

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

**AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA ENDOFÍTICA DE CITROS COM POTÊNCIAL
ANTAGÔNICO NO CONTROLE BIOLÓGICO DE *Guignardia citricarpa***

**ALEX DA SILVA CORRÊA
Engenheiro Agrônomo (UFRGS)**

**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

“Dedico a minha amada Luciana Mesquita Belleza”

AGRADECIMENTOS

Como dizia minha cara colega Géssica Schmidt, uma frase de um autor desconhecido. Não somos tão fortes para nunca precisar de ajuda de alguém, mas também não somos tão fracos assim para que não possamos ajudar alguém.

Primeiramente agradeço ao meu orientador, professor Dr. Fábio Kesler Dal Soglio, por ter me acolhido em um momento de decisões e mudanças em meu mestrado, por ter me orientado de forma diferente, me tratando como um colega de profissão e não um mero subordinado.

A minha noiva e futura esposa, Luciana Mesquita Belleza, amada esta que sempre está ao meu lado, me ensinou (inglês), sempre me orientou (co-orientadora), e quando era possível me acompanhou em campo. Te amo linda!

Aos meus pais, Célio Urbano Corrêa (Meu Administrador) e Sirlei da Silva Corrêa (Minha Pedagoga), irmãs Carolina da Silva Corrêa (Minha Geógrafa) e Bruna S. Corrêa (Futura Agrônoma), que apesar das distâncias sempre queriam estar atualizados, sempre apoiaram e estiveram ao meu lado por mais difícil que fossem minhas escolhas e decisões.

Aos irmãos que ganhei durante minha jornada, Marcos Vinicius de Souza e Caren Regina Cavichioli Lamb, que durante os seis anos de trabalho no LFM, sempre me transmitiram conhecimentos, acalmavam e guiavam a minha ansiedade de novas descobertas, não se limitaram a serem apenas colegas e amigos, se tornaram irmãos, os tenho como exemplos de vida e profissionais, amo vocês também viu! (E tem!....)

Ao meu amigo Felipe do laboratório 3, que discutia as melhores formas de desenvolver os experimentos, que não exitou em passar fins de semana me ajudando nas análises estatísticas (20 dias antes da defesa), valeu pelo apôio.

À família Laux, de montenegro, proprietária da área onde foram desenvolvidos os experimentos, representada por Luiz Laux, que sempre esteve disposto a nos acolher e orientar em suas experiências praticas, nos permitindo desenvolver um trabalho a contento de todos.

Aos meus orientadores que antecederem esta jornada, Marcelo Gravina de Moraes e Atelene Norman Kämpf, que me ensinaram e orientaram durante minha graduação, sabendo que cada um de nós possui limitações.

Ao programa de pós-graduação que me possibilitou obter bolsa durante a condução do mestrado (CAPES).

AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA ENDOFÍTICA DE CITROS COM POTENCIAL ANTAGÔNICO NO CONTROLE BIOLÓGICO DE *Guignardia citricarpa*¹

Autor: Alex da Silva Corrêa
Orientador: Fábio Kessler Dal Soglio

RESUMO

Diversas espécies de fungos e de bactérias constituem a microbiota endofítica nas plantas cítricas. Interações simbióticas, sinérgicas ou antagonicas, fazem parte do cotidiano das relações entre esses microorganismos endofíticos e seus hospedeiros. Nos últimos anos, os microorganismos endofíticos vêm despertando grande interesse devido ao seu potencial de utilização como fármacos e principalmente no controle biológico. Este trabalho teve por objetivo a identificação de microorganismos endofíticos com potencial antagonico a *Guignardia citricarpa* na cultura do citros, em pomares orgânicos. Inicialmente foram feitos isolamentos através da assepsia de ramos, folhas e frutos de diferentes variedades de citros em manejo orgânico através do plaqueamento de segmentos dos tecidos em meio de cultura BDA. Diversos microorganismos endofíticos foram obtidos. O pareamento em placas de Petry dos diferentes microorganismos possibilitou a identificação de bactérias com potencial antagonico a *G. citricarpa*. Isolados de *Trichoderma* ssp. também estavam presentes na comunidade endofítica, *Trichoderma* ssp. é utilizado no controle biológico por parasitar diferentes fitopatógenos. Inoculações dos endófitos foram feitas em casa de vegetação e em campo, possibilitando a seleção de microorganismos promissores para a utilização em grande escala no controle de *G. citricarpa*. A compreensão dos mecanismos biológicos e moleculares dessas diferentes interações nos possibilitará um melhor e mais adequado manejo desses diferentes microorganismos em sistemas de cultivo mais sustentáveis.

¹Dissertação de Mestrado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do sul, Porto Alegre, RS, Brasil (46p.) Abril, 2008.

UTILIZATION OF ENDOPHYTIC MICROBIOT OF CITRUS AS TOOL FOR ANTAGONISTIC TO BIOLOGIC CONTROL OF *Guignardia citricarpa*¹

Author: Alex da Silva Corrêa
Orientador: Fábio Kessler Dal Soglio

ABSTRACT

Several species of fungi and bacteria are endophytic microorganism in citrus plants. symbiotic, synergistic or antagonistic Interactions, are part of the daily lives of relations among these endophytic microorganisms and their hosts. In the last years, the endophytic microorganisms have been arousing great interest because of their potential use as drugs, and mainly on biological control. The aim of this study was the identify endophytic microorganisms with antagonistic potential to *Guignardia citricarpa* on citrus cultures in organic orchards. Initially isolates were made through aseptic of branches, leaves and fruits of different varieties of citrus through the plating of segments tissue in PDA (*Potato Dextrose Agar*). Several endophytic microorganisms were obtained. The paired cultivation, in Petry dishes, of different microorganisms, allowed the identification of bacteria with potential antagonism to *G. citricarpa*. *Trichoderma* sp. isolates also were present in the endophytic community. *Trichoderma* sp. is widely used in biological control as a parasite on different phytopathogens. Endophytic inoculations were made in a greenhouse and in the field. These inoculations allowed the selection of promising microorganisms for the use in large scale for control of *G. Citricarpa*. The understanding of biological and molecular mechanisms of these different interactions will enable a better and more appropriate management of these microorganisms in different and more sustainable cropping systems.

¹ Master of Science disertation in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do sul, Porto Alegre, RS, Brazil (46p.) April, 2008.

SUMÁRIO

| | Página |
|--|--------|
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1. Justificativa | 1 |
| 1.2. Objetivos | 2 |
| 1.2.1. Objetivo geral | 2 |
| 1.2.2. Objetivos específicos | 2 |
| 1.3. Hipótese | 3 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 4 |
| 2.1. A cultura do citros | 4 |
| 2.2. Principais doenças | 5 |
| 2.2.1. Mancha preta do citros | 6 |
| 2.2.2. Etiologia | 7 |
| 2.2.3. Sintomatologia | 8 |
| 2.2.4. Epidemiologia | 9 |
| 2.2.5. Controle | 11 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS | 15 |
| 3.1. Obtenção dos isolados | 15 |
| 3.1.1. Coleta do material | 15 |
| 3.1.2. Desinfestação | 16 |
| 3.1.3. Isolamento | 17 |
| 3.2. Identificação dos microorganismos | 17 |
| 3.3. Confronto intraespecíficos | 18 |
| 3.4. Confrontos interespecíficos <i>in vitro</i> | 18 |
| 3.5. Inoculação em casa de vegetação | 19 |
| 3.6. Inoculação em campo | 21 |
| 3.7. Análises estatísticas | 23 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 24 |
| 4.1. Isolamento de <i>G. citricarpa</i> | 24 |
| 4.2. Isolamento de microorganismos endofíticos dos citros | 26 |
| 4.3. Identificação de fungos endofíticos | 27 |
| 4.4. Identificação de bactérias endofíticas | 29 |
| 4.5. Estudo do antagonismo dos isolados a <i>G. citricarpa</i> | 31 |
| 4.6. Inoculação de endófitos e <i>G. citricarpa</i> em mudas de citros em casas de vegetação | 34 |
| 4.7. Inoculação dos endófitos em campo | 35 |
| 5. CONCLUSÕES | 39 |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 40 |

Relação de tabelas

01. Identificação dos isolados de *Guignardia citricarpa*, com seus respectivos tecidos de origem, variedade e município de origem, Montenegro, RS, 2007..... **P26**
02. Frequência de microorganismos endofíticos isolados de citros em seus respectivos tecidos vegetais. Porto Alegre, RS, 2007.....**P27**
03. Identificação de fungos endofíticos isolados e seus respectivos tecidos de origem. Porto Alegre, RS, 2008.....**P29**
04. Características morfológicas e frequência de isolamento nos diferentes tecidos e cultivares de origem. Porto Alegre, RS, 2008.....**P30**
05. Testes bioquímicos de isolados de bactérias endofíticas da cultura do citros...**P31**
06. Diâmetro médio de GC21 confrontado em placas de Petry com os endófitos Bac1, Bac2, Bac3, Bac4, Bac5, Bac6, Bac7, Bac8 e T58(*Saccharomyces cerevisiae*).....**P32**
07. Diâmetro médio de GC122 confrontado em placas de Petry com os endófitos Bac1, Bac2, Bac3, Bac4, Bac5, Bac6, Bac7, Bac8 e T58(*Saccharomyces cerevisiae*).....**P33**
08. Média de incidência de folhas com sintomas de *G. citricarpa* na variedade montenegrina, inoculadas com endófitos Bac1, Bac2, Bac3, Bac4, Bac5, Bac6, Bac7, Bac8 e *Tricoderma* sp. Porto Alegre, RS, 2008.....**P36**
09. Média de incidência de frutos com sintomas de *G. citricarpa* na variedade montenegrina, em frutos verdes (D=3,5cm), inoculadas com endófitos Bac1, Bac2, Bac3, Bac4, Bac5, Bac6, Bac7, Bac8 e *Tricoderma* sp. Montenegro, RS, 2008.....**P38**

Relação de figuras

01. Localização da principal região produtora de citros do estado do Rio Grande do Sul e seus municípios.....**P17**
02. Mudanças de tangerina cv. Montenegrina com seus respectivos tratamentos e repetições, em casa de vegetação, Porto Alegre, RS, 2007-2008.....**P22**
03. Vista do pomar utilizado no experimento em campo, tangerina cv. Montenegrina, Montenegro, RS, 2007-2008.....**P24**
04. Sintomas de pinta preta tipo mancha dura, em lesões deprimidas na superfície da casca de fruto de Montenegrina (*Citrus deliciosa* Tenore), amostrado em Montenegro, RS, 2007.....**P25**
05. Confronto dos endofíticos com os isolados GC21 e GC122 *in vitro*.....**P35**

LISTA DE SIMBOLOS E ABREVIATURAS

| | |
|-----------------------|------------------------------|
| ADE | Água destilada exterilizada |
| BDA | Batata dextrose agar |
| cm² | Centímetros quadrados |
| g | Gramma |
| h | Hora |
| ha | Hectare |
| L | Litro |
| mm | Metro |
| min. | Minuto |
| mL | Mililitro |
| mm | Milímetro |
| ppm | Partes por milhão |
| ss | Segundo |
| Ton. | Tonelada |
| UFC | Unidade formadora de colônia |
| µL | Microlitro |

1 INTRODUÇÃO

1.1 Justificativa

Diversos problemas estão associados à utilização de agrotóxicos com frequência, tais como aquisição de resistência pelos fitopatógenos, deriva dos produtos ocasionando contaminações ambientais, além de causarem grandes riscos à saúde humana. Nos últimos anos vem surgindo uma grande preocupação da sociedade em relação a esses problemas gerados pelo uso indiscriminado de agrotóxicos, incentivando assim a busca de alternativas mais sustentáveis e racionais para o controle de fitopatógenos e pragas nas diferentes culturas (Gullino & Kuijpers, 1994).

A pinta preta é uma doença emergente no estado do Rio Grande do Sul e tem despertado grande preocupação, devido ao fato de não haver, até o presente momento, um controle efetivo da doença, mesmo nos países onde a mesma ocorre há mais tempo.

A utilização de fungos e leveduras no biocontrole vem despertando grande interesse na comunidade científica pelo fato de alguns microorganismos interromperem algum estágio da doença ou do ciclo de vida do patógeno através de diversos mecanismos, tais como: parasitismo, produção de antibióticos e enzimas hidrolíticas, competição por nutrientes e nichos de colonização. A prevenção da infecção, redução da colonização, diminuição da esporulação ou da sobrevivência

do patógeno podem proporcionar diferentes níveis de controle através da utilização de microrganismos antagônicos (Punja & Utkhede, 2003).

Em virtude de prejuízos causados por *G. citricarpa* na comercialização de frutos *in natura*, principalmente no mercado externo, e em virtude do crescente interesse pela utilização de métodos não agressivos ao ambiente, ou que ao menos reduzam a utilização de fungicidas no controle da doença, neste trabalho procurou-se analisar a diversidade da microbiota endofítica do citros e avaliar o potencial da utilização desta no controle do desenvolvimento de *G. citricarpa in vitro* e *in vivo*.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo geral

Avaliar um método de controle biológico de *Guignardia citricarpa* através da utilização de microrganismos endofíticos, isolados de citros no estado do Rio Grande do Sul, em pomares manejados de forma orgânica.

1.2.2 Objetivos específicos

1. Identificar e caracterizar a biodiversidade de microrganismos endofíticos em citros em pomares de cooperativados da ECOCITROS.
2. Identificar relações interespecíficas entre isolados obtidos e *Guignardia citricarpa* através do pareamento *in vitro*;
3. Avaliar o efeito da inoculação de isolados endofíticos selecionados no controle de *Guignardia citricarpa* em casa de vegetação;

4. Avaliar o efeito da inoculação de isolados endofíticos selecionados no controle de *Guignardia citricarpa* em campo;

1.3 Hipótese

- Diversos fungos endofíticos da cultura dos citros possuem diferentes espectros de antagonismo à *Guignardia citricarpa*;
- A microbiota endofítica pode ser uma ferramenta para o controle biológico de *Guignardia citricarpa* em citros

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A cultura do citros

A cultura dos citros é de grande importância, pois contribuem como uma ótima fonte de vitamina C na dieta humana e têm uma ótima aceitação mundial, tanto na forma de fruta fresca quanto em suco.

No Brasil, a expansão da cultura do citros é devida ao seu alto valor de exportação, contribuindo assim de forma social, gerando um grande número de empregos (Victória *et al.*, 1991).

Em 2005, o Brasil produziu 16.917.558 Ton. de laranja e 1.304.743 Ton. de tangerinas, em uma área de 887.001 ha O Estado do Rio Grande do sul contribuiu com o montante, produzindo 356.398 Ton. de laranja e 174.746 toneladas de tangerina em uma área de 40.423 ha (IBGE, 2005). Estes dados demonstram uma baixa produtividade no Estado do Rio Grande do Sul, sendo os problemas fitossanitários o principal fator que ocasiona esta baixa produtividade.

A citricultura do Rio Grande do Sul está concentrada principalmente nos Vale do Caí e Taquari, nos municípios de Montenegro, São Sebastião do Caí, General Câmara, Triunfo e Taquari (Dorneles, 1980). A Citricultura foi introduzida em 1760, como uma alternativa econômica para as propriedades da região, porém teve uma queda na produção devido ao êxodo da mão-de-obra atraída pelas indústrias de

calçados (Schmidt e Dal Soglio, 2003). A citricultura nesta região sempre esteve ligada à agricultura familiar, pois a região caracteriza-se por possuir pequenas propriedades de quatro ha em média. Estes agricultores são apoiados por diferentes projetos da iniciativa privada e do governo, como PRORENDA Agricultura Familiar; ONGs, como o Centro Ecológico; O CETAP (Centro de Estudos de Tecnologias Alternativas Populares); O CAPA (Centro de Apoio ao Pequeno Agricultor); A Fundação Gaia; A pastoral da Terra; A ECOCITUS (Cooperativa dos Citricultores Ecológicos do Vale do Café)(Schmidt, 2004), além de projetos em parceria com a UFRGS.

Dentre os diversos problemas da cultura, os fitossanitários vêm tendo uma grande importância devido à aquisição de resistência pelos fitopatógenos aos ingredientes ativos dos agrotóxicos utilizados, além de risco ao meio ambiente e principalmente à saúde dos agricultores e consumidores do produto. Tendo em vista a importância desta cultura para a região, urge a necessidade de tecnologias para proporcionar um manejo mais sustentável da citricultura, melhorando a qualidade de vida para essas famílias de produtores (Schmidt, 2004).

2.2 Principais doenças

A cultura dos citros é constantemente afetada em relação a sua produtividade devido ao ataque de diversas doenças, dentre as quais vem despertando maiores preocupações atualmente na citricultura gaúcha, podemos destacar: a mancha preta dos citros (MPC), também chamada de pinta preta, tendo como agente causal *Guignardia citricarpa* Kiely, que afeta todas as variedades de laranjeiras doces, limoeiros verdadeiros, tangerineiras e híbridos; O cancro cítrico, causado pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. Citri; A podridão floral dos citros (PFC),

também conhecida como "estrelinha", que é causada pelo fungo *Colletotrichum acutatum* J.H. Simmonds e afeta flores e frutos recém-formados de quase todas as variedades de citros de interesse comercial; E a mancha de alternaria, causada pelo fungo *Alternaria alternata* sp. Citri. (Fr.) Keissl..

2.2.1 Mancha preta do citros

A mancha preta dos citros (MPC) ou pinta preta, causada pelo fungo *G. citricarpa*, cuja fase anamórfica corresponde a *Phyllosticta citricarpa* (Mc Alp.) Van der Aa, foi relatada pela primeira vez em 1895 na Austrália, causando muitas perdas (Sutton *et al.*, 1966). No Brasil, o primeiro relato da ocorrência na década de 40 em uma feira livre no município de Piracicaba em São Paulo (Averna-Saccá, 1940) e já era uma doença epidêmica na África do Sul, China e em alguns outros países da América do sul como Argentina e Peru (Sutton *et al.*, 1966). Na década de 80 foi relatada sua ocorrência no estado do Rio de Janeiro (Robbs *et al.*, 1980). No estado do Rio grande do sul, mais precisamente na região citrícola do Vale do Caí, Robbs & Bittencourt identificaram em 1995 a ocorrência epidêmica da doença, tratando-se de uma doença emergente no sul do Brasil, causando crescentes prejuízos para a citricultura. As lesões nos frutos acarretam a perda do valor comercial *in natura*, devida à sua aparência, porém não alteram seu sabor, permitindo a utilização dos frutos na indústria de sucos. No caso da exportação, esta doença tem importância maior, por tratar-se de uma barreira fitossanitária para o mercado europeu (Aguilar *et al.*, 2002).

2.2.2 Etiologia

O agente causal da MPC é um Ascomiceto, Loculoascomiceto, da ordem Dothideales e família Dothideacea (Sivanesan, 1984). Foi primeiramente descrito por McAlpine, em 1899 (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, 1981, 1996).

No ano de 1964, Mcconie descreveu duas variantes de *G. citricarpa* morfológicamente idênticas, com ocorrência nos citros, sendo uma delas patogênica e a outra endofítica. Diversos estudos posteriores tentaram diferir as duas espécies, porém não foram identificadas diferenças morfológicas. A única característica que diferiu foi o crescimento micelial, em que isolados patogênicos de *G. citricarpa* cresciam mais lentamente que *Guignardia* sp. dificultando, assim, a identificação. Entretanto, atualmente sabe-se que a forma endofítica é outra espécie denominada de *G. mangiferae* (anamófica: *Phyllosticta capitalensis*) (Baayen et al., 2002). Estes autores identificaram diferenças genéticas entre as duas espécies através da análise da região intergênica do DNA ribossomal, possibilitando um diagnóstico mais rápido e preciso.

G. citricarpa possui dois tipos de esporos: os assexuais (picnidiosporos), que se desenvolvem em folhas e frutos da planta, e os esporos sexuais (ascosporos), que se desenvolvem nas folhas em decomposição no solo (Fundecitrus, 2000).

2.2.3 Sintomatologia

Há vários tipos de sintomas, podendo variar dependendo do tamanho e fase de maturação do fruto, condições climáticas e tipo de esporo responsável pela infecção (Fundecitrus, 2000). O surgimento dos sintomas é favorecido pela luminosidade juntamente com altas temperaturas, sendo mais comum encontrar-se frutos com maior número de lesões na face voltada para o norte, onde há maior incidência de luz solar.

O sintoma mais característico da MPC é a formação da mancha preta ou mancha dura, a qual surge quando os frutos tornam-se amarelos, levando à maturação externa. As lesões são deprimidas, com bordos bem definidos, com centros acinzentados e pontos escuros que são as frutificações (picnídios). Nos frutos verdes, as lesões apresentam um halo amarelado ao seu redor. Frutos colhidos assintomáticos podem apresentar os sintomas posteriormente, porém apresentam áreas deprimidas e pontuações negras (Fundecitrus, 2000). A falsa melanose, lesão pequena e com numerosos pontos escuros ao seu redor, pode ser confundida com a doença melanose dos citros, causada pelo fungo *Diaporthe citri*. A diferença das lesões está na textura: na melanose é áspera enquanto na pinta preta é lisa (Fundecitrus, 2000). A mancha rendilhada apresenta lesões superficiais sem bordas definidas e textura lisa, que aparecem quando os frutos ainda estão verdes, podendo atingir grande parte da superfície do fruto. A mancha trincada é superficial e ocorre em pequeno número em frutos ainda verdes. Quando o fruto amadurece, a lesão trinca e está sempre associada ao ácaro da falsa ferrugem (*Phyllocoptruta oleivora*). A mancha sardenta é levemente deprimida e avermelhada, aparece em frutos maduros e também na pós-colheita. Frutos já contaminados, mas sem sintomas, podem expressar lesões durante o armazenamento ou transporte. A

mancha virulenta origina-se do aumento do tamanho e da fusão dos outros tipos de lesões. Com o desenvolvimento, podem tomar grandes áreas da superfície do fruto (Fundecitrus, 2000).

Os sintomas nas folhas não são observados em grande frequência. Quando ocorrem, são evidentes nas duas faces da folha e as lesões são semelhantes às da mancha preta ou dura observada nos frutos (Fundecitrus, 2000).

2.2.4 Epidemiologia

Diversos fatores afetam a epidemiologia, como a quantidade de inóculo, as condições climáticas, o ciclo da planta e idade do fruto (Kotzé, 1988).

O agente causal da MPC possui ciclos bem definidos. No ciclo primário ocorre a fase sexual de *G. citricarpa*, cujas estruturas infectivas são os ascósporos, responsáveis pela introdução do patógeno nos pomares e surgimento das epidemias a cada ciclo da cultura. Os peritécios são estruturas responsáveis pela formação dos ascos e ascósporos, só podem ser encontrados completos e maduros em folhas em estado de decomposição. 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 ascocarpos 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 µm) e apêndices hialinos nas duas extremidades obtusas (Feichtenberger *et al.*, 1997; Baldassari *et*

al., 2001). Os ascósporos liberados são ejetados a uma altura de 1cm, transportados por correntes de ar e podendo ser disseminados através de longas distâncias. A produção de esporos sexuais no ciclo primário é de suma importância para a sobrevivência do fungo, pois esses (esporos sexuais) possuem maior viabilidade e tolerância à seca.

O ciclo secundário é caracterizado pela fase assexual do fungo *P. citricarpa*. Nessa fase anamórfica, *P. 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 µm de diâmetro), apresentando um ostíolo levemente papilado e circular, de 12-14,5 µm de diâmetro (Feichtenberger *et al.*, 1997). Os conídios apresentam forma ovóide a elíptica (8-10,5 X 5,5-7 µm) ou subglobosos, são hialinos, unicelulares, multigutulados, com um apêndice (5-10 µm) hialino numa das extremidades (Feichtenberger *et al.*, 1997; Baldassari *et al.*, 2001). Em frutos maduros e folhas caídas, são produzidos picnídios, que por sua vez produzem conídios (Smith, 1996). Os conídios são as principais estruturas responsáveis pela disseminação do fungo à curta distância, e emergem de um ostíolo, envolvidos por uma substância muscilaginosa que é facilmente solubilizada e transportada pela água das chuvas, orvalho ou irrigação, atingindo a superfície de órgãos suscetíveis, e iniciando novas infecções (Kotzé, 1981; Robbs *et al.*, 1985).

O período crítico de suscetibilidade dos frutos para MPC ocorre em frutas desde 2-3mm de diâmetro até cerca de seis meses após a queda das pétalas (Kotzé, 1981). A doença é severa em plantas mais velhas e com o envelhecimento do pomar de citros a incidência tende a aumentar (Kotzé, 1981). 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, este período parece ser maior (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 “peg” de penetração que penetra a 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. Esta dormência ou infecção latente pode ser interrompida quando o fruto atingir seu tamanho final e ou quando a folha, já caída, começar a decompor-se. O patógeno, então, cresce a partir do micélio subcuticular e coloniza tecidos mais internos, produzindo os sintomas típicos da doença (Mcconie, 1967; Kotzé, 1988).

2.2.5 Controle

Dentre a medida mais recomendada para o controle da MPC, destacam-se o plantio de mudas saudáveis, a remoção dos frutos temporões a fim de reduzir a fonte de inóculo antes da florada, a utilização de quebra vento na propriedade, uso de irrigações no inverno para prevenir a queda excessiva de folhas, nutrição adequada e uso de fungicidas (Feichtenberger *et al.*, 1997). Para o controle químico, são recomendados fungicidas protetores e ou sistêmicos, associados ao óleo mineral e ou vegetal. Esse é o principal método de controle utilizado em pré e pós-colheita (Góes, 1998). Entretanto, alguns ingredientes ativos têm mostrado baixa eficiência, uma vez que a utilização massiva promoveu a seleção de isolados resistentes.

2.2.5.1 Controle biológico utilizando fungos e bactérias

Nos últimos anos, diversos estudos demonstram a importância e eficiência de alguns microorganismos no controle biológico de fitopatógenos. O entendimento do ciclo do patógeno é de suma importância para a eficiência de qualquer estratégia de controle. A interrupção da infecção, redução da colonização, esporulação ou sobrevivência do patógeno proporcionam diferentes níveis de controle, essas alterações podem ser geradas através da utilização de agentes biológicos (Punja & Utkhede, 2003). Muitos fungos e leveduras estão naturalmente presentes na microbiota endofítica, utilizando e interagindo de diferentes formas com o hospedeiro. Diversas pesquisas estão sendo desenvolvidas nos últimos anos e resultando em registros de vários agentes microbianos de uso comercial para o controle biológico. Diversas informações são necessárias antes da liberação de um produto comercial, com relação à eficácia, modo de ação do agente, sobrevivência, colonização, metabólitos com potencial tóxico para espécies não alvo, dentre outros.

Nesse sentido, estudos vêm sendo realizados para desenvolver o controle biológico da MPC, como a utilização de *Saccharomyces cerevisiae* (Pascholati, 1998). Vários são os mecanismos utilizados pelos agentes de biocontrole, como o parasitismo, a produção de compostos antibióticos e de enzimas extracelulares. Tais mecanismos interferem nos fatores de patogenicidade, como é o caso da produção de cisteína proteases por *Trichoderma harzianum* Rifai (1969) na inibição da atividade de enzimas hidrolíticas, em especial poligalacturonases, um importante fator de patogenicidade em muitos fungos (Elad & Kapat, 1999). Também induzem resistência na planta hospedeira (Rodov *et al.*, 1994), onde levedura induziu a produção de fitoalexinas em citros. A competição por nutrientes e nichos de colonização também afetam o patógenos, como a ação de espécies de *Trichoderma*

e *Gliocladium* (Harman, 2000). É provável que os diferentes mecanismos atuem em sinergia durante a interação antagônica (Punja & Utkhede, 2003). O controle biológico utilizado atualmente tem como objetivo, evitar a penetração dos patógenos nos tecidos de frutos e hortaliças e seu posterior desenvolvimento durante o armazenamento (Bettiol & Ghini, 1995). As leveduras têm-se mostrado promissoras no controle de doenças que ocorrem em pós-colheita, devido à facilidade de integrar o seu uso ao ambiente e o sistema usado para manejo das frutas (Wisniewski *et al.*, 1991). As espécies de leveduras mais citadas como agentes de controle biológico na pós-colheita de citros são: *D. hansenii*, *Rhodotorula mucilaginosa* e *C. oleophila* (Valdebenito-Sanhueza, 2000). As leveduras têm sido os microrganismos preferencialmente utilizados quando o objetivo é a proteção de frutos destinados ao consumo *in natura*, pelo fato destes organismos não serem bons produtores de antibióticos, uma vez que estas substâncias são indesejáveis para a dieta do homem (Valdebenito-Sanhueza, 2000). As leveduras também parasitam e degradam hifas de fungos patogênicos, quando se encontram aderidas nas hifas de fungo, bem como a elevada produção de glucanase a partir de diferentes fontes de carbono (Valdebenito-Sanhueza, 2000). A levedura *Pichia guilliermondii* Wick. (1966) inibe *Botrytis cinerea* Pers. (1794) e se adere fortemente ao micélio fúngico (Wisniewski *et al.*, 1991). As bactérias apresentam uma grande diversidade na microbiota de inúmeras espécies, para sua identificação é necessário a obtenção de cultura puras, e para tal utilizam-se muitas vezes características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas. Diversos são os benefícios atribuídos a utilização de determinadas espécies endofíticas, como promoção do crescimento, controle biológico de pragas e doenças, fixação de nitrogênio, indução de resistência, produção de antibióticos (Downing *et al.*, 2000; Verma *et al.*, 2001; Hallmann, 1997; Strobel & Daisy, 2003).

2.2.5.2 Taxonomia de microorganismos endofíticos

A visualização do crescimento micelial sobre meio de cultura muitas vezes não é suficiente para uma identificação precisa da espécie ou até mesmo em nível de gênero, é necessária uma análise morfológica das estruturas reprodutivas, principalmente sexuais. Segundo Petrini (1986), a identificação dos fungos endofíticos torna-se muito difícil dada à escassez de informações sobre o cultivo de espécies já descritas e também do microhabitat característico de cada tecido vegetal. Diversos gêneros já foram descritos, os quais são classificados entre os Basidiomicetos, Deuteromicetos e Cromista (Agrios 1998). Porém, a maioria dos fungos endofíticos é representada por Ascomicetos, os quais estão distribuídos entre Loculoascomicetos, Discomicetos e Pirenomicetos (Petrini, 1986). A taxonomia da microbiota endofítica torna-se muito difícil através de técnicas clássicas utilizadas para a caracterização de fenótipos. Novas técnicas baseadas na utilização de marcadores moleculares de DNA têm sido utilizadas com sucesso para identificar espécies de fungos, leveduras e bactérias.

Atualmente, os genes mais utilizados para tal identificação são os genes ribossomais rDNA, pois se repetem centenas de vezes, incluindo 3 genes: rDNA 18S, 5,8S e 28S. Estes genes são separados por dois espaços internos transcritos: ITS1 e ITS2, que separam as regiões conservadas 18S, 26S e 5,8S. Através da técnica de PCR, se obtêm um fragmento delimitado destas regiões. Com o seu posterior seqüenciamento, é possível uma identificação mais precisa e rápida de espécies em relação à identificação por métodos tradicionais. Vários estudos relatam a caracterização e identificação de isolados de fungos e bactérias, utilizando essa técnica baseada na amplificação e seqüenciamento das regiões intergênicas do rDNA, 16S, ITS1 e ITS2 (Costa-Neto, 2002).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção dos isolados

3.1.1 Coleta do material

As amostras foram coletadas semanalmente de folhas, ramos e frutos de citros de pomares localizados em duas propriedades na principal região produtora de citros do estado do Rio Grande do Sul (Figura 1). Também foram coletados frutos aleatoriamente, provenientes de diversos municípios na central de beneficiamento de frutas da ECOCITROS, procurando obter a maior representatividade da microbiota endofítica de fungos filamentosos em citros desta região.

O material coletado foi acondicionado em jornal umedecido e colocado em sacos plásticos previamente identificados. As amostras permaneceram acondicionadas em caixas térmicas, para o transporte até o laboratório a fim de garantir temperatura constante até o momento da desinfestação superficial e plaqueamento.

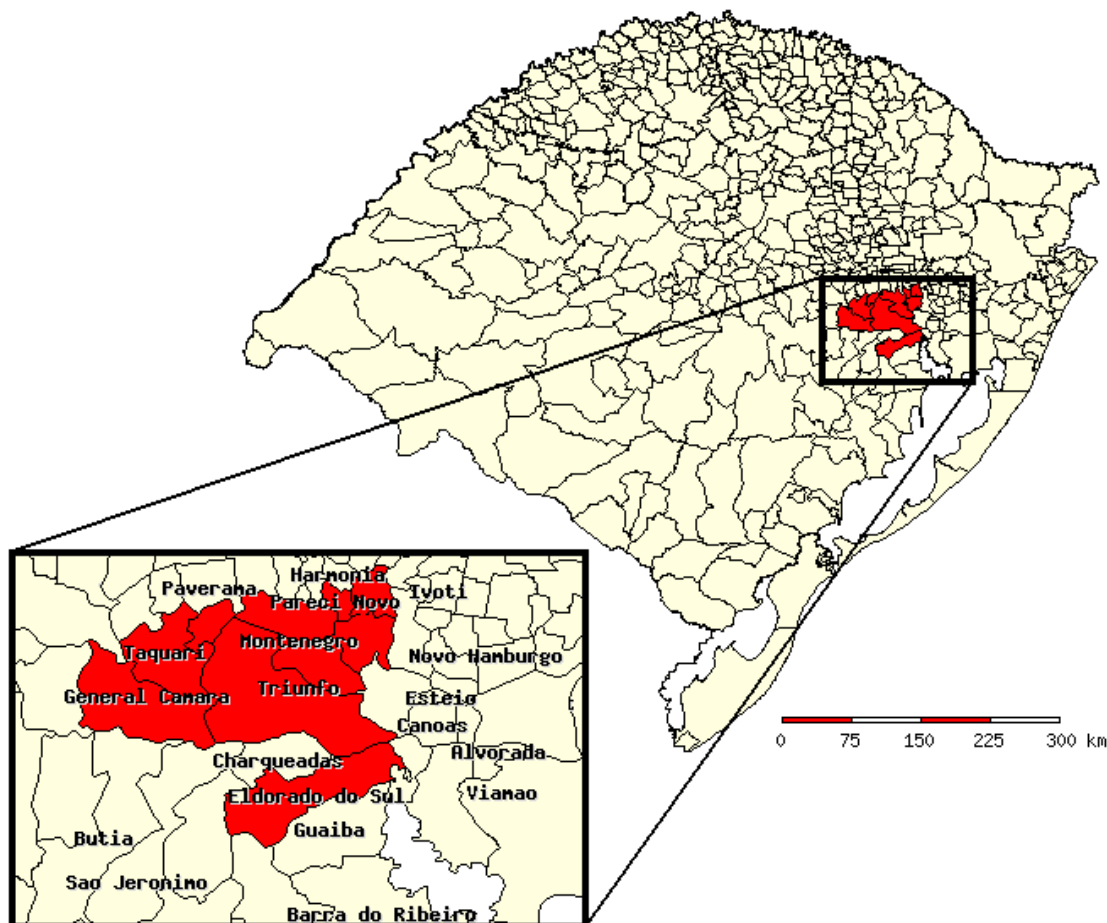


FIGURA 1. Localização da principal região produtora de citros do estado do Rio Grande do Sul e seus municípios.

3.1.2 Desinfestação

Para o isolamento fúngico, secções de 1 cm² de folhas e de exocarpo e de 2cm de ramos, foram desinfetadas através de lavagem em água corrente durante 15 min, seguida de imersão em etanol 70% durante 2 min, imersão em hipoclorito de sódio 2% durante 4 min e etanol 70% durante 1 min. Após a desinfestação, os explantes foram lavados em ambiente asséptico com água destilada e autoclavada (ADE) (Araújo *et al.*, 2001), e transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar: infusão de 200g de batata, 20g de glicose e 15g de ágar para o volume de 1 L) com estreptomicina (Whiteside *et al.*, 1992).

Para o isolamento bacteriano, os tecidos vegetais foram desinfetados através de lavagem em água corrente durante 15 min., seguida de imersão em etanol 70% durante 2 min, imersão em hipoclorito de sódio 2% durante 4 min e etanol 70% durante 1 min. secções de 1 cm² de folhas e de exocarpo e de 2cm de ramos, após a desinfestação, foram enxaguados em ambiente asséptico com água destilada e autoclavada (ADE) (Araújo *et al.*, 2001), e transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura TSA (Trypic Soy Agar) 5% (Araújo *et al.*, 2001) suplementado com Benomil (50 µg mL⁻¹) para inibição do crescimento fúngico (Lavaca *et al.*, 2006).

3.1.3 Isolamento

As placas foram incubadas a 25°C acondicionadas em BOD sob fotoperíodo de 14 h. O desenvolvimento das colônias foi avaliado em intervalos de 24 h através de microscopia estereoscópica. Cada colônia foi repicada para nova placa de Petri contendo meio de cultura BDA para posterior diluição e semeadura em novo meio de cultura, a fim de obterem-se isolamentos monospóricos.

Os isolamentos monospóricos foram numerados de acordo com seus locais de origem e ordem de isolamento, esses foram repicados para tubos de ensaio contendo BDA, onde foram etiquetados, catalogados e acondicionados em refrigerador a aproximadamente 5°C.

3.2 Identificação dos microorganismos

Para a identificação foram observados os aspectos macro e micro-morfológicos das estruturas vegetativas e reprodutivas, utilizando um microscópio Olympus BX41. Os resultados foram comparados com base em literatura específica.

As bactérias foram avaliadas morfológicamente e através de testes bioquímicos.

3.3 Confronto intraespecíficos

Os isolados de *G. citricarpa* foram avaliados em relação a sua agressividade através da avaliação da taxa de crescimento micelial. Os isolados selecionados foram confrontados com eles mesmos (controle) e com os demais isolados selecionados, em todas as combinações possíveis. Baseado na metodologia de Webber & Hedger (1986), inóculos de 0,6 cm de diâmetro foram pareados em placas de Petri com meio BDA, a uma distância de 4 cm entre as colônias, sendo estas incubadas a 25°C, no escuro, por 45 dias. A avaliação do crescimento e morfologia da zona de interação micelial foi feita periodicamente, em intervalos de três dias. A resposta de cada isolado foi avaliada em relação ao controle através de análise estatística. Os critérios utilizados para a avaliação das interações foram baseados nas descrições de Brayford (1990), Kay & Vilgals (1992), Rodrigues *et al.* (1995) e Faillace (1996). Confrontos que não apresentam significância, ambos os isolados, tornam-se representativo para o estudo das espécies antagonistas. Havendo alterações, mais de um isolado da mesma espécie é confrontado no estudo de antagonismo com os demais.

3.4 Confrontos interespecíficos *in vitro*

Para a avaliação do antagonismo, foram utilizados testes de cultivo pareado conforme metodologia descrita por Dennis & Webster (1971) e Benhamou & Chet (1993) modificada. Primeiramente foi realizada a multiplicação do patógeno *G. citricarpa* e dos possíveis microorganismos com potencial antagônico em meio de

cultura BDA. Em uma placa de Petri contendo meio de cultura BDA, foram colocados discos de meio de cultura BDA, com cerca de 0,6 cm de diâmetro, contendo os isolados de *G. citricarpa*. Nas mesmas placas de Petri, após 5 dias, foram inoculados os discos de meio de cultura BDA, com cerca de 0,6 cm de diâmetro, contendo fungos filamentosos com potencial antagônico ao patógeno, dispostos a 3 cm da borda da placa, mesma distância dos discos dos patógenos, entretanto no lado oposto a *G. citricarpa*. Já para as bactérias e leveduras foi realizada a semeadura de suspensões, com auxílio da Alça de Drigalski, a 3 cm da borda da placa de Petri do patógeno, no lado oposto ao inoculado com *G. citricarpa*. As placas foram incubadas em câmaras de crescimento a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 14 h.

Os isolados sob teste de antagonismo foram mantidos a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ durante quinze dias. Após, foram realizadas as mensurações dos diâmetros das colônias de patógenos e antagonistas, com o auxílio de paquímetro digital, a fim de detectar possíveis inibições do crescimento radial do micélio de *G. citricarpa*. As medições tiveram início após 48 h da inoculação dos antagonistas.

3.5 Inoculação em casa de vegetação

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, no departamento de Fitossanidade da Faculdade de Agronomia – UFRGS. A cultivar Montenegrina, enxertada sobre *Poncirus trifoliata* em Citro-potes cedido pelo departamento de Horticultura da Faculdade de Agronomia, UFRGS. As suspensões bacterianas e fúngicas foram preparadas adicionando-se água destilada esterilizada (ADE) sobre culturas puras, sendo transferidos para água através da raspagem do meio, utilizando um pincel, após 24 horas de cultivo em placas de Petri quando

bacterianas (Santos *et al.*, 2005) e quando fúngica, crescimento de quinze dias em placas de Petri.

A concentração de esporos foi estimada através da contagem utilizando uma câmara de Neubauer, claculando-se de acordo com a seguinte fórmula:

$$\sum Ne \times 2000 = Ce/ml$$

Onde:

$\sum Ne$ = Soma do número de esporos encontrados nas cinco câmaras;

Ce/ml = Concentração de esporos por ml de ADE

A inoculação foi feita através da aspersão da suspensão de inóculo na concentração de 1×10^6 conídios.ml⁻¹ quando fungo e 1×10^5 ufc.ml⁻¹ quando bactérias, juntamente com Tween 1%. As inoculações dos isolados endófitos, foi feita cinco vezes em um período de 35 dias (Figura 2). Durante o período foram feitos re-isolamentos de folhas das plantas, para observar a presença dos microorganismos inoculados.



FIGURA 2. Mudas de tangerina cv. Montenegrina com seus respectivos tratamentos e repetições, em casa de vegetação, Porto Alegre, RS, 2007-2008.

Após a detecção da presença do microorganismo, as plantas foram separadas e distribuídas aleatoriamente onde inoculou-se dois isolados de *G. citricarpa*, comitantemente, na concentração de 1×10^6 esporos.ml⁻¹, de cada isolado. As plantas com folhas jovens, no terço inicial do estágio de desenvolvimento. A testemunha foi pulverizada apenas com água e Tween 1%. As plantas assim tratadas foram mantidas em condições de câmara úmida (cobertas com sacos plásticos) por 72 h, posteriormente a retirada das sacolas plasticas, as plantas foram molhadas diariamente, a fim de se manter um ambiente úmido. O experimento foi conduzido durante quatro meses, sendo as inoculações feitas duas vezes.

Foram utilizados dez tratamentos, sendo nove isolados endofíticos e água como controle, todos com Tween 1%. O delineamento experimental foi de parcelas inteiramente casualizadas, com três repetições. As avaliações foram feitas pela contagem do número de folhas com sintomas de *G. citricarpa*, por planta.

3.6 Inoculação em campo

O experimento foi conduzido no período de setembro de 2007 a março de 2008, em pomares de tangerina cv. Montenegrina (enxentadas sobre *Poncirus trifoliata*) na propriedade do Sr. Cláudio Laux, sob a orientação de Luiz Laux, seu filho, localizada no município de Montenegro, RS.

O pomar situa-se em uma área de topografia plana e levemente ondulada. Sendo a latitude e longitude do local, de 29°37'56``S e 51°28'15``W, respectivamente, sendo situado a 32 m acima do nível do mar (Figura 3).



FIGURA 3. Vista do pomar utilizado no experimento em campo, tangerina cv. Montenegrina, Montenegro, RS, 2007.

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso com três repetições. Foram utilizados doze tratamentos, sendo dez microorganismos e dois controles, um inoculando ADE e Tween 1% e o outro onde não foi feito nenhuma aplicação. A inoculação foi feita por meio da aspersão de uma suspensão contendo os isolados, na concentração aproximada de 1×10^6 conídios.ml⁻¹ quando fungo e 1×10^5 ufc.ml⁻¹ quando bactéria, juntamente com Tween 1%. A inoculação dos isolados endofíticos foi feita nos meses de setembro e outubro com duas aplicações. Para a avaliação da incidência da doença, foram coletados 20 frutos aleatoriamente de cada planta, com três repetições, totalizando 60 por tratamento, coletando-se os frutos com diâmetros médios de 3,5 cm. Os frutos então foram avaliados em relação incidência de pelo menos uma colônia típica de *G. citricarpa* com presença de picnidiósporos.

O presente experimento foi conduzido durante o período de setembro de 2007 a março de 2008.

3.7 Delinhamento experimental e Análises estatísticas

No pareamento dos microorganismos *in vitro*, os dados utilizados foram o diâmetro médio de colônias, com três repetições, analisados por ANOVA com pós teste de Tukey ($p=0.05$), utilizado o programa estatístico SOC/NTIA (EMBRAPA).

Nos experimentos de inoculações em casa de vegetação e em campo, a análises de variância foram representadas em percentagem, segundo delineamento inteiramente casualizado com 3 repetições, foram analisados através de ANOVA com pós teste de Tukey ($P=0.05$), utilizado o programa estatístico SOC/NTIA (EMBRAPA).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Isolamento de *G. citricarpa*

Das lesões de *G.citricarpa* em folhas e Frutos (Figura 4), foram obtidos 39 isolados, sendo 27 isolados provenientes da cultivar Montenegrina, seis da Pareci, três da Laranja do Céu, dois da Laranja de Umbigo e um da Ponkan. A frequência maior de isolados na cultivar Montenegrina se justifica pelo fato que as coletas nesta cultivar foram em maior número e que a região é a maior produtora desta cultivar (Tabela 1).

Poucos isolados provenientes de folhas foram obtidos, pois a frequência de isolados obtidos de lesões em folhas apresentou como agente causal *Alternaria sp.* em maior frequência.

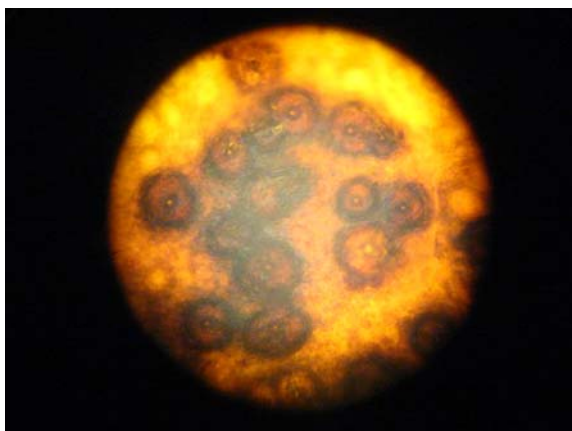


FIGURA 4. Sintomas de mancha preta tipo mancha dura, em lesões deprimidas na superfície da casca de tangerina Montenegrina (*Citrus deliciosa* Tenore), amostrado em Montenegro, RS, 2007.

TABELA 1. Isolados de *Guignardia citricarpa* e seus respectivos tecidos de origem, cultivar de citros, Montenegro, RS, 2007.

| nº isolado | Tecido | Cultivar | Município |
|-------------------|---------------|-----------------|------------------|
| GC12 | Folha | Montenegrina | Montenegro |
| GC 19 | Folha | Montenegrina | Montenegro |
| GC 21 | Folha | Montenegrina | Montenegro |
| GC 102 | Fruto | Montenegrina | Montenegro |
| GC 103 | Fruto | Montenegrina | Montenegro |
| GC 120 | Fruto | Montenegrina | Montenegro |
| GC 122 | Fruto | Montenegrina | Montenegro |
| GC 124 | Fruto | Montenegrina | Montenegro |
| GC 125 | Fruto | Montenegrina | Montenegro |
| GC 126 | Fruto | Montenegrina | Pareci Novo |
| GC 127 | Fruto | Montenegrina | Pareci Novo |
| GC 128 | Fruto | Montenegrina | Pareci Novo |
| GC 130 | Fruto | Montenegrina | Pareci Novo |
| GC 131 | Fruto | Montenegrina | Pareci Novo |
| GC 132 | Fruto | Montenegrina | Pareci Novo |
| GC 133 | Fruto | Montenegrina | Pareci Novo |
| GC 134 | Fruto | Montenegrina | Pareci Novo |
| GC 135 | Fruto | Montenegrina | Pareci Novo |
| GC 136 | Fruto | Montenegrina | Pareci Novo |
| GC 138 | Fruto | Montenegrina | Pareci Novo |
| GC 139 | Fruto | Ponkam | Pareci Novo |
| GC 140 | Fruto | Montenegrina | Barão |
| GC 141 | Fruto | Montenegrina | Montenegro |
| GC 142 | Fruto | L. do Céu | Montenegro |
| GC 143 | Fruto | L. do Céu | Montenegro |
| GC 144 | Fruto | L. do Céu | Montenegro |
| GC 145 | Fruto | Pareci | Montenegro |
| GC 146 | Fruto | Pareci | Montenegro |
| GC 147 | Fruto | Montenegrina | Montenegro |
| GC 148 | Fruto | Montenegrina | Montenegro |
| GC 150 | Fruto | Pareci | Montenegro |
| GC 151 | Fruto | Pareci | Montenegro |
| GC 153 | Fruto | Montenegrina | Montenegro |
| GC 154 | Fruto | Pareci | Montenegro |
| GC 155 | Fruto | Pareci | Montenegro |
| GC 156 | Fruto | Montenegrina | Barão |
| GC 157 | Fruto | Montenegrina | Tupandi |
| GC 158 | Fruto | L. Umbigo | Tupandi |
| GC 158 | Fruto | L. Umbigo | Barão |

4.2 Isolamento de microorganismos endofíticos dos citros

Foram isolados um total de 393 endófitos de fragmentos de folha, ramos e frutos de plantas de citros, sendo 335 fungos filamentosos, 55 bactérias e três leveduras (Tabela 2).

TABELA 2. Frequência total e relativa de microorganismos endofíticos isolados de citros em seus respectivos tecidos vegetais. Porto Alegre, RS, 2007.

| Grupo de isolados | Órgão da Planta | | | Total |
|---------------------|-----------------|-------------|------------|--------------|
| | Folhas | Ramos | Fruto | |
| Fungos Filamentosos | 313 (69,64%) | 17 (4,32%) | 5 (1,27%) | 335 (85,24%) |
| Bactérias | 15 (1%) | 23 (3,8%) | 17 (4,32%) | 55 (13,99%) |
| Leveduras | 2 (0,5%) | 1(0,25%) | 0 | 3 (0,75%) |
| Total | 330 (83,71%) | 41 (10,68%) | 22 (5,59%) | |

Na tabela 2, pode-se observar que os fungos filamentosos foram mais frequentes em folhas em relação às bactérias. Já nos ramos e frutos foi observado o inverso, sendo as bactérias mais preponderantes. Resultados estes também observados por Sartori (2003). Souza (2004) afirma que as folhas são por onde inicialmente os fungos colonizam as plantas, apesar das folhas apresentarem uma janela de infecção pequena durante o crescimento foliar, cerca do primeiro terço do seu crescimento.

As folhas foram a parte da planta mais coletada, podendo assim justificar a maior frequência de microorganismos endofíticos isolados. Além disso, sabe-se que a parte da planta que apresenta uma maior área superficial específica é a foliar, receptando assim um maior número de esporos. Já nos ramos e frutos, a frequência de bactérias em maior número pode ser justificada por se tratarem de tecidos que apresentam um maior fluxo de seiva, fundamental para a translocação dos microorganismos na planta, que a colonizam de uma forma sistêmica.

4.3 Identificação de fungos endofíticos

Foram isolados 338 fungos endofíticos, sendo 315 de folhas, 18 de ramos e 5 de frutos (Tabela 3).

TABELA 3. Identificação de fungos endofíticos isolados de plantas cítricas e seus respectivos tecidos de origem. Porto Alegre, RS, 2008.

| Gêneros | folhas | ramos | frutos | total |
|---------------------------|---------------|--------------|---------------|--------------|
| <i>Alternaria ssp.</i> | 76 | 2 | 5 | 83 |
| <i>Colletotrichum sp.</i> | 15 | 0 | 0 | 15 |
| <i>Bipolaris sp.</i> | 13 | 0 | 0 | 13 |
| <i>Xylaria sp.</i> | 22 | 0 | 0 | 22 |
| <i>Trichoderma sp.</i> | 5 | 0 | 0 | 5 |
| <i>Fusarium sp.</i> | 5 | 0 | 0 | 5 |
| <i>Cladosporium sp.</i> | 2 | 0 | 0 | 2 |
| Identificados | 138 | 2 | 5 | 145 |
| Não identificados | 177 | 16 | 0 | 193 |
| Total | 315 | 18 | 5 | 338 |

A observação das características morfológicas dos isolados através da microscopia óptica possibilitou a identificação de alguns gêneros (Tabela 3). A maior frequência de *Alternaria sp.*, que é agente causal de podridões florais em citros e lesões necróticas em folhas, em relação a *G. citricarpa* verificada neste trabalho é semelhante à observada no isolamento de fungos em pomares de macieira (Johnston, 1994; Sartori, 2003), em tecidos de bananeira (Photita *et al.*, 2001), em eucalipto (Bertoni & Cabral, 1988), em folhas de milho e soja (Fisher *et al.*, 1992) e em Catáceas (Fisher *et al.*, 1994), demonstrando que é um gênero de espectro de ocorrência bem abrangente. Com relação a diversidade de fungos isolados, sete gêneros puderam ser identificados. Este resultado está de acordo com os de Pereira *et al.* (1993), que isolaram um grande número de espécies, nas quais se incluem *Colletotrichum sp.* e *Xylaria sp.*, de plantas tropicais pertencentes a diversos gêneros, e com os de Glienke (1995), que encontrou *Colletotrichum sp.* colonizando endofiticamente em citros.

Isolados de *Fusarium* spp. têm sido detectados em raízes de diferentes variedades de bananeira em diversos países para a utilização como agentes de controle biológico de nematóides (Speijer, 1993; Amin, 1994; Schuster *et al.*, 1995). Metabólitos tóxicos produzidos por *Fusarium* sp. endofítico não patogênico foram considerados por Hallmann & Sikora (1996) agentes potenciais da redução da atividade de *Meloidogyne incognita*.

O microorganismo *Trichoderma* sp. que também foi identificado como endofítico de citros neste trabalho, é um gênero de distribuição ampla em diferentes tipos de habitats naturais, principalmente nos que possuem matéria orgânica. Trata-se de um micoparasita necrotrófico que controla diversos fungos fitopatogênicos (Lifshitz *et al.*, 1986; Melo, 1998; Wolfheckel *et al.*, 1992; Bailey & Gilligan, 1997). Nos últimos anos, a atividade biocontroladora de *Trichoderma* vem sendo estudada, principalmente a respeito da produção de enzimas extracelulares que degradam a parede celular dos fungos, tais como celulases, quitinases, α -1-D-glucanases, α -1,4-glucosidases e proteases. Espécies, como *T. reesei* e *T. viride*, são utilizadas para a produção de celulase em escala industrial (Schaffner & Toledo, 1991).

Diversos fungos filamentosos endofíticos não produzem estruturas reprodutivas em meio de cultura foram relatados por (Azevedo *et al.*, 2000; Pena, 2000; Rubini, 2003; Camatti-Sartori, 2003), dificultando assim sua identificação por características morfológicas.

4.4 Identificação de bactérias endofíticas

Foram isoladas 55 bactérias endofíticas, sendo 15 provenientes de folhas, 23 de ramos e 17 de frutos (Tabela 4). Estas foram reunidas em 6 morfótipos, de acordo com seu crescimento e coloração.

TABELA 4. Características morfológicas e freqüência de isolamento nos diferentes tecidos e cultivares de origem. Porto Alegre, RS, 2008.

| Característica da colônia | Origem dos isolados | | |
|---|---------------------------|--|----------------------------|
| | folha | fruto | ramo |
| Coloração branca, crescimento rápido | Bac1(5) (Montenegrina) | | Bac1(2) (Montenegrina) |
| Coloração branca, crescimento lento | Bac2(8) (Montenegrina) | Bac3 (3) (lima) Bac4(2) (Montenegrina) | Bac4(10) (Montenegrina) |
| Coloração amarela translúcida, crescimento lento | | Bac5(3) (Ponkam) | Bac5(8) (Ponkam) |
| Coloração amarela translúcida, crescimento rápido | | Bac6(2) (L. Valencia) | |
| Coloração bege, crescimento lento | Bac7(2) (Montenegrina) | | |
| Coloração rosa translúcida, crescimento rápido | | Bac8(7) (Montenegrina) | Bac8(3) (Montenegrina) |

Os isolados representando o morfótipo Bac1 foram obtidas tanto de folhas quanto de ramos da cultivar Montenegrina, assim como Bac3. Já os morfótipos Bac4, Bac5 e Bac8, apresentaram ocorrência em frutos e em ramos, os demais morfótipos em um determinado tecido vegetal, resultado este, podendo ser alterado ou correlacionado dependendo da quantidade e freqüência de coletas e fisiologia da planta ao longo do ano, dinâmica esta já observada em isolados de pomares de macieira por Camatti-Sartori (2003).

O padrão de coloração de gram para todos os isolados foi determinado e está apresentado na tabela 5. A maioria dos isolados é gram positivo, com exceção dos isolados Bac3 e Bac6 que apresentaram resultado negativo na coloração de gram.

O isolado Bac6 foi compatível com *Pseudomonas* ssp. Pelos testes bioquímicos apresentados, comparado com a literatura.

Os isolados Bac1 e Bac 2, apresentaram características morfológicas e bioquímicas do gênero *Bacillus* ssp. Sendo a espécie *Bacillus* ssp. descrita como a mais usada como antagonista a patógenos (Bacon *et al.*, 2000). Em colmo, folhas e nódulos de trevo vermelho, Sturz e colaboradores (1997) mostraram colonização de isolados endofíticos *Bacillus* ssp. e *Pseudomonas* ssp. em raízes de canola e trigo foi encontrada uma alta proporção de *Bacillus* ssp. e *Pseudomonas* ssp., isolados como endofíticos além de outros (Germida *et al.*, 1998; Misko & Germida, 2002).

TABELA 5. Testes bioquímicos de isolados de bactérias endofíticas de plantas cítricas.

| Teste | isolado | | | | | | | |
|-------------------------------|---------|-------|------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | Bac 1 | Bac 2 | Bac3 | Bac 4 | Bac 5 | Bac 6 | Bac 7 | Bac 8 |
| GRAM (KOH 3%) | + | + | - | + | + | - | + | + |
| H ₂ O ₂ | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Fix./Cor. | + | + | - | + | + | - | + | + |
| Oxidase | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Malonato | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Raminose | + | + | + | + | + | - | + | + |
| Adonitol | + | + | - | + | + | + | + | + |
| Salicina | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Arabinose | + | + | - | + | + | - | + | + |
| Inositol | - | - | - | - | + | - | + | - |
| Sorbitol | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Sacarose | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Manitol | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Rafinose | - | - | + | - | + | - | + | + |

4.5 Estudo do antagonismo dos isolados contra *G. citricarpa*

Para o teste de antagonismo foram selecionados dois isolados de *G. citricarpa*, Isolado GC21 proveniente de folha e Isolado GC122 de fruto, estes apresentaram características que abrangessem o maior número de isolados. Apesar dos fungos endofíticos apresentarem a maior frequência, foram utilizado para o teste de antagonismo os tratamentos com os isolados (T58; Bac1; Bac2; Bac3; Bac4; Bac5; Bac6; Bac7 e Bac8) e o controle (GC21)(Tabela 6). O isolado *Trichoderma sp.* foi utilizado nos experimentos em casa de vegetação e a campo, pois este apresenta parasitismo em *G. citricarpa*, não alterando seu crescimento até o momento de sobreposição da colônia, resultados estes que não diferiram do controle.

TABELA 6. Diâmetro médio do isolado GC21 confrontado em placas de Petry com os isolados endófitos Bac1, Bac2, Bac3, Bac4, Bac5, Bac6, Bac7, Bac8 e T58(*Saccharomyces cerevisiae*).

| tratamento | N | Diâmetro(mm) | grupo |
|------------|---|--------------|---------|
| T58 | 3 | 47.166667 | a |
| GC21 | 3 | 39.333333 | a b |
| Bac5 | 3 | 38.333333 | b c |
| Bac4 | 3 | 35.666667 | b c d |
| bac6 | 3 | 34.666667 | b c d |
| Bac3 | 3 | 32.666667 | b c d e |
| Bac2 | 3 | 32.333333 | b c d e |
| Bac7 | 3 | 29.833333 | c d e |
| Bac1 | 3 | 27.333333 | d e |
| Bac8 | 3 | 25.833333 | e |

*medias com a mesma letra não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($P=0.05$).

Os isolados Bac1, Bac7 e Bac8, apresentaram diferença estatística quando pareados com o isolado GC21 proveniente de folha. Sendo o isolado Bac1 e Bac7 isolados provenientes de folhas e o isolado Bac8 de frutos, dado este, interessante quando pareado com o isoldado GC21, demosntrando in vitro o potencial destes morfótipos de inibirem o crescimento de *G. citricarpa* in vitro. Porém quando

analisados com o pareamento do isolado GC122 (Tabela 7), proveniente de fruto, não demonstraram diferença estatística.

Os Isolados Bac3 e Bac6, quando pareados com GC122, demonstraram significância estatística na inibição do crescimento de GC122, ambos os morfótipos foram isolados de frutos, demonstrando o potencial de colonizarem e competirem com *G. citricarpa* no mesmo meio, dado este, analisado *in vitro*.

Os resultados diferiram quando os isolados foram pareados com os diferentes isolados de *G. citricarpa*, demonstrando possível variabilidade do patógeno, dados estes já apresentados por Baayen (2002).

Bac8 isolado proveniente de fruto, pareado com GC122, não teve diferença quando comparado com o controle, já com GC21, foi o isolado que mais diferiu estatisticamente. T58, *Saccharomyces cerevisiae*, em ambos os isolados de *G. citricarpa*, induziram o crescimento *in vitro*, demonstrando que esta linhagem comercial de *S. cerevisiae* não tem efeito antagônico frente a *G. citricarpa*. porém a utilização de outros isolados de ambos pode apresentar resultados distintos, como foi verificado por Fialho (2004), que utilizando outras linhagens de *S. cerevisiae* demonstrou inibição do crescimento do fitopatógeno *in vitro*, não descartando assim, outros mecanismos envolvidos na interação.

As condições dos resultados *in vitro* dos pareamentos são bem distintos dos que ocorrem a campo e em casa de vegetação, pois nessas situações diversos outros fatores estão interagindo nessas inter-relações. O desempenho individual de cada um dos endofíticos no antagonismo a *G. citricarpa* deve ser tomado com cuidado. Analisando um mesmo endofítico em relação aos dois isolados de *G. citricarpa*, observa-se que o crescimento destes é inibido com intensidades bem diferentes (Tabelas 6 e 7)(Figura 5), o que indica uma possível especialização

TABELA 7. Diâmetro médio do isolado GC122 confrontado em placas de Petry com os isolados endofíticos Bac1, Bac2, Bac3, Bac4, Bac5, Bac6, Bac7, Bac8 e T58 (*Saccharomyces cerevisiae*).

| Tratamento | n | diâmetro | grupo |
|------------|---|----------|-------|
| T58 | 3 | 49.83 | a |
| Bac8 | 3 | 41.66 | ab |
| GC122 | 3 | 40.66 | b |
| Bac4 | 3 | 40.00 | b |
| Bac7 | 3 | 39.66 | b |
| Bac2 | 3 | 38.83 | b |
| Bac1 | 3 | 38.33 | bc |
| Bac5 | 3 | 37.33 | bc |
| Bac6 | 3 | 30.00 | c |
| Bac3 | 3 | 29.83 | c |

*medias com a mesma letra não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($P=0.05$).

genética, já que isso estaria se expressando em meio de cultura com *G. citricarpa* em nível de antagonismo em função do órgão colonizado.

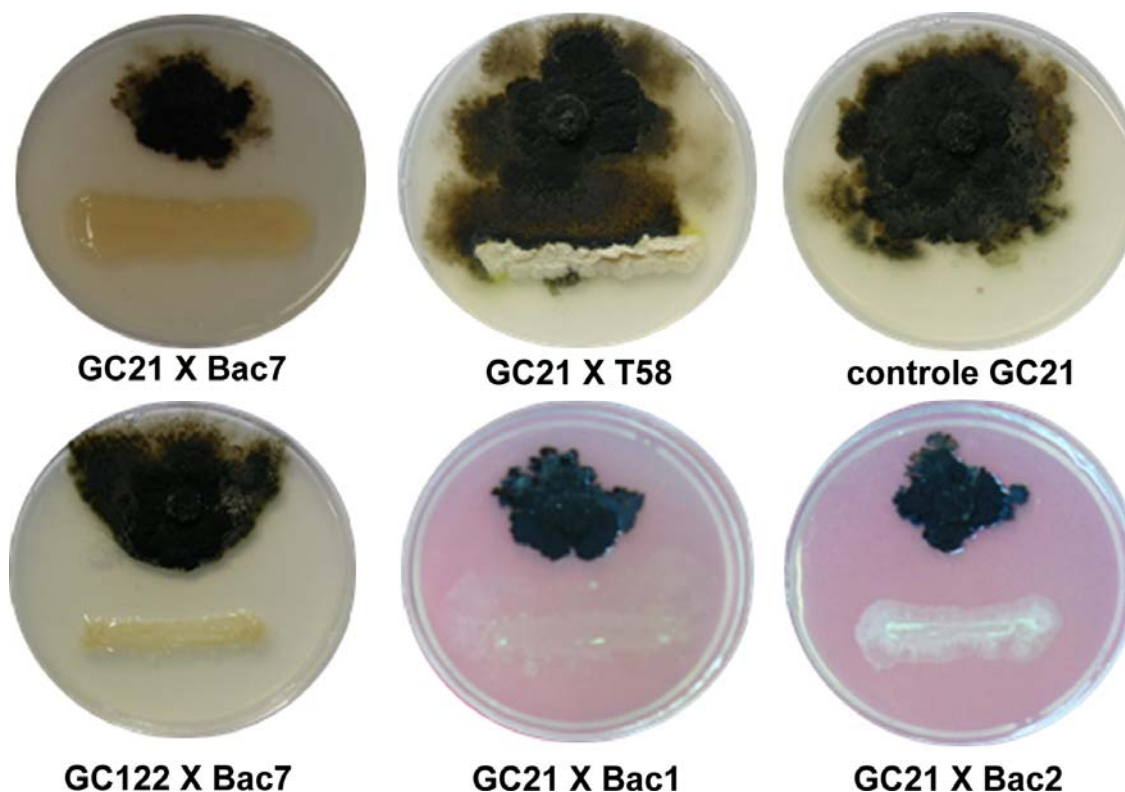


FIGURA 5. Confronto dos endofíticos com os isolados GC21 e GC122 *in vitro*.

4.6 Inoculação de endófitos e *G. citricarpa* em mudas de citros em casas de vegetação

Os isolados endófitos utilizados no experimento em casa de vegetação foram, Bac1, Bac2, Bac3, Bac4, Bac5, Bac6, Bac7, bac8 e *Trichoderma* sp. A inoculação dos isolados GC21 proveniente de folha e GC122 proveniente de fruto, foram utilizados no experimento concomitantemente.

O tratamento apresentou a maior incidência da doença, os isolados Bac1, Bac4 e Bac 6 não diferiram estatisticamente em relação ao controle (Tabela8). Os demais isolados, podem ser distribuídos em três grupos, os isolado *Trichoderma* sp. juntamente com Bac8, reduziram de 31% para cerca de 4,6% a incidência da doença, o isolado Bac2 para cerca de 7,4% e os demais isolados Bac3, Bac5 e Bac7 para cerca 14%. Interessante observar a superioridade dos isolados *Trichoderma* sp. e Bac8, sendo que *Trichoderma* sp. foi isolado de Folhas, podendo este ter uma capacidade adaptativa maior em relação a Bac8 que foi isolado do fruto. Este resultado está de acordo com o apresentado no pareamento *in vitro* quando Bac8 apresentou superioridade em relação aos demais isolados quando pareado com o isolado GC21, proveniente de folha.

TABELA 8. Média de incidência de sintomas em folhas de *G. citricarpa* da cultivar Montenegrina, inoculadas com endófitos Bac1, Bac2, Bac3, Bac4, Bac5, Bac6, Bac7, Bac8 e *Tricoderma* sp. Porto Alegre, RS, 2008.

| Tratamento | n | Incidência % | Grupo |
|------------------------|---|--------------|-------|
| Água | 3 | 0.309 | a |
| Bac6 | 3 | 0.242 | ab |
| Bac1 | 3 | 0.222 | abc |
| Bac4 | 3 | 0.178 | abcd |
| Bac5 | 3 | 0.141 | bcd |
| Bac3 | 3 | 0.117 | bcd |
| Bac7 | 3 | 0.092 | bcd |
| Bac2 | 3 | 0.074 | cd |
| Bac8 | 3 | 0.046 | d |
| <i>Trichoderma</i> sp. | 3 | 0.045 | d |

medias com a mesma letra não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($P=0.05$).

4.7 Inoculação dos endófitos a campo

Os isolados endófitos utilizados no experimento em campo foram, Bac1, Bac2, Bac3, Bac4, Bac5, Bac6, Bac7, Bac8 e *Trichoderma* sp., não foram feitas inoculações do patógeno no experimento realizada a campo.

O controle onde inoculou-se água com Tween 1%, ocorreu a maior incidência da doença, cerca de 31 % dos frutos apresentaram sintomas de *G. citricarpa* (Tabela 9). No experimento a campo utilizou-se um segundo controle, que foi denominado de branco, este foi avaliado sem a aplicação de nenhum tratamento, com o intuito de analisar se haveria alguma diferença na aleatoriedade do experimento ou influência do tratamento com água, os dados demonstraram que não houve diferença alguma.

Os comportamentos em relação à incidência de *G. citricarpa* diferiram quando comparados com a casa de vegetação, visto que, neste caso avaliou-se os frutos e não as folhas. No experimento conduzido a campo observou-se que os isolados Bac2, Bac4, Bac6, Bac7 e Bac8, diferiram em relação aos controles reduzindo os sintomas de *G. citricarpa* em fruto, Bac8 foi o morfotipo que mais diferiu reduzindo de 31% para 4,5% a incidência da doença (Tabela 9).

O isolado T58, na avaliação in vitro mostrou um aumento no desenvolvimento de *G. citricarpa*, em relação ao controle. A possibilidade de induzir o surgimento de lesões em frutos em campo não foi observada, pois T58 não diferiu em relação aos controles. Em trabalhos realizados em pós-colheita com um isolado comercial de *S. cerevisiae*, foi observado por Cheat (1995), eficiência no controle de *Penicillium digitatum* (Pers.) Sacc. (1881) em limoeiros e na redução de *Botrytis cinerea* em Kiwi (Cheah *et al*, 1994), também observou que *S. cerevisiae* competiu com os fitopatógenos através de competição pelo espaço e nutrientes. Controle de Antracnose em mamoeiras com a utilização de um produto comercial chamado Agro-

mos, que possui em sua composição mananoligossacarídeo fosforilado, derivado da parede celular de *S. cerevisiae*, foi observado por Dantas *et al.* (2004).

Tabela 9. Média de incidência de *G. citricarpa* em frutos verdes (D=3,5cm) da cultivar Montenegrina, , inoculadas com endófitos Bac1, Bac2, Bac3, Bac4, Bac5, Bac6, Bac7, Bac8 e *Trichoderma* sp. Montenegro, RS, 2008.

| Tratamento | n | Incidência % | Grupo |
|------------------------|---|--------------|-------|
| Água | 3 | 0.316 | a |
| Branco | 3 | 0.267 | ab |
| Bac3 | 3 | 0.250 | abc |
| T58 | 3 | 0.233 | abcd |
| Bac5 | 3 | 0.200 | abcde |
| Bac1 | 3 | 0.133 | bcde |
| <i>Trichoderma</i> sp. | 3 | 0.133 | bcde |
| Bac6 | 3 | 0.100 | cde |
| Bac8 | 3 | 0.100 | cde |
| Bac4 | 3 | 0.083 | cde |
| Bac7 | 3 | 0.050 | de |
| Bac2 | 3 | 0.045 | e |

medias com a mesma letra não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($P=0.05$).

A intensidade de crescimento dos isolados de *G.citricarpa*, juntamente com a incidência de lesões em folhas e em frutos, demonstram diferentes intensidades de antagonismo ao fitopatógeno, pois em cada experimento realizado, diversos fatores podem ter interferido. A utilização pratica destes microorganismos em campo para o controle de *G. citricarpa* deve ser analisada com cuidado, pois os dados demonstram que cada endofítico teve um comportamento diferenciado quando confrontado com isolados de *G. citricarpa* oriundos de tecidos diferentes e quando presentes em nichos ditintos, também observou-se comportamento diferente, caracterizando assim possíveis especializações genética ou adaptativa que estariam se expressando a nível de antagonismo em função do órgão colonizado.

Tomando os endofíticos isoladamente, “dois” deles chamam muito a atenção. Bac8 é muito eficiente no controle da pinta preta no ensaio em casa de vegetação

(tabela 8). No ensaio em campo, Bac8 também se destaca no controle, sendo estatisticamente superior ao controle com água (tabela 9). É interessante observar que o fato de Bac8 ter sido muito superior no controle da pinta em casa de vegetação pode ser devido a uma possível “menor especialização” de *G. citricarpa* nas folhas, visto que a avaliação da doença foi feita sobre folhas. Fato que reforça o que foi observado nos pareamentos, onde Bac8 inibiu o crescimento de *G. citricarpa* isolado da folha com intensidade superior ao isolado de frutos. *Trichoderma* sp. também mostrou ser um agente com potencial para ser usado no controle da pinta no ensaio em casa de vegetação, enquanto a campo não difere estatisticamente do controle. Porém em casa de vegetação analisou-se as folhas, local de origem do isolado de *Trichoderma* sp., já em campo analisou-se os frutos, dado este também observado na frequência de fungos em maior proporção em folhas e menor em frutos (tabela 2). Sendo um indício de que fungos endofíticos são mais adaptados às folhas onde possa existir maior diversidade da microbiota.

Bac8 e *Trichoderma* sp. foram mais eficientes no controle de *G. citricarpa* em folhas enquanto Bac2 em frutos. Estes resultados sugerem que uma combinação desses dois endófitos poderia propiciar um controle mais eficiente, atuando sobre a fonte de inóculo inicial para os frutos, isto é, *Trichoderma* sp. controlando a pinta nas folhas e Bac2 atua diretamente no controle da pinta nos frutos. Certamente a ocorrência desse sinergismo ou de inibição entre os endófitos deve ser testadas.

Essa observação, em que a ocorrência/ou aplicação de mais de um endófito teria um efeito superior no controle da mancha preta, estes aplicados em diferentes estádios fenológicos da planta, vão ao encontro de um fundamento básico da agroecologia, o qual refere-se ao ambiente agrícola como um sistema complexo, dinâmico e não binário (Gliessman, 2000).

Este trabalho buscou estudar isolados da microbiota endofítica com potencial para o controle biológico de *G.citricarpa*, mediante a utilização dos recursos da agricultura local, e estes podendo ser multiplicados e gerenciados pelos próprios agricultores, através da produção caseira ou de biofábricas para suprir a demanda local. Desenvolvendo e possivelmente aplicando estes conhecimentos de uma forma racional, gerando um manejo sustentável e adaptado às condições e necessidades dos agricultores.

5 CONCLUSÕES

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

- Existem fungos filamentosos e bactérias endofíticas em tangerineiras cv. Montenegrina e de outras cultivares com potencial antagonista à *G. citricarpa*;
- Os microrganismos testados apresentaram diferentes potenciais no desenvolvimento de mecanismos de antagonismo à *G. citricarpa*;
- Os isolados endofítico de Bac2, Bac8 e *Trichoderma* sp. mostraram-se como potenciais agentes biocontroladores da MPC em folhas, em casa de vegetação e em pomares de tangerineira cv. Montenegrina, cultivada sob manejo orgânico;
- Os isolados endofítico de Bac2, Bac4, Bac6, Bac7 e Bac8, mostraram-se como potenciais agentes biocontroladores da MPC em frutos, de tangerineira cv. Montenegrina, cultivada sob manejo orgânico;

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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, 56p., 2000.

AMIN N. Untersuchungen über die bedeutung endophytischer pilze für die biologische bekämpfung des wandernden endoparasiten Radopholus similis (Cobb) **Thorne an Bananen. Ph.D.** Thesis, University of Bonn, 112 pp. 1994.

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

AVERNA-SACCÁ, R. Pústulas pretas sobre laranjas doces produzidas pelo Phoma citricarpa. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v. 15, p. 668-674, 1940.

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**, v. 92, n.5, p. 464-477, 2002.

BACON, C. W.; YATES, I. E.; HINTON, D. M.; MEREDITH, F. Biological control of *Fusarium moniliforme* in maize. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, n. 2, p. 324-332, 2001.

BAILEY, D.J. GILLIGAN, C.A. Biological control of pathozone behaviour and disease dynamics of *Rhizoctonia solani* by *Trichoderma viride*. **New Phytology**, v.136, p.359-367, 1997.

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.

BERGAMIN FILHO, A. & AMORIM, L. Doenças de plantas tropicais: epidemiologia e controle econômico. São Paulo: **Agronômica Ceres**. 1996.

BERTONI, M. D.; CABRAL, D. Phyllosphere of *Eucalyptus viminalis* II: **Distribution of endophytes**. Nova Hedwigia, v.46, p. 491-502. 1988.

BETTIOL, W.; GHINI, R. Controle biológico In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia**: princípios e conceitos. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v.1, cap.36, p.717-728.

CAMPOS, S.B. & AGUILAR-VILDOSO, C.I. Efeito da glicose e sacarose no crescimento micelial de *Guignardia citricarpa* e *Phytophthora parasitica*. **Summa Phytopathologica** 27:97. 2001. (Resumo).

CHEAH, L.H.; TRAN, T.B.; POPAY, A.J. Screening of industrial yeasts for biocontrol of *Botrytis* storage rot in Kiwi fruit. In: **New zeland plant protection conference**, p.362-363, 1994.

CHEAH, L.H.; TRAN, T.B.; POPAY, A.J. Postharvest biocontrol of *Penicillium* of lemons with industrial yeast. In: **New zeland plant protection conference** p.155-157, 1995.

COSTA NETO, P.Q.. Isolamento e identificação de fungos endofíticos da pupunha (*Bactris gasipaes* kunth) e caracterização por marcadores moleculares. **Dissertação**, Universidade do Amazonas, Manaus, 73p., 2002.

DANTAS, S.A.F.; OLIVEIRA, S.M.A.; BEZERRA NETO, E.; COELHO, R.S.B.; DA SILVA, R.L.X. Indutores de resistência na proteção do mamão contra podridões pós-colheita. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.30, n.3, p. 314-319, 2004.

DOWNING, K. J. ;LESLIE, G.; THOMSON, J. A. Biocontrol of the sugarcane borer *Eldana saccharina* by expression of the *Bacillus thuringiensis cry1Ac7* and *Serratia marcescens chiA* genes in sugarcane-associated bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 7, p. 2804-2810, 2000.

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

EMBRAPA. SOC/NTIA – **Software científico**, Campinas: centro nacional de pesquisa em Informática para a agricultura 1989. Disquete 3^{1/2} - Software.

ESTEVE-ZARZOSO, B.; BLOCH, C.; URUBURU, F.; QUEROL, A. identification of yeasts by RFLP analysis of 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.49, p. 329-337, 1999.

EVANDRO H. SCHINOR, E.H.; FRANCISCO A. A. MOURÃO, F.A.A.F.; VILDOSO, C.I.A.; JOAQUIM TEÓFILO, J.S.; Colonização de folhas de laranja 'Pêra' e variedades afins por *Guignardia citricarpa*. **Fitopatologia Brasileira**. 27(5), set-out 2002.

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**. 3d. São Paulo: Agronômica Ceres, v. 2:, cap. 25, p. 261- 296, 1997.

FISHER, P. J.; PETRINI, O.; LAPPIN SCOTT, H. M. The distribution of some fungal and bacterial endophytes in maize (*Zea mays* L.). **New Phytologist**. v. 122, p. 299-305. 1992.

FISHER, P. J.; SUTTON, B. C.; PETRINI, L. E.; PETRINI, O. Fungal endophytes from *Opuntia stricta* : a first report. **Nova Hedwigia**, v.59, p.195-200.1994.

FUNDECITRUS - FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA. **Manual técnico sobre Pinta Preta**. Araraquara: Fundo Paulista de Defesa da Agricultura, (Boletim técnico, Edição especial), 10 p. 2000.

GERMIDA, J. J.; SICILIANO, S. D.; FREITAS, R.; SEIB, A. M. Diversity of root-associated bacteria associated with field-grown canola (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). **FEMS Microbiology Ecology**, v. 26, p. 43-50, 1998.

GLIESSMAN, S.R. **Agroecologia: processos ecológicos em agricultura sustentável**. Porto Alegre. Ed. Universidade/UFRGS, 653 p. 2000.

GÓES, A. **Controle da mancha-preta dos frutos cítricos**. Laranja, Cordeirópolis, v. 9, p. 293-304, 1998.

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

HALLMANN, J.; SIKORA, R.A. Toxicity of fungal endophyte secondary metabolites to plant parasitic nematodes and soil-borne plant pathogenic fungi. **European Journal of Plant Pathology**. V.102, p. 155-162. 1996.

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

JOHNSTON, P.R. Endophytes of apple and kiwifruit. **Proceedings of the New Zealand Plant Protection Conference**. v. 47, p. 353-355. 1994.

KOLLER, O.C. **Citricultura: laranja, limão e tangerina**. Porto Alegre: 1994. p.446 Cap. 1: Importância sócio-econômica dos citros.

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

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

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

LACAVA, P.T.; ARAÚJO, W.L.; MARCON, J.; MACCHERONI JUNIOR, W.; AZEVEDO, J.L. Interaction between endophytic bacteria from citrus plants and the phytopathogenic bacteria *Xylella fastidiosa*, causal agent of citrus-variegated chlorosis. **Letters in Applied Microbiology**, v.39, p.55-59, 2004.

LACAVA, P.T.; ANDREOTE, F.D.; ARAÚJO, W.L.; AZEVEDO, J.L. Caracterização da comunidade bacteriana endofítica de citros por isolamento, PCR específico e DGGE **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, n.4, p.637-642, abril. 2006.

MCALPINE, D. Fungus diseases of citrus in Australia and their treatment. **Agric. Dep. Victoria**, Melbourne, Australia. 1899.

McCONIE, K. C. Apparent absence of *Guignardia citricarpa* Kily from localities where citrus black spot is absent. **S. Afr. J. Agric. Sci.** 7:347-354. 1964 a.

McCONIE, K. C. Orchard development and discharge of *Guignardia citricarpa* and the onset of infection in relation to the control of citrus black spot. **Phytopathology** 54:1448-1453. 1964 b.

McCONIE, K. C. Source of inoculum of *Guignardia citricarpa*, the citrus black spot pathogen. **Phytopathology** 54:64-67. 1964 c.

McCONIE, K. C. The latent occurrence in citrus and other hosts of a *Guignardia* easily confused with *G. citricarpa*, the black spot pathogen. **Phytopathology** 54:40-43. 1964 d.

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

MELO, I.S. Agentes microbianos no controle de fungos fitopatogênicos. In: MELO, I.S. & AZEVEDO, J.L. (Eds.) **Controle Biológico**, v.1. Jaguariúna, SP: EMBRAPA, 1998. p.17-67.

MISKO, A. L.; GERMIDA, J. J. Taxonomic and functional diversity of pseudomonads isolated from the roots of field-grown canola. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 42, p. 399-407, 2002.

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

PEREIRA, J.O., Fungos endofíticos dos hospedeiros tropicais *Stylosanthes guianensis* e *Musa cavendish*. **Tese de Doutorado**, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 105p.1993.

PETRINI, O. Taxonomy of endophytic fungi of aerial tissues. *In: Microbiology of the Phyllosphere*. Fokkema, N.J. & Heuvel, J. van den (eds.), Cambridge, U.K.: Cambridge University Press, p.175-87. 1986.

PHOTITA, W.; LUMYONG, S.; LUMYONG, S.; HYDE, K. D. Endophytic fungi of wild banana (*Musa acuminata*) at Doi Suthep Pui National Park, Thailand: **Mycological Research**. v.105,p. 1508-1513. 2001.

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

ROBBS, C.F.; BITTENCOURT, A.M. A mancha preta dos frutos: um dos fatores limitantes à produção citrícola do Estado do Rio de Janeiro. Guaratiba: **EMBRAPA/CTAt**, 1995, 5p. (Comunicado Técnico, 19).

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

RODOV, V.; BEN-YEHOSHUA, S.; FANG, D.; D'HALLEWIN, G.; CASTIA, T. Accumulation of phytoalexins scoparone and scopoletin in citrus fruits subjected to various postharvest treatments. **Acta Horticulturae, Natural Phenols in Plant Resistance**, v.381, p.517-523, 1994.

SANTOS, M. H. L. C. ; MARIANO, Rosa de Lima Ramos ; CAMARA, Terezinha Rangel ; ANDRADE, Arnóbio Gonçalves de ; WILLADINO, Lilia ; LIMA, Giuseppina Pace Pereira . Bactérias promotoras de crescimento no desenvolvimento de *Heliconia psittacorum* L. f.. **Hoehnea**, v. 32, n. 2, p. 1-8, 2005.

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**. 109f. Tese (Doutor em Processos Biotecnológicos), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2003.

SCHAFFNER, D.W. TOLEDO, R.T. Cellulase production by *Trichoderma reesei* when supplemented with sorbose. **Biotechnology and Bioengineering**, v.37, p.12-16, 1991.

SCHINOR, E.H.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; TEÓFILO SOBRINHO, J. colonização de folhas de laranja 'pêra' e variedades afins por *Guignardia citricarpa*, *Fitopatologia Brasileira*, V. 27(5), set - out 2002.

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

SCHMIDT, J.; DAL SOGLIO, F.K.. Queda prematura de frutos devido à incidência de pinta preta dos citros em duas cultivares de tangerineiras. In: XXXVII **Congresso Brasileiro de Fitopatologia**, 2004, Gramado, RS. *Fitopatologia Brasileira*. Brasília, DF : Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2004. v. 29. p. S99-S99.

SCHUSTER, R.P. ; SIKORA, R.A.; AMIN, N. Potential of endophytic fungi for the biological control of plant parasitic nematodes. **Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent**, V. 60, N.3, P. 1047-1052. 1995.

SIVANESAN, A. **The bitunicate ascomycetes and their anamorphs.** Germany: J. Cramer, 1984. 701p.

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

SPEIJER P.R. Interrelationships between *Pratylenchus goodeyi* Sher & Allen and strains of non-pathogenic *Fusarium oxysporum* Schl. Emd. Snyder & Hans. in roots of two banana cultivars. Ph. D. **Thesis**, University of Bonn, 200 pp. 1993.

STROBEL G, DAISY B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiol Mol Biol Rev.**, v.67, n. 4, p.491-502, 2003.

HALMMAN et al. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Can. J. Microbiol.** V. 43, p. 895-914, 1997.

STURZ, A. V.; CHRISTIE, B. R.; MATHESON, B. G.; NOWAK, J. Biodiversity of endophytic bacteria which colonize red clover nodules, roots, stems and foliage and their influence on host growth. **Biol. Fertil. Soils**, v. 25, p. 13-19, 1997.

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

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.

VERMA, S. C.; LADHA, J. K.; TRIPATHI, K. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophic from deep water rice. **Journal of Biotechnology**, v. 91, p. 127-141, 2001.

VICTÓRIA FILHO, R.; DURIGAN, J.C.; CAETANO, A. Uso de herbicidas em Citros. **Citricultura Brasileira**. 2^a ed. Campinas: Fundação Cargill, 1991. v.2.

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

WHITESIDE, J.O.; GARNSEY,S.M.; TIMMER, L.W.; **Compendium of Citrus Diseases**. St. Paul, USA : APS Press, 2 ed. 73p.1992

WOLFHECKEL, H.; FUNCK JENSEN, D. Use of *Trichoderma harzianum* and *Gliocladium virens* for the biological control of post-emergence damping-off of roots rot of cucumber caused by *Pythium ultimum*. **Journal Phytopathol.**, v.136, p.221-230, 1992.