin e peptaibols (Howell, 2003). Xiao-Yan *et al.* (2006) observou a produção de trichokomis por isolados de *T. koningii* SMF2, composto responsável pela redução do crescimento de vários fitopatógenos. Segundo Benítez *et al.* (2004), em alguns casos, a produção de antibióticos é correlacionada com a habilidade de biocontrole e o efeito do antibiótico purificado desempenha papel semelhante ao do antagonista. Wiest *et al.* (2002) observaram a produção de antibióticos peptaibols por isolado de *Trichoderma virens* Pers., associando o composto com o biocontrole de fitopatógenos, pela atuação em sinergismo com enzimas hidrolíticas. Dessa maneira,

os filtrados dos isolados B3 e Y8 mostraram a presença de compostos tóxicos para *G. citricarpa*, dentre as quais podem-se incluir os antibióticos.

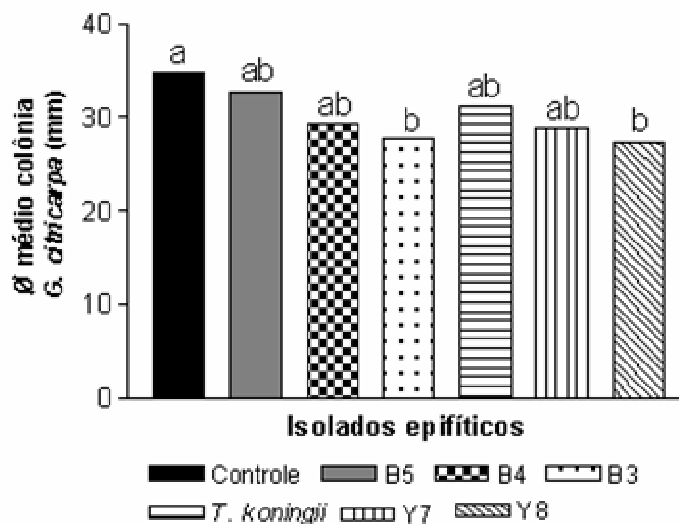


Figura 6. Diâmetro ( $\emptyset$ ) médio da colônia de *Guignardia citricarpa* quando inoculada juntamente com discos de papel filtro contendo filtrados de cultura dos isolados B5, B4, B3 e de *Trichoderma koningii*, e também de levedura Y7 e Y8, epifíticos de bergamoteira cv. Montenegrina, segundo método de Feio *et al.* (2004). A legenda se refere aos isolados. Barras seguidas de mesma letra não diferiram entre si pelo teste de Tukey a 5%. Porto Alegre, RS, 2007.

Segundo Droby *et al.* (1991) geralmente as leveduras não produzem antibióticos. Todavia, quando a levedura *Aureobasidium pullulans* (de Bary) foi submetida à condições de escassez de nutrientes, apresentou produção de antibióticos (Mc Cormack *et al.*, 1994). É possível que um único isolado de levedura possa produzir múltiplas toxinas em resposta a diferentes organismos (Walker *et al.*, 1995). Já a composição dos antibióticos produzidos pela levedura *Pseudozyma flocculosa* (Traquair, L.A. Shaw & Jarvis) é uma mistura de derivados de ácidos graxos, que afeta a permeabilidade da membrana celular do microrganismo, inibindo seu crescimento (Avis & Bélanger, 2001).

Fialho (2004) verificou o efeito de filtrado de cultura de uma linhagem CR-1 de *Saccharomyces cerevisiae* antagonica à *G. citricarpa*. No entanto, os resultados



demonstraram que o filtrado de cultura não foi capaz de reduzir o crescimento micelial do patógeno, sugerindo não haver presença de compostos antimicrobianos. Entretanto, o isolado de leveduras Y8 deste trabalho mostrou-se capaz de produzir compostos com efeito antifúngico à *G. citricarpa*.

Alem da produção de antibióticos, determinadas leveduras apresentam o fator “killer”, um peptídeo tóxico capaz de inibir o crescimento de outros microrganismos (Philliskirk & Young, 1975; Young, 1982). Segundo Walker *et al.* (1995), fungos filamentosos também podem ser suscetíveis às leveduras “killer”, estando *S. cerevisiae* e *Sporobolomyces roseus* Kluver & C.B. Niel (1924) entre as linhagens com maior potencial antagônico (Janisiewicz *et al.*, 1994). Diante disso, o isolado Y8 pode ter manifestado o fator “killer” no filtrado de cultura, sendo necessários estudos detalhados para verificar esse fenômeno.

#### **4.3.4.2 Avaliação *in vitro* da produção de metabólitos voláteis sobre o desenvolvimento de *G. citricarpa***

Foi possível observar que todos os isolados epifíticos de fungos filamentosos produziram metabólitos voláteis que interferiram negativamente no crescimento micelial de *G. citricarpa*, no entanto, os tratamentos com isolados de levedura não diferiram do seu controle (Figura 7). Embora os tratamentos com os isolados de fungos filamentosos não apresentaram diferenças significativas entre si, os isolados B4 e de *T. koningii* apresentaram a maior redução do crescimento micelial do patógeno.

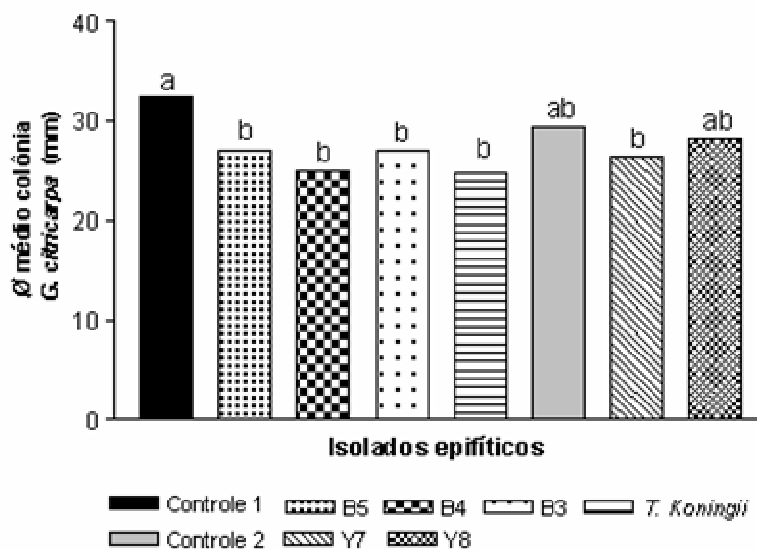


Figura 7. Efeito *in vitro* de compostos voláteis liberados pelos isolados epifíticos B5, B4, B3, *Trichoderma koningii*, Y7 e Y8 de bergamoteira cv. Montenegrina, sobre o diâmetro (Ø) médio da colônia de *Guignardia citricarpa*. Controle 1 - para fungos filamentosos; controle 2 - para leveduras. Barras seguidas de mesma letra não diferiram entre si pelo teste de Tukey a 5%. Porto Alegre, RS, 2007.

Segundo Wheatley (2002), uma ampla variedade de microrganismos produzem compostos voláteis. Strobel *et al.* (2001) identificaram cinco classes de compostos importantes nos gases voláteis micofumigantes, ésteres, cetonas, ácidos e lipídios. Wheatley (2002) referencia os compostos voláteis como bons sinalizadores químicos em interações microbianas pelo fato de apresentarem capacidade de alcançar longas distâncias. Vários compostos voláteis produzidos por gêneros de bactérias e fungos exercem efeitos deletérios sobre o crescimento *in vitro* de diversos fitopatógenos (Alstrom, 2001; Wheatley *et al.*, 1996).

Walker & Connick (1983) testaram, *in vitro*, o efeito das cinco classes de compostos voláteis produzidas pelo endófito *Muscodor albus* (Strobel & Hess) contra *Pythium ultimum* Trow, *R. solani*, *Phytophthora cinnamomi* Rands, *Verticillium dahliae* Kleb., *Fusarium oxysporum* f. sp. *betae* (Snyder & Hansen) e *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.). Os compostos foram capazes de matar todos os

fitopatógenos testados, com exceção de *F. oxysporum* f. sp. *betae*, que teve apenas seu crescimento reduzido. Stinson *et al.* (2003) observou o controle de *V. dahliae* pela ação de compostos voláteis produzidos por *M. albus* e *Muscodor roseus* (Strobel & Hess), sugerindo a utilização desses compostos em substituição ao brometo de metila para o controle de fitopatógenos de solo.

Dennis & Webster (1971) relatam que fungos como *T. viride* e *T. koningii* são eficientes produtores de metabólitos voláteis em meio de cultura. Os autores esclarecem que antibióticos voláteis atuam sobre os fungos através da inibição do crescimento micelial. No presente trabalho, foi observada a produção de compostos voláteis pelos isolados de fungos filamentosos, indicando que os antagonistas testados apresentam mais uma ferramenta no controle de *G. citricarpa* e que, nas condições trabalhadas, o mecanismo de antibiose também exerce influências em interações antagônicas com o patógeno.

Fialho (2004) observou a ação de compostos voláteis produzidos por três linhagens de *S. cerevisiae* sobre o crescimento de *G. citricarpa*, com a inibição do crescimento micelial do patógeno em até 59%. Os isolados de levedura Y7 e Y8 não produziram metabólitos voláteis tóxicos à *G. citricarpa*. Todavia, pode ter ocorrido a produção de compostos voláteis pelos isolados epifíticos de leveduras, mas que não tiveram efeitos deletérios sobre *G. citricarpa*. Segundo Duffy & Défago (1997), os compostos orgânicos voláteis produzidos pelos antagonistas podem agir como sinalizadores nos fitopatógenos, aumentando suas propriedades competitivas via indução de mecanismos de defesa, estruturais ou bioquímicos.

### **4.3.5 Avaliação *in vitro* da competição por nutrientes**

#### **4.3.5.1 Detecção de sideróforos**

A produção de sideróforos nos filtrados de cultura de todos os isolados de fungos filamentosos testados (Tabela 4 e Figura 8). A quantificação de sideróforos nos filtrados de cultura não foi realizada, entretanto, o isolado B3 apresentou menor intensidade na coloração amarelo-avermelhado, sugerindo menor produção de sideróforos, quando comparado com os demais isolados produtores. Já nos filtrados de cultura dos isolados de leveduras não foi detectada a produção de sideróforos.

Sideróforos produzidos por microrganismos podem apresentar diversas estruturas e variável nível de afinidade com o elemento Ferro III (Neilands, 1984). Os sideróforos também apresentam papel determinante no crescimento de microrganismos em ambientes em que o ferro mostra-se limitante (Neilands, 1993). A produção e a utilização de sideróforos por agentes de biocontrole podem atuar de forma direta na supressão de doenças pela redução da disponibilidade de ferro para o crescimento dos fitopatógenos e também indiretamente por aumentar a biossíntese de compostos antimicrobianos, devido ao aumento de elementos traços importantes nas rotas biossintéticas, como por exemplo, a produção de antibióticos (Duffy & Défago, 1999 apud Paz, 2005). Os sideróforos produzidos por rizobactérias também têm sido relatados como compostos que auxiliam no crescimento vegetal, capturando e transportando ferro para dentro das plantas (Neilands, 1993).

Tabela 4. Produção de sideróforos pelos isolados epifíticos de bergamoteira cv. Montenegro, antagonistas à *Guignardia citricarpa*. Porto Alegre, RS, 2007.

Isolados antagonistas	Produção*
<b>Fungos filamentosos</b>	
<i>Isolado B3</i>	+
<i>Isolado B4</i>	++
<i>Isolado B5</i>	++
<i>Trichoderma koningii</i>	++
Controle	-
<b>Leveduras</b>	
<i>Isolado Y7</i>	-
<i>Isolado Y8</i>	-
Controle	-

\*++: intensa coloração amarelo-avermelhado; +: moderada coloração amarelo-avermelhado; -: ausência de coloração amarelo-avermelhado.

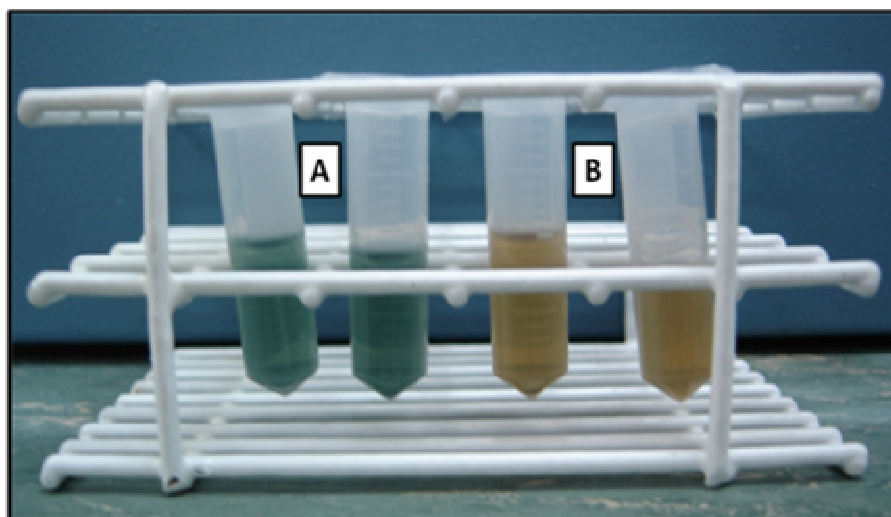


Figura 8. Detecção de sideróforos em filtrados de cultura dos isolados epifíticos de bergamoteira cv. Montenegro: (A) controle; (B) tratamento positivo. A coloração amarelada indica a presença de sideróforos. Porto Alegre, RS, 2007.

A produção de sideróforos por agentes de controle biológico tem sido relatada como um importante mecanismo no biocontrole de doenças de plantas (Riquelme, 1996), atuando no seqüestro de ferro do ambiente e, por meio disso, limitando o crescimento ou a atividade metabólica dos fitopatógenos (Loper & Buyer, 1991). Com a verificação da produção de sideróforos neste trabalho, pode-se

sugerir que os isolados produtores exerçam ação antagonista à *G. citricarpa*, sem que seja necessário o contato direto entre hifas. Também é possível sugerir que a ação dos sideróforos no filoplano de bergamoteira possa inibir a germinação dos ascósporos e conídios do fitopatógeno.

Sendo assim, os isolados de fungos filamentosos mostraram-se como potenciais competidores pelo nutriente ferro, acrescentando esta característica aos demais mecanismos de antagonismo contra *G. citricarpa* já detectados neste trabalho. Isso sugere que os isolados trabalhados apresentam potencial satisfatório para serem utilizados como agentes de controle biológico de *G. citricarpa*, pois Lorito *et al.* (1993), Someya *et al.* (2001) e Woo *et al.* (2002) sugerem que o sinergismo entre diferentes mecanismos de antagonismo é crucial no controle de doenças de plantas *in vivo*. Como há enorme variação na disponibilidade de nutrientes no filoplano, inclusive de ferro (Bettiol, 1991), os isolados que produziram sideróforos podem apresentar condição vantajosa de estabelecimento no filoplano de bergamoteiras, quando utilizados de forma massal em programas de controle biológico.

Embora nas condições trabalhadas não tenha sido verificado a produção de sideróforos pelos isolados de leveduras, Calvente *et al.* (1999) relatam que sideróforos produzidos por isolados de *Rhodotorula glutinis* (Fresen.) exercem importante papel no controle biológico da podridão azul causada por *P. expansum* em pós-colheita de maçã.

#### **4.4 Avaliação do desempenho do isolado de *Trichoderma koningii* no controle biológico da pinta preta dos citros em pomar de bergamoteira cv. Montenegrina**

O isolado epifítico de *T. koningii* apresentou efeito significativo na redução da incidência ( $p = 0,0073$ ) e da severidade ( $p < 0,0001$ ) da PPC, nos frutos de bergamoteira cv. Montenegrina, em relação ao controle. No Box plot (Figura 9) podemos observar que o tratamento com o isolado epifítico de *T. koningii* apresentou os menores valores de incidência, com mediana de 80, e de severidade, com mediana de 1,86. Assim, com a aplicação do agente biocontrolador obteve-se redução de 18,58 % na incidência e 63,82 % na severidade.

A bergamoteira cv. Montenegrina inicia o processo de mudança da cor de seus frutos a partir da ocorrência de temperaturas baixas. Com o início do processo de maturação, o patógeno *G. citricarpa* torna-se mais ativo e temperaturas médias entre 20 e 25° C favorecem a expressão dos sintomas da PPC (Sutton & Waterston, 1966). Schmidt (2003) observou incremento no percentual de frutos de bergamoteira cv. Montenegrina com sintomas de PPC, em temperaturas médias entre 20 e 25 ° C.

No presente trabalho, os frutos apresentaram completa mudança de cor nos meses de agosto, setembro e outubro, quando as temperaturas médias mensais apresentaram-se entre 12,5, 18,7 e 20,5°C, respectivamente (Figura 10). Apesar das temperaturas médias mostrarem-se abaixo das temperaturas mencionadas como sendo ideais para o aparecimento da doença, os sintomas da PPC foram expressos nos frutos.

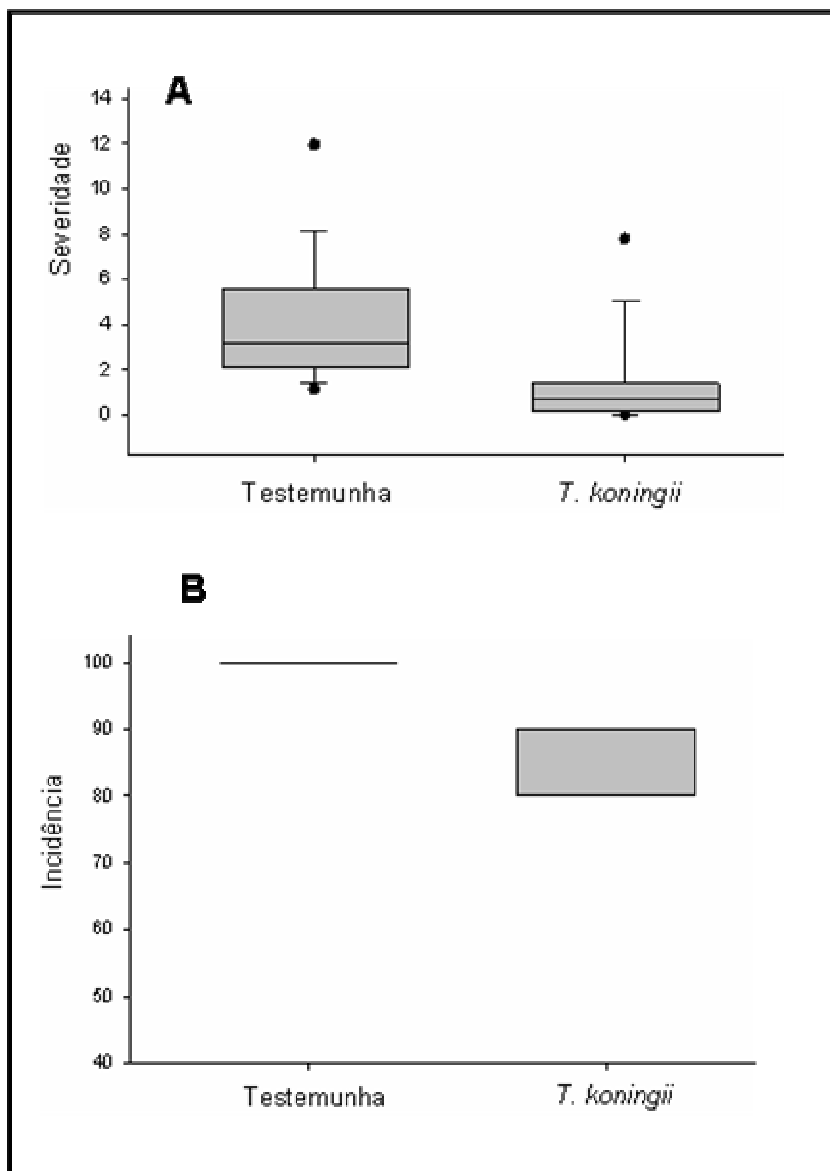


Figura 9. Box plot para os valores de severidade (A), no qual  $n = 70$ , e incidência (B), com  $n = 7$ , em porcentagem, da pinta preta dos citros, em frutos de bergamoteira cv. Montenegrina, tratadas com e sem o agente biocontrolador epifítico *Trichoderma koningii*. Linha no Box indica o valor da mediana. Linha superior do Box representa o quartil superior (75%). A linha inferior do Box representa o quartil inferior (25%). As linhas externas ao Box representam os percentis superior (95%) e inferior (25%). Os pontos representam os valores extremos da distribuição. Porto Alegre, RS, 2007.



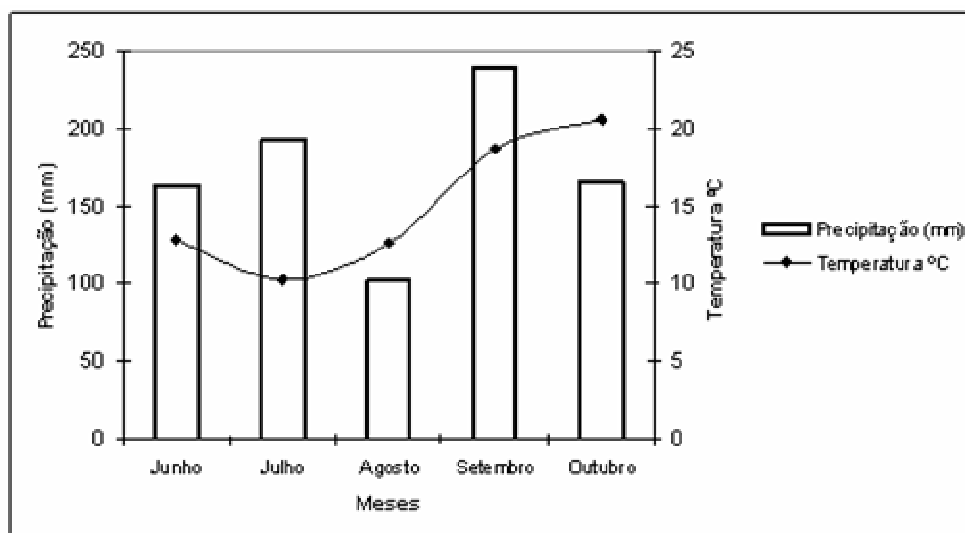


Figura 10. Valores médios mensais de precipitação pluviométrica (mm) e temperatura (°C), nos meses de junho a outubro de 2007. Dados climáticos obtidos pela Fepagro - Estação Agrometeorológica do Centro de Pesquisa de Fruticultura do Município de Taquari – RS. Porto Alegre, RS, 2007.

A determinação precisa do início do período de suscetibilidade é um fator chave no manejo de doenças de plantas. Segundo Kotzé (1981), o período crítico de suscetibilidade dos frutos para a PPC ocorre desde a fase de chumbinho até cerca de seis meses após a queda das pétalas. Já para Fundecitrus (2000), o período de suscetibilidade da doença começa no estágio de 2/3 das pétalas caídas e termina cerca de 42 dias após esse evento. Neste trabalho, as aplicações com o agente de biocontrole iniciaram com o fruto em estágio de chumbinho e seguiram até o momento da colheita dos frutos. Assim, como não há consenso entre o início do período de suscetibilidade, pode ter ocorrido a infecção de alguns frutos antes das aplicações do agente biocontrolador. Aceita essa hipótese, pode-se sugerir que com aplicações mais precoces pode-se ter uma melhor proteção dos frutos e, conseqüentemente, reduzir os índices da doença.

Com a redução da doença proporcionada pelo isolado epifítico de *T. koningii*, sugere-se que esse agente de biocontrole auxilia positivamente no manejo da PPC,

nos pomares de bergamoteira cv. Montenegrina, conduzidos sob o manejo orgânico empregado pela Cooperativa Ecocitrus. Como a Ecocitrus destina grande parte da produção de bergamotas à fabricação de suco, a utilização do isolado epifítico de *T. koningii* pode ser uma importante ferramenta no manejo da PPC, uma vez que é aceitável a presença de lesões nos frutos, diferentemente dos frutos destinados ao mercado de frutas frescas, que apresenta uma relação inversamente proporcional entre a presença de lesões nos frutos e o valor de mercado. Como o agente biocontrolador reduziu a severidade, também é possível sugerir que reduza a queda prematura de frutos, causada pela alta severidade nos mesmos. Todavia, como não foi monitorada a queda de frutos, sugerem-se mais estudos para avaliar o parâmetro e também avaliações para determinar o nível máximo de severidade que o fruto suporta até a sua queda. Schmidt (2003) observou associação positiva entre severidade da PPC e o aumento na queda de frutos de bergamoteira cv. Montenegrina.

A redução da severidade da PPC nos frutos, promovida pelo isolado epifítico de *T. koningii*, pode representar em um ganho no número de frutos com padrão para o mercado de frutas frescas. Segundo relatos da Ecocitrus, frutos com poucas lesões podem ser destinados para o consumo *in natura*, sem que ocorra rejeição por parte dos consumidores. Sabe-se que existem barreiras fitossanitárias para frutos com lesões de PPC, principalmente para o mercado europeu. Todavia, para o mercado interno as barreiras fitossanitárias permitem a comercialização de frutos com lesões, em regiões em que a doença encontra-se estabelecida. Dessa maneira, frutos com baixo índice de severidade podem ser destinados ao mercado de frutas frescas e, assim, agregar maior valor de mercado.

No presente trabalho, o agente de controle biológico não foi comparado com tratamento padrão (fungicida) para o controle da PPC, devido ao fato de que no manejo orgânico não é permitido o uso de fungicidas sintéticos. A comparação do biocontrolador com a calda bordalesa não foi realizada pela falta de condições estruturais. No entanto, como a calda bordalesa vem sendo bastante utilizada nos últimos anos para o manejo de doenças, segundo relato de técnicos da Ecocitrus, já há indício de acumulação de cobre nos solos dos pomares de citros, e o desenvolvimento de estratégias para a eliminação gradativa do produto faz parte dos objetivos do Grupo de Citricultura Ecológica - GCE.

Tem sido frequente o uso de algumas espécies do gênero *Trichoderma* para controle de doenças de plantas. A utilização do isolado T39 de *T. harzianum* para o controle biológico de *B. cinerea* (Elad, 1994; O'Neill et al., 1996) e também para o controle de doenças do pepineiro em casa de vegetação, têm sido relatado com sucesso (Elad, 2000; Elad & Shtienberg, 2000). Segundo Elad (1996), o controle biológico de patógenos envolve vários mecanismos de ação, sendo que os mais estudados são o micoparasitismo, a competição e a antibiose.

O micoparasitismo pode apresentar um importante papel em uma relação de antagonismo, no qual o biocontrolador com suas enzimas hidrolíticas degrada a parede celular dos fungos fitopatogênicos, impedindo o desenvolvimento de epidemias. No presente trabalho, não foi possível observar, *in vitro*, evidências de interação direta de micoparasitismo do isolado epifítico de *T. koningii* sobre *G. citricarpa*. Todavia, pode-se sugerir que nas condições do filoplano de bergamoteira cv. Montenegrina, onde condições de escassez de nutrientes são comuns, possa ter ocorrido o micoparasitismo do isolado de *T. koningii* sobre *G. citricarpa*. Cabe ressaltar que *in vitro* foi observado o crescimento paralelo de hifas de *T. koningii*

com hifas de *G. citricarpa*, sendo um indicativo de que o micoparasitismo possa ocorrer nessa interação.

Outro fator que sugere a ação de micoparasitismo do agente biocontrolador sobre *G. citricarpa*, em condições do filoplano, diz respeito à presença de atividade quitinásica, glucanásica e proteásica do antagonista, sendo que o isolado de *T. koningii* apresentou a maior atividade proteásica, quando comparado com os demais isolados antagonistas testados. Segundo Rodriguez-Kabana *et al.* (1978), também pode ocorrer a inativação das enzimas dos fitopatógenos por proteases produzidas pelos agentes de biocontrole, evitando assim a penetração dos patógenos nos hospedeiros. Elad & Kapat (1999) observaram que sobre filoplano, o isolado T 39 de *T. harzianum* produziu proteases, as quais reduziram a germinação de *B. cinerea* e conseqüentemente o desenvolvimento da doença.

A hipótese de que a redução dos índices da PPC, pelo isolado epifítico de *T. koningii*, possa ter ocorrido pelo mecanismo de competição é aceitável. Como esse agente biocontrolador apresentou produção *in vitro* de sideróforos, pode-se sugerir que também tenha ocorrido sua produção no filoplano de bergamoteira cv. Montenegrina e que tenham reduzido a fonte de ferro, indisponibilizando o elemento para o metabolismo de *G. citricarpa*, conseqüentemente reduzindo o crescimento do patógeno.

Para Lorito *et al.* (1993), é provável que ocorra um sinergismo entre os mecanismos de antagonismo, no qual o micoparasitismo, a antibiose e a competição possam atuar conjuntamente contra um fitopatógeno. Entretanto, Elad (2000) menciona que em muitos dos casos de interação antagonística, apenas parte dos mecanismos possam atuar. Assim, estudos mais aprofundados se fazem necessários

para a determinação dos mecanismos que estão envolvidos na redução da PPC, pelo isolado epifítico de *T. koningii*.

No presente trabalho, não foi realizada a comparação do isolado epifítico de *T. koningii* com outros agentes biocontroladores, isolados de ambientes distintos ao filoplano de bergamoteira cv. Montenegrina. Todavia, podemos inferir que o fato de utilizar um agente de controle biológico selecionado no próprio ambiente em que será utilizado para o manejo de doenças, constitui-se em um fator positivo. A seleção local de agentes biocontroladores, além de apresentar inúmeras vantagens para o controle biológico de doenças de plantas, apresenta-se como uma ferramenta importante para auxiliar na soberania tecnológica dos citricultores ecológicos da região do Vale do Caí. Uma vez que essa tecnologia possa ser apropriada pelos citricultores, é possível selecionar constantemente novos agentes biocontroladores, não apenas para o controle da PPC, mas também para outras doenças importantes como a seca das brotações causada por *Alternaria* spp., a podridão floral causada por *Colletotrichum acutatum* J.H, entre outras. Além disso, a bios prospecção de agentes biocontroladores de doenças de plantas pode ser considerada como de baixo custo, quando comparada com outros processos de desenvolvimento de produtos fitossanitários, como por exemplo, os quimioterápicos.

Com a verificação de existência de microrganismos epifíticos de bergamoteiras cv. Montenegrina é possível empregar outras estratégias diferentes do controle biológico clássico, com a constante aplicação massal de agentes biocontroladores. Conhecendo o agente de controle biológico e sua biologia, pode-se realizar práticas de manejo que proporcionem o aumento da população desses microrganismos a níveis suficientes para realizar o controle biológico natural de

determinado fitopatógeno, fazendo com que as aplicações massais possam ser reduzidas.

A utilização apenas do isolado epifítico de *T. koningii*, neste ensaio, deveu-se ao fato do gênero *Trichoderma* ser amplamente empregado no controle biológico de doenças de plantas e, também, porque apresentou atividade *in vitro* de vários mecanismos de antagonismo. Os demais isolados de antagonistas selecionados também apresentaram mais de um mecanismo de antagonismo, todavia, algumas restrições predominaram para que não fossem utilizados nos testes de campo. Dentre as restrições estão a falta de identificação dos isolados, a falta de métodos efetivos para multiplicação massal dos isolados apenas com crescimento micelial, e a falta de estrutura para desenvolvimento de mais de um tratamento no campo.

Porém, muitos trabalhos de controle biológico de doenças de plantas têm conseguido êxito com a ação conjunta de agentes de controle biológico, podendo resultar em uma ação sinérgica entre os antagonistas, maior plasticidade dos agentes frente às condições climáticas, e levar a um melhor controle de fitopatógenos. Dal Soglio (1995) verificou que o controle biológico de *R. solani*, na rizosfera de plantas de Soja (*Glycine max* L.), foi mais efetivo com a combinação do isolado B 153-2-2 de *Bacillus megaterium* com o isolado Th 008 de *T. harzianum*, do que cada antagonista separadamente. Diante disso, mais estudos devem ser realizados com o objetivo de agrupar outros agentes biocontroladores ao isolado epifítico de *T. koningii* e, assim, aumentar a eficácia do controle biológico da PPC.

A estratégia de misturar vários agentes de biocontrole mostra-se de suma importância para a sustentabilidade de um programa de controle biológico de doenças de plantas, sem que haja o desenvolvimento de um superantagonista, evitando assim, a simples substituição de um agrotóxico químico sintético por um

agente de biocontrole, e também a seleção de raças de patógenos com capacidade de defesa aos biocontroladores.

## 5 CONCLUSÕES

Baseado nas condições em que este trabalho foi realizado, pode-se concluir que:

- Existem fungos filamentosos e leveduras epifíticas de plantas de bergamoteira cv. Montenegrina antagonista à *G. citricarpa*,
- Os microrganismos epifíticos testados desenvolveram vários mecanismos de antagonismo à *G. citricarpa*;
- O isolado epifítico de *Trichoderma koningii* mostra-se um agente biocontrolador da PPC, em pomares de bergamoteira cv. Montenegrina, conduzidas sob manejo orgânico;



## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho evidenciou a possibilidade da realização de bioprospecção de microrganismos epifíticos de plantas de bergamoteira cv. Montenegrina, antagonistas à *G. citricarpa*, e com potencial para o controle da PPC. Desse modo, torna-se possível o desenvolvimento de um programa de controle biológico para a PPC, em pomares de citros orgânico na região dos Vales do Caí e Taquari. Além disso, ressalta-se a viabilidade econômica de um programa dessa natureza, pois é possível implementá-lo sem o aporte de grandes investimentos financeiros. Também, o processo de multiplicação desses agentes de controle biológico pode ser gerenciado pelos próprios citricultores, através da construção de biofábricas para suprir a demanda local.

O desenvolvimento de formulações com vários antagonistas para o controle da PPC é outra linha de pesquisa a ser implementada. Essa perspectiva pode contribuir para aumentar o nível de controle da doença, evitar que ocorra pressão de seleção de raças do patógeno com capacidade de defesa aos agentes biocontroladores, favorecendo a sustentabilidade do sistema.

Com este trabalho, torna-se necessário a continuidade das investigações que envolvem o controle biológico da PPC. A determinação de parâmetros como o momento mais adequado para início da introdução dos agentes biocontroladores e a frequência das aplicações, mostra-se indispensável para a efetividade do sistema,

bem como, para otimizar a mão-de-obra dos agricultores familiares. Estudos sobre a dinâmica populacional dos agentes de biocontrole também podem auxiliar no desenvolvimento de técnicas de manejo que proporcionem o aumento das populações dos antagonistas nos pomares, sem a necessidade de constantes aplicações.

## 7 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS

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

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

ALSTROM, S. Characteristics of bacteria from oilseed rape in relation to their biocontrol activity against *Verticillium dahliae*. **Journal of Phytopathology**, Berlim, v.149, n. 2, p. 57-64, 2001.

ANUSUYA, D.; SULLIA, S. B. The antibiotic effect of culture filtrates of some soil fungi on rhizobial growth in cultures. **Plant Soil**, Bangalore, v. 77, n. 2-3, p. 87-390, 1984.

ARAÚJO, W.L.; LIMA, A.O.S.; AZEVEDO, J. L.; MARCON, J.; SOBRAL, J.K.; LAÇAVA, P.T. **Manual de isolamento de microrganismos endofíticos**. Piracicaba : Dep. Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da USP, 2001. 75p.

AVIS, T.J.; BÉLANGER, R.R. Specificity and mode of action of the antifungal fatty acid cis-9-heptadecenoic acid produced by *Pseudozyma flocculosa*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.67, n. 2, p.956-960, 2001.

AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI JR., W.; PEREIRA, J.O.; ARAÚJO, W.L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, v. 3, n. 1, p. 40-65, 2000.

BAAYEN, R. P.; BONANTS, P. J. M.; VERKLEY, G.; CARROLL, G. C.; VAN der Aa, H. A.; WEERDT, M. de; VAN BROUWERSHAVEN, I.R.; SCHUTTE,G.C.; MACCHERONI Jr., W.; de BLANCO,C.G.; AZEVEDO,J.L. Nonpathogenic isolates of citrus black spot fungus, *Guignardia citricarpa*, identified as a cosmopolitan endophyte of woody plants, *G. mangiferae* (*Phyllosticta capitalensis*). **Phytopathology**, Davis, v. 92, n. 5, p. 464-477, 2002.

BALDASSARI, R.B.; GÓES, A. de; SANTOS, J.M. dos; TIMOSSI, A.J. Microscopia eletrônica de varredura de isolados de *Guignardia citricarpa* obtidos de plantas cítricas. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 27. n. 1, p. 88-92, 2001.

BELL, D.K.; WELLS, H.D.; MARKHAM, C.R. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. **Phytopathology**, Davis, v. 72. n.4, p. 79-382, 1982.

BENITE, AM.C.; MACHADO, S.P.; MACHADO, B.C. Sideróforos: “uma resposta dos microrganismos”. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 6b, p. 1155-1164, 2002.

BENÍTEZ, T.; RINCÓN, A.M.; LIMÓN, M.C.; CODÓN, A.C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strain. **International Microbiology**, Barcelona, v.7, n. 4, p.249-260, 2004.

BETTIOL, W. Biocontrole na filosfera: problemas e perspectivas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.5, p. 59-97, 1997.

BETTIOL, W. Controle biológico de doenças do filoplano. In: BETTIOL, W. (Ed.) **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA, 1991. p. 33-52.

BLAKEMAN, J P. Ecological succession of leaf surface microorganisms in relation to biological control. In: BIOLOGICAL control of the phylloplane. Local da publicação : Annual Phytopathology Society, 1985. p. 6-30.

BODDY, L.; WIMPENNY, J. W. T. Ecological concepts in food microbiology. **Journal of Applied Bacteriology**, Ireland, v. 73, n. 2, p. 235-385, 1992.

BOLAND, G. J. Biological control of plant diseases with fungal antagonists: challenges and opportunities. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Burnaby, v.12, p. 295-299, 1990.

BRODRICK, H. T.; RABIE, C. J. Light and temperature effects on symptom development and sporulation of *Guignardia citricarpa* Kiely, on *Citrus sinensis* (Linn.) Osbeck. **Phytophylactica**, Pretoria, v.2, p. 157-64, 1970.

BULTREYS, A.; GHEYSEN, I.; MAIRATE, H. Characterization of fluorescent and nonfluorescent peptide siderophores produced by *Pseudomonas syringae* strains and their potential use in strain identification. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n.4, p. 1718-1727, 2001.

CALVENTE, V.; ORELLANO, M.E.; SANSONE, G.; BENUZZI, D.; TOSETTI, M.I.S. Effect of nitrogen source and pH on siderophore production by *Rhodotorula* strains and their application to biocontrol of phytopathogenic moulds. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Somerset, v. 26, p. 226-229, 2001.

CHET, I. **Innovative Approaches to Plant Disease Control**. New York: John Wiley & Sons, 1987. p. 137-160.

CHET, I.; INBAR, J. Biological control of fungal pathogens. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Riverside, v 48, p. 37 - 43, 1994.

CHET, I.; INBAR, J.; HADAR, I. Fungal antagonists and mycoparasites. In: WICKLOW, D.T.; SÖDERSTRÖM, B. (eds) **The Mycota IV: Environmental and microbial relationships**. Berlin : Springer-Verlag, 1997. 184p.

COOK, R.J.; BAKER, K.F. **The nature and practice of biological control of plant pathogens**. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1983. 539p.

CULLEN, D.; ANDREWS, J. H.. Evidence for the role of antibiosis in the antagonism of *Chaetomium globosum* to the apple scab pathogen, *Venturia inaequalis*. **Canadian Journal of Botany**, Guelph, v.62, p. 1819-1823, 1984.

DAL SOGLIO, F. K. **Effect of soil pH and temperature on the biological control of *Rhizoctonia solani* by *Bacillus megaterium* and *Trichoderma harzianum***. [Chicago] : University of Illinois, 1995. 165 f. Thesis (Doctor of Philosophy) – University of Illinois, [Chicago], 1995.

DAL SOGLIO, F.K.; ABIB, E.N.; BONINE, D.P. O Grupo de Citricultura Ecológica: aprendendo com a participação **Agriculturas**, Rio de Janeiro, v. 3, n. 4, p. 11-14, 2006.

DE MARCO J.L.; LIMA L.H.C.; VALLE DE SOUZA M.; FELIX, C.R. A *Trichoderma harzianum* chitinase destroys the cell wall of the phytopathogen *Crinipellis pernicioso*, the causal agent of witches broom disease of cocoa. **World Journal of Microbial Biotechnology**, Hull, v. 16, n. 4, p. 383–386, 2000.

DE MARCO, J.L.; VALADERES-INGLIS, M.C.; FELIX, C.R. Production of hydrolytic enzymes by *Trichoderma* isolates with antagonistic activity against *Crinipellis pernicioso*, the causal agent of witches broom of cocoa. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 34, p. 33-38, 2003.

DE SENNA NUNES, M.; DA COSTA, G. L.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; SOUZA, E. J. Avaliação *in vitro* dos fungos *Aspergillus flavus* e *Penicillium corylophilum* em larvas de *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). **Parasitologia Latino Americana**, Santiago, v.57, n.3-4, p. 134-140, 2002.

DELGADO, J.J.; MORENO, M.M.A.; BENÍTEZ, T. Glucose uptake in *Trichoderma harzianum*: role of *gtt1*. **Eukaryotic Cell**, San Francisco, v.2, n. 4, p. 708-717, 2003.

DEMAIN, A.L. Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Munster, v. 52, n. 4, p. 455-463, 1999.

DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. II - Production of volatile antibiotics. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v.57, p. 41- 48, 1971.

DROBY, S.; CHALUTZ, E.; WILSON, C.L. Antagonistic microorganisms as biological control agents of postharvest diseases of fruits and vegetables. **Postharvest News and Information**, Oxon, , v.2, p.169-173, 1991.

DUFFY, B.K.; DÉFAGO, G. A *Fusarium* pathogenicity factor blocks antibiotic biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains. **Phytopathology**, Davis, CA, v. 87, p.26, 1997.

EISENDLE, M.; OBEREGGER, H.; BUTTINGER, R.; ILLMER, P.; HAAS, H. Biosynthesis and uptake of siderophores is controlled by the Pac mediated ambient-pH regulatory system in *Aspergillus nidulans*. **Eukarotic Cell**, San Francisco, v.3, p. 561-563, 2004.

ELAD, Y. Biological control of foliar pathogens by means of *Trichoderma harzianum* and potential modes of action. **Crop Protection**, Bet Dagan, v.19, n 8-10, p. 709-714, 2000.

ELAD, Y. Biological control of grape grey mould by *Trichoderma harzianum*. **Crop Protection**, Bet Dagan, v. 13, p.35-38, 1994.

ELAD, Y. Mechanisms involved in the biological control of *Botrytis cinerea* incited diseases. **European Journal of Plant Pathology**, Bet Dagan , v.102, n. 8, p. 719-732, 1996.

ELAD, Y. *Trichoderma harzianum* T39 preparation for biocontrol of plant diseases control of *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum* and *Cladosporium fulvum*. **Biocontrol Science and Technology**, Bet Dagan, v. 10, n. 4, p. 499 – 507, 2000.

ELAD, Y.; KAPAT, A. The role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea*. **European Journal of Plant Pathology**, Bet Dagan, v. 105, n. 2, p. 177–189, 1999.

EL-KATANY M.H.; GUDEL J.M.; ROBRA, K-H; ENAGHY, M.A.; GUBITZ, G.M. Characterization of a chitinase and an endo-1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum* Rifae T24 involved in control of the phytopathogen *Sclerotium rolfsii*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 56, n. 1-2, p. 137–143, 2001.

EL-KATANY, M.H.; SOMITSCH, W.; ROBRA, K.H.; EL-KATATNY, M.S.; GÜBITZ, G.M. Production of chitinase and beta-1,3-glucanase by *Trichoderma harzianum* for control of the phytopathogenic fungus *Sclerotium rolfsii*. **Journal of Food Technology and Biotechnology**, Graz, v.38, p. 173–180, 2000.

ETHUR, L. Z.; BLUME, E.; MUNIZ, M. F. B.; FLORES, M. G. V. Seleção de antagonistas fúngicos a *Fusarium solani* e *Fusarium oxysporum* em substrato comercial para mudas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, p. 1801-1804, 2007.

FEICHTENBERGER, E.; MÜLLER, G.W.; GUIRADO, N. Doenças dos citros (*Citrus* spp.). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. (Ed.) **Manual de fitopatologia**. 3ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. v. 2., p. 261- 296p.

FEICHTENBERGER, E.; SPÓSITO, M.B. Doenças fúngicas dos citros: manejo integrado. **Visão Agrícola**, Piracicaba, v. 2, p. 44-47, 2004.

FEIO, S.S.; BARBOSA, A.; CABRITA, M.; NUNES, L.; ESTEVES, A.; ROSEIRO, J.C.; CURTO, M.J.M. Antifungal activity of *Bacillus subtilis* 355 active against wood-surface contaminant fungi. **Journal of Industry Microbiology and Biotechnology**, Lisboa, v. 31, n. 5, p. 199-203, 2004.

FIALHO, M.B. **Efeito in vitro de *Saccharomyces cerevisiae* sobre *Guignardia citricarpa*, agente causal da pinta preta dos citros**. Piracicaba : ESALQ, 2004. 60f. Dissertação (Mestrado em Agronomia - Microbiologia agrícola) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

FUNDECITRUS. **Manual técnico sobre Pinta Preta**. Araraquara: Fundo Paulista de Defesa da Agricultura, 2000. 10p. (Boletim Técnico, Edição especial).

GAMS, W.; BISSETT, J. Morphology and identification of *Trichoderma*. In: KUBICEK, C. P.; HARMAN, G. E. (Ed.) ***Trichoderma & Gliocladium***. London: Taylor & Francis, 1998. v. 1, p. 3-34.

GEREMIA, R.A.; GOLDMAN, G.H.; JACOBS, D.; ARDILES, W.B.; VILLA, S.; MONTAGU, M.V.; HERRERA-ESTRELLA, A. Molecular characterization of the proteinase-encoding gene *prb1*, related to mycoparasitism by *Trichoderma harzianum*. **Molecular Microbiology**, Gent, v.8, p. 603 - 613, 1993.

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

GIMENEZ, A.B.; BREJO, F.J.G.; ROSELLO, J.; SANTAMARINA, M.P. Investigación y detección de metabolitos fúngicos com actividad bactericida, fungicida e insecticida. **Phytoma**, Valencia, v. 121, p. 132-135, 2000.

GOES, A. de. Controle da mancha-preta dos frutos cítricos. **Laranja**, São Paulo, v. 9, p. 293-304, 1998.

GOES, A. de Efeito da combinação de fungicidas sistêmicos e protetores no controle da mancha preta dos frutos cítricos causada por *Guignardia citricarpa*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 28, p. 9-13, 2002.

GOES, A. de.; GRAÇA, J.; BARROS, J. C. S. M; PINHEIRO, J. E. Controle da pinta preta em frutos de tangerina Rio (*Citrus deliciosa*) ocasionada por *Phyllosticta citricarpa* (*Guignardia citricarpa*). **Fitopatologia Brasileira**, Jaboticabal, v.15, n. 1, p. 73-75, 1990.

GOES, A. de; BARROS, J. C. S.M. de; GRAÇA, J.; CASTRO, N. G.; MARTINS, S. P. Determinação da época de produção de infecções latentes produzidas por *Phyllosticta citricarpa* em frutos de tangerina “Rio”. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 16., 1991, Rio de Janeiro. **Resumos...** Rio de Janeiro, 1991. p.34.

GÓES, A. de.; GRAÇA, J.; BARROS, J. M. de; PINHEIRO, J. E. Controle da pinta preta em frutos de tangerina “ Rio”(Citrus deliciosa) ocasionada por *Phyllosticta citricarpa*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 21, 1988, Salvador. **Resumos ...** Salvador, 1988. p. 122

GOODAY, G.W. An audioradiographic study of hyphal growth of some fungi. **Journal of Genetic Microbiology, local de publicação**, v.67, p. 125 - 133, 1971.

GUPTA, V. P.; TEWARI, S.K.; GOVINDAIA, H.; BAJPAI, A.K. Ultrastructure of mycoparasitism of *Trichoderma*, *Gliocladium* and *Laetisaria* species on *Botryodiplodia theobromae*. **Journal of Phytopathology**, Mysore, v.147, n. 1, p. 19-24, 1999.

HAAB, D.; HAGSPIEL, K.; SZAKMARY, K.; KUBICEK, C.P. Formation of the extracellular protease from *Trichoderma reesei* QM 9414 involved in cellulase degradation. **Journal of Biotechnology**, Vienna, v.16, n. 3-4, p. 187 – 198, 1990.

HAGSPIEL, K.; HAABDANDKUBICEK, C.P. Protease activity and proteolytic modification of cellulase from a *Trichoderma reesei* QM 9414 selectant. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Vienna, v. 32, n. 1, p. 61 – 67, 1989.

HARMAN, G.E. Myths and dogmas of biocontrol-changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. **Plant Disease**, Geneva, v. 84, n. 4, p. 377-393, 2000.

HARMAN, G.E.; HAYES, C.K.; LORITO, M.; BOADWAY. R.M.; DI PIETRO, A.; PETERBAUER, C.; TRONSMO, A. Chitinolytic enzymes of *Trichoderma harzianum*: purification of chitobiosidase and endochitinase. **Phytopathology**, Davis, CA, v.83, p. 313-318, 1993.

HARMAN, G.E.; HOWELL, C.R.; VITERBO, A.; CHET, I.; LORITO, M. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews**, Geneva, v.2, p. 3-56, 2004.

HENIS, Y.; CHET, I. Microbiological control of plant pathogens. **Advances in Applied Microbiology**, Madison, v. 19, p. 85-111, 1975.

HOWELL, C.R. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 87, p. 4-10, 2003.

HSU, S.C.; LOCKWOD, J.L. Powdered chitin agar as a selective medium for enumeration of actinomycetes in water and soil. **Applied Microbiology**, Michigan, v.29., n. 3 , p. 422-426, 1975.

INNOCENTI, G.; ROBERTI R.; MONTANARI, M.; ZAKRISSOM, E. Efficacy of microorganisms antagonistic to *Rhizoctonia cerealis* and their cell degrading enzymatic activities. **Mycological Research**, Bologna, v.107, p. 421 – 427, 2003.



JANISIEWICZ, W. J.; PETERSON, D. L.; BORS, R. Control of storage decay of apples with *Sporobolomyces roseus*. **Plant Disease**, Saint Paul, v.78, n.5, p. 466-470, 1994.

JEFFRIES, P.; YOUNG, T.W.K. **Interfungal parasitic relationships**. Cambridge: University Press, 1994. 296p.

KIELY, T.B. Preliminary studies on *Guignardia citricarpa* n. sp.: The ascigerous stage of *Phoma citricarpa* McAlp. and its relation to black spot of citrus. **Proceedings of Linnean Society of New South Wales**, Kingsford, v. 73, p. 249-292, 1948.

KINDERLERER, J.L. Fungal strategies for detoxification of medium chain fatty acids. **International Biodeterioration and Biodegradation**, England, v.32, n 1-3, p. 213-224, 1993.

KING, E.O.; WARD, M.K.; RANEY, D.E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, Orlando, FL., v.44, n. 2, p. 301-307, 1954.

KOTZÉ, J. M. Epidemiology and control of citrus blackspot in South África. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 65, p. 945-950, 1981.

KOTZÉ, J. M. History and epidemiology of citrus. **Proceedings of International Society of Citriculture**, Saint Paul, v. 2, p. 1296-1299, 1996.

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

KOTZÉ, J.M. **Studies on the black spot disease of citrus caused by *Guignardia citricarpa* Kiely, with particular reference to its epiphytology and control at Letaba**. Pretoria : University of Pretoria, 1963. 143f. Thesis (Doctor) - University of Pretoria, Pretoria, 1963.

LAST, F. T. Seasonal incidence of *Sporobolomyces* on cereal leaves. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v. 38, n. 3. p. 221-229, 1955.

LAUX, L. **Pinta preta dos citros na região do Vale do Caí**. Montenegro-RS, 17 de abr. 2006. Anotações de campo.

LEWIS, J.A.; LUMSDEN, R.D. Do pathogenic fungi have the potential to inhibit biocontrol fungi? **Journal of Phytopathology**, Beltsville, v.143, n. 10, p. 585-588, 1995.

LINDOW, S. E.; BRANDL, M. T. Microbiology of the phyllosphere. **Applied and Environmental Microbiology**, Albany, v.69, n. 4, p. 1875-1883, 2003.

LINTHORST, H.J.M.; MELCHERS, L.S.; MAYER, A.; VAN ROEKEL, J.S.C.; CORNELISSEN, B.J.C.; BOL, J.F. Analysis of gene families encoding acidic and basic *b*-1,3 glucanases of tobacco. **Proceeding of National Academy of Science of USA**, Leiden, v.87, p. 8756–8760, 1990.

LISBOA, B.B.; BOCHESI, C.C.; VARGAS, L.K.; SILVEIRA, J.R.P.S.; RADIN, B.; DE OLIVEIRA, A.M.R. Eficiência de *Trichoderma harzianum* e *Gliocladium viride* na redução da incidência de *Botrytis cinerea* em tomateiro cultivado sob ambiente protegido. **Ciência Rural**. Santa Maria, v. 37, p. 1255-1260, 2007.

LOPER, J.E.; BUYER, J.S. Siderophores in microbial interactions on plant surfaces. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Corvallis, v.14, p. 5-13. 1991.

LORITO, M.; DI PIETRO, A.; HAYES, C.K.; WOO, S.L.; HARMAN, G.E. Antifungal, synergistic interaction between chitinolytic enzymes from *Trichoderma harzianum* and *Enterobacter cloacae*. **Phytopathology**, Beltsville, v. 83,n. 7, p.721-728, 1993.

MANDEL, M.; REESE, E. T. Induction of cellulase in fungi by cellobiose. **Journal of Bacteriological**, Natick, v. 79, p. 816, 1960.

MANONMANI, H.K.; JOSEPH, R. Purification and properties of an extracellular proteinase of *Trichoderma koningii*. **Enzyme Microbiology and Technology**, Mysore, v.15, n. 7, p. 624–628, 1993.

MARIANO, R.L.R. Métodos de seleção *in vitro* para o controle microbiológico de patógenos de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.1, p. 369-409, 1993.

MARTIN, J.F.; DEMAIN, A. L. Control of antibiotic biosynthesis. **Microbiology Review**, Madison, , v. 44, n. 2, p. 230-251, 1980.

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

MC CORMACK, P.J.; WILDMAN, H.G.; JEFFRIES, P. Production of antibacterial compounds by phylloplanne inhabiting yeasts and yeast-like fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.60, n. 3, p.927-931, 1994.

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

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

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Natick, v.31, n. 3, p. 426 - 429, 1959.

MORRIS, C. G.; ROUSSE, D. I. Role of nutrients in regulating epiphytic bacterial populations. In: WINDELS, C. E.; LINDOW, S. E. **Biological control on the phylloplane**. St Paul : The American Phytopathological Society, 1985. p. 63-82.

NEILANDS, J.B. Methodoly in siderophores. In: CHIMIACK, E. (ed) **Structure and bonding**. Berlin : Springer Verlag, 1984. p. 1-24.

NEILANDS, J.B. Siderophores. **Archives of Biochesmistry and Biophysics**, Berkeley, v. 302, p. 1-3, 1993.

NORONHA, E.F.; ULHOA, C.J. Purification and characterization of an endo- $\beta$ -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum*. **Canadian Journal of Microbiology**, Saskatoon, SK, Canadá, v. 42, p. 1039-1044, 1996.

OLIVE, H. K. L.; KEVIN, D. H. Phylloplane fungi in Hong Kong mangroves: evaluation of study methods. **Mycologia**, Lawrence, v. 94, n. 4, p. 596-606, 2002.

O'NEIL, T.M.; ELAD, Y.; SHTIENBERG, D.; COHEN, A. Control of grapevine grey mould with *Trichoderma harzianum* T39. **Biocontrol Science Technology**, Bet Dagan, v. 6, n. 2, p. 139-146, 1996.

PAZ, I.C.P. **Atividade biológica de metabólitos produzidos por microrganismos endofíticos do cacauero (*Thebroma cacao*) e o controle biológico de *Crinipellis pernicioso***. Caxias do Sul : UCS, 2005. 100f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2005.

PENNA, E. B. da S. **Microrganismos endofíticos em erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) e variabilidade genética em *Phyllosticta sp.* por RAPD**. Curitiba : UFPR, 2000. 123f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2000.

PHILLISKIRK, G.; YOUNG, T. W. The occurrence of killer character in yeasts of various genera. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v.41, n.2, p.147-151, 1975.

PUNJA, Z.K.; UTKHEDE, R.S. Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. **Trends in Biotechnology**, Burnaby, v. 21, n. 9, p. 400-407, 2003.

RAASKA, L.; ALAKOMI, H.L.; SALKINOJA-SALONEM, M. Antagonistic activity of Staphylococcus siderophores and chemical biocides against *Bacillus subtilis* in a paper-machine environment. **Journal Industrial Microbiology and Biotechnology**, Finland, v. 22, n.1, p. 27-32, 1999.

RENSHAW, J.C.; ROBSON, G.D.; TRINCI, A.P.J.; WIEBW, M.G.; LIVENS, F.R.; COLLISON, D.; TAYLOR, R.J. Fungal siderophores: structures, functions and applications. **Mycological Research**, Manchester, v. 106, n. 10, p. 1123-1142, 2002.

RIQUELME, M. Fungal siderophores in plant-microbe interactions. **Microbiologia**, Riversid, v.4, n. 4, p. 537-546, 1996.

ROBBS, C.F.; PIMENTEL, J.P.; RIBEIRO, R.L. A mancha preta dos citros: identificação da forma perfeita *Guignardia citricarpa* no Estado do Rio de Janeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 18, 1985, Fortaleza. **Resumos...** Fortaleza, 1985. p. 248

RODRIGUES, M.B.C. **Controle de *Guignardia citricarpa*, agente causal de mancha preta dos citros.** Piracicaba : ESALQ, 2006. 68f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo Piracicaba, 2006.

RODRIGUEZ-KABANA, R.; KELLEY, W.D.; CURL, E.A. Proteolytic activity of *Trichoderma viride* in mixed culture with *Sclerotium rolfsii* in soil. **Canadian Journal of Microbiology**, Auburn, v. 24, p.487-490, 1978.

RUBINI, M.R. **Microbiota endofítica do cacauzeiro e o controle biológico de *Crinipellis pernicioso*.** Caxias do Sul : UCS, 2003. 100f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2003.

SARATH, G.; DE LA MOTTE, R.; WAGNER, F. W. Protease assay methods In: Beynon, R. J.; Bond, I. S. **Proteolitic assay: a practical approach.** Oxford: IRC Press, 1989.

SARTORI, V.C. **Dinâmica das populações de fungos endofíticos e epifíticos, impacto ecológico em diferentes sistemas de produção da macieira (*Malus domestica*) e seu potencial biotecnológico.** Curitiba: UFPR, 2003. 109f. Tese (Doutor em Processos Biotecnológicos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2003.

SAXENA, S.; PANDEY, A.K. Microbial metabolites as eco-friendly agrochemicals for the next millennium. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Punjab, v.55, n. 4, p. 395-403, 2001.

SCHMIDT, J. **Ocorrência de pinta preta causada por *Guignardia citricarpa* kiely em pomares de citros sob manejo orgânico, no município de Montenegro, RS.** 2003. 77f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

SCHUTTE, G.C.; BEETON, K.V; KOTZÉ, J.M. Rind stippling on Valencia oranges by copper fungicides used for control of citrus black spot in South Africa. **Plant Disease**, Saint Paul, v.81, n. 8, p. 851-854, 1997.

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

SEGRS, R.; BUTT, T.M.; KERY, B.R.; PEBERDY, J.F. The nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium* produces a chymoelastase-like protease which hydrolyses host nematode proteins *in situ*. **Microbiology**, Kingdom, v. 140, p. 2715-2723, 1994.

SILVA-RIBEIRO, R.T. **Avaliação do potencial de cinco linhagens de *Trichoderma* spp. como agentes de controle biológico contra o fitopatógeno *Botrytis cinerea*.** 2001. 81 f. Tese (Doutorado - Bioquímica) - Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.

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

SOMEYA, N.; NAKAJIMA, M.; HIRAYAE, K.; HIBI, T.; AKUTSU, K. Synergistic antifungal activity of chitinolytic enzymes and prodigiosin produced by biocontrol bacterium, *Serratia marcescens* strain B2 against B2 gray mold pathogen, *Botrytis cinerea*. **Journal of Genetics of Plant Pathology**, Ibaraki, v. 67, p. 312-317, 2001.

SOUZA, J. L. **Diversidade microbiana em vinhedos orgânicos e convencionais no Rio Grande do Sul.** Caxias do Sul:UCS, 2000.46f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2000.

SPÓSITO, M.B. **Dinâmica temporal e espacial da mancha preta (*Guignardia citricarpa*) e quantificação dos danos causados à cultura dos citros.** Piracicaba: ESALQ, 2003. 112f. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

ST. LEGER, R.J.; JOSHI, L.; BIDONCKA, M.J.; ROBERTS, D.W. Protein synthesis in *Metarhizium anisopliae* growing on host. **Mycological Research**, Ithaca, v. 99, n. 9, p. 1934- 1940, 1995.

STINSON, A.M.; ZIDACK, N.K.; STROBEL, G.A.; B. JACOBSEN, J. Mycofumigation with *Muscodor albus* and *Muscodor roseus* for control of seedling diseases of sugar beet and *Verticillium* wilt of eggplant. **Plant Disease**, Bozeman, v. 87, n. 11, p. 1349-1354, 2003.

STINTZI, A.; HEITZ, T.; PRASAD, V.; WIEDEMANN-MERDINOGLU, S.; KAUFFMANN, S.; GOEFFROY, P. Plant ‘pathogenesis related’ proteins and their role in defense against pathogens. **Biochimie**, Strasbourg, v. 75, n. 8, p. 687–706, 1993.

STORMER, F.C.; SANDVEN, P.; HUITFELDT, H.S.; EDUARD, W.; SKOGSTAD, A. Does the mycotoxin citrinin function as a sun protectant in conidia from *Penicillium verrucosum*? **Mycopathologia**, Oslo, v.142, n. 1, p. 43-47, 1998.

STROBEL, G. A., DIRSKE, E., SEARS, J., MARKWORTH, C. Volatile antimicrobials from *Muscodor albus*, a novel endophytic fungus. **Microbiology**, Bozeman, v.147, n. 11, p. 2943-2950, 2001.

SUDO, S. Biocontrole de *Catacauma torrendiella* e *Coccostroma palmicola*, agentes causadores da lixa preta do coqueiro. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS DE PLANTAS, 1989, Piracicaba. **Resumos...** Piracicaba, 1989. p.57-59.

SUTTON, B. C.; WATERSON, J. M. *Guignardia citricarpa*. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1966. 2 p. (Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria, 85).

SUTTON, B.C.; WATERSON, J.M. *Guignardia citricarpa*. **Descriptions of pathogenic fungi and bacteria**. *Guignardia citricarpa*. Surrey, England, Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1966. n. 85, 2p.

THEIS, T.; STAHL, U. Antifungal proteins: targets, mechanisms and prospective applications. **Cell Molecular Life Science**, Berlin, v. 61, n. 4, p. 437-455, 2004.

TIMMER, L.W.; GARNSEY, S.M.; GRAHAM, J.H. **Compendium of Citrus Diseases**. 2 ed. Saint Paul: APS Press, 2000. 92p.

TING, Y.; LIANPING, W.; YUN, Y.; YIXI, W.; XIAODONG, Z. Effect of chitin on the antagonistic activity of *Cryptococcus laurentii* against *Penicillium expansum* in pear fruit. **International Journal of Food Microbiology**, Hangzhou, v.122, n. 1-2, p. 44-48, 2008.

VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M.V. Leveduras para o biocontrole de fitopatógenos. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Ed.). **Controle biológico**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. v.3, cap. 2, p.41-56.

WALKER, G.; MCLEOD, A.; HODGSON, V. Interactions between killer yeast and pathogenic fungi. **FEMS Microbiology**, Amsterdam, v.127, n. 3, p.213-222, 1995.

WALKER, H.L., CONNICK, W. J.Jr. Sodium alginate for production and formulation of mycoherbicides. **Weed Science**, Champaign, v.31., n. 3, p. 333- 338, 1983.

WANG, S.L.; SHIH, I.L.; LIANG, T.W.; WANG, C.H. Purification and characterization of two antifungal chitinases produced by the *Bacillus amyloliquefaciens* V656 in a shrimp and crab shell powder medium. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, Chang-Hwa, v. 50, n. 8, p. 2241–2248, 2002.

WHEATLEY, R.E. The consequences of volatile organic compound mediated bacterial and fungal interactions. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dundee, v.81, n. 1-4, p. 357-364, 2002.

WHEATLEY, R.E.; MILLAR, S.E.; GRIFFITHS, D.W. The production of volatile organic compounds during nitrogen transformations in soils. **Plant Soil**, Dundee, v.181., n. 1, p. 161-163, 1996.

WHITESIDE, J. O.;GARNSEY, S. M.;TIMMER, L. W. **Compendium of citrus disease**. 2 ed. St. Paul: APS Press, 1993. 73 p.

WIEST, A.; GRZEGORSKI, D. XU. B.; GOULARD, C.; REBUFFAT, S. EBBOLE, D.J.; BODO, B.; KENERLEY, C. Identification of peptaibols from *Trichoderma virens* and cloning of a peptaibol synthetase. **Journal of Biological Chemistry**, Texas, v. 277, n. 23, p. 20862-20868, 2002.

WISNIEWSKI, M.; BILES, C.; DROBY, S.; MCLAUGHLIN, R.; WILSON, C.; CHALUTZ, E. Mode of action of the postharvest biocontrol yeast *Pichia guilliermondii* In. Characterization of attachment to *Botrytis cinerea*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, Orlando, Fl., v. 39, n. 4, p. 245-258, 1991.

WOO, S.; FOGLIANO, V.; SCALA, F. ; LORITO, M. Synergism between fungal eand bacterial antibiotics may enhance biocontrol. **Antonie van Leeuwenhoek**, Chicago, v. 81, n. 1-4, p. 353-356, 2002.

XIAO-YAN, S.; QING-TAO, S.; SHU-TAO, X.; XIU-LAN, C.; CAI-YUN, S.;ZHANG ZHONG, Y. Broad-spectrum antimicrobial activity and high stability of Trichokonins from *Trichoderma koningii* SMF2 against plant pathogens. **FEMS Microbiology Letters**, Jinan, v. 260, n. 1, p. 119–125, 2006.

YOUNG, T. W The properties of brewing performance of brewing yeasts possessing killer character. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, Saint Paul, v.42, p. 1-4, 1982.