

**UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E BIOLÓGICAS**  
**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE CONTROLE BIOLÓGICO DE *Guignardia citricarpa*  
(KIELY) FITOPATÓGENO DE CITROS COM ISOLADOS DE *Trichoderma* SPP.

**KAMILA PINTO DE AZEVEDO DE SOUZA**

CAXIAS DO SUL

2013

KAMILA PINTO DE AZEVEDO DE SOUZA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE CONTROLE BIOLÓGICO DE *Guignardia citricarpa*  
(KIELY) FITOPATÓGENO DE CITROS COM ISOLADOS DE *Trichoderma* SPP.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós –  
Graduação em Biotecnologia da Universidade  
de Caxias do Sul, visando à obtenção de grau de  
de Mestre em Biotecnologia

Orientadora: Profa. Dr. Rute Terezinha da Silva Ribeiro

CAXIAS DO SUL

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Universidade de Caxias do Sul  
UCS - BICE - Processamento Técnico

S729a Souza, Kamila Pinto de Azevedo de, 1989-  
Avaliação do potencial de controle biológico de *Guignardia citricarpa* (Kiely) fitopatógeno de citros com isolados de *Trichoderma* SPP / Kamila Pinto de Azevedo de Souza. - 2014.  
x, 59 f. : il. ; 30 cm

Apresenta bibliografia.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2014.

Orientadora: Profa. Dra. Rute Terezinha da Silva Ribeiro

1. Citricultura. 2. Pragas – Controle biológico. 3. Fungos patogênicos.  
I. Título.

CDU 2.ed.: 634.3

Índice para o catálogo sistemático:

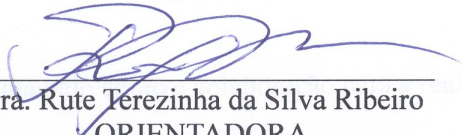
- |                                |         |
|--------------------------------|---------|
| 1. Citricultura                | 634.3   |
| 2. Pragas – Controle biológico | 632.937 |
| 3. Fungos patogênicos          | 632.4   |

Catalogação na fonte elaborada pela bibliotecária  
Nicole Tirello Acquolini – CRB 10/2297

*KAMILA PINTO DE AZEVEDO DE SOUZA*

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE CONTROLE BIOLÓGICO  
DE *Guignardia citricarpa* (KIELY) FITOPATÓGENO DE  
CITROS COM ISOLADOS DE *Trichoderma* SPP.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-  
graduação em Biotecnologia da Universidade  
de Caxias do Sul, visando à obtenção de grau  
de Mestre em Biotecnologia.


  
Dra. Rute Terezinha da Silva Ribeiro  
ORIENTADORA

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 10 DE FEVEREIRO DE 2014.

Comissão Examinadora:

  
Dr. João Lucio de Azevedo

  
Dr. Gabriel Fernandes Pauletti

  
Dr. Katiúscia Fonseca dos Santos Strassburger

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus pela vida, saúde, e coragem para a realização de mais um objetivo na minha vida.

A minha mãe Terezinha Pinto de Azevedo pelo incentivo e paciência nos momentos difíceis em que mais precisei.

Ao meu namorado Rodrigo Endres da Rosa pela paciência e colaboração para a finalização deste trabalho.

A minha orientadora Rute Terezinha da Silva Ribeiro pelos ensinamentos e conhecimentos transmitidos.

A amiga Carolina Pereira Fialho Oliveira pelo apoio emocional durante a realização deste trabalho.

A Empresa Caxiense de Controle Biológico pelo incentivo e oportunidade de realizar este trabalho.

A doutoranda Fernanda Lima pelo apoio e colaboração para a realização deste trabalho.

Enfim, agradeço a todos que colaboraram para a realização deste trabalho direta ou indiretamente e que torceram por mim.

## ÍNDICE

|  |      |
|--|------|
| LISTA DE TABELAS.....  | VII  |
| LISTA DE FIGURAS.....  | VIII |
| RESUMO.....  | IX   |
| ABSTRACT.....  | X    |
| 1. INTRODUÇÃO.....   | 11   |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....  | 13   |
| 2.1 Importância econômica da citricultura.....   | 13   |
| 2.2 Histórico da produção de citros no Brasil.....   | 14   |
| 2.3 Plantas cítricas .....   | 15   |
| 2.4 Estado fitossanitário da produção de citros no Brasil.....                                 | 16   |
| 2.5 Pinta preta dos citros.....  | 16   |
| 2.6 Sintomatologia da pinta preta dos citros.....  | 17   |
| 2.7 O patógeno <i>Guignardia citricarpa</i> e a epidemiologia da pinta preta dos citros.....   | 21   |
| 2.8 Controle da pinta preta.....   | 24   |
| 2.9 Controle biológico da pinta preta dos citros.....  | 26   |
| 2.10 <i>Trichoderma</i> spp. como agente de controle biológico.....                            | 27   |
| 3.0 MATERIAL E METÓDOS.....  | 33   |
| 3.1 Material Biológico.....  | 33   |
| 3.1.1 Fungo Fitopatogenico.....  | 33   |
| 3.1.2 Fungo Antagonista.....   | 33   |
| 3.2 Meios de cultivo.....  | 33   |
| 3.3 Soluções.....  | 34   |
| 3.4 Substratos.....  | 34   |
| 3.4.1 Substrato micélio desativado de <i>Guignardia citricarpa</i> .....                       | 34   |
| 3.4.2 Substrato de micélio desativado dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp. ....             | 34   |
| 3.5 Desenvolvimento de conídios dos isolados T17, T4, T8, e T1A de <i>Trichoderma</i> spp..... | 35   |
| 3.6 Avaliação in vitro de antagonismo.....   | 35   |

|         |   |    |
|---------|---|----|
| 3.7     | Avaliação in vitro do efeito dos compostos voláteis liberados pelos isolados de <i>Trichoderma</i> spp.....                           | 35 |
| 3.8     | Avaliação da atividade enzimática dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp.....   | 36 |
| 3.8.1   | Cultivo de <i>Trichoderma</i> spp. em meio específico para indução de atividade enzimática.....                                       | 36 |
| 3.8.2   | Ensaio para determinação da atividade enzimática .....  | 36 |
| 3.8.2.1 | Atividade de quitinase.....   | 36 |
| 3.8.2.2 | Hidrólise enzimática e dosagem de N-acetilglicosamina.....  | 37 |
| 3.9     | Sobrevivência dos conídios dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp. na parte aérea das mudas de laranjeiras da Variedade Valencia..... | 37 |
| 3.10    | Análise estatística .....   | 38 |
| 4.0     | RESULTADOS E DISCUSSÃO.....   | 39 |
| 4.1     | Antagonismo em cultura dupla.....   | 39 |
| 4.2     | Inibição de crescimento do isolado de <i>Guignardia citricarpa</i> por compostos voláteis.....  | 41 |
| 4.3     | Atividade quitinase.....  | 42 |
| 4.4     | Avaliação da sobrevivência dos conídios de isolados de <i>Trichoderma</i> spp. em condições de ambiente.....                          | 45 |
| 5.0     | CONCLUSÕES.....   | 47 |
| 6.0     | PERSPECTIVAS.....   | 48 |
| 7.0     | REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....   | 49 |

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1. Substâncias produzidas por <i>Trichoderma</i> spp. e suas atividades..... | 29 |
|---|----|



## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 1. Mancha preta ou mancha dura ( <i>G. citricarpa</i> ) (Fundecitrus, 2000).....  | 18 |
| Figura 2. Mancha de falsa melanose ( <i>G. citricarpa</i> ) (Fundecitrus, 2000).....   | 18 |
| Figura 3. Mancha rendilhada ( <i>G. citricarpa</i> ) (Fundecitrus, 2000).....  | 19 |
| Figura 4. Mancha trincada ( <i>G. citricarpa</i> ) (Fundecitrus, 2000).....  | 19 |
| Figura 5. Mancha sardenta ( <i>G. citricarpa</i> ) (Fundecitrus, 2000).....  | 20 |
| Figura 6. Mancha virulenta ( <i>G. citricarpa</i> ) (Fundecitrus, 2000).....   | 20 |
| Figura 7. Sintoma de pinta preta em folhas (Fundecitrus, 2000).....  | 21 |
| Figura 8. Ciclo do <i>Guignardia citricarpa</i> (Timmer, 1999).....  | 22 |
| Figura 9. <i>Trichoderma harzianum</i> em meio de cultura solido batata-dextrose-ágar (Arquivo pessoal, 2013).....   | 29 |
| Figura 10. Antagonismo das linhagens T8, T4, T17 e T1A <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>Guignardia citricarpa</i> (Arquivo pessoal, 2013).....   | 39 |
| Figura 11. Antagonismo in vitro das linhagens T8, T4, T17 e T1A <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>Guignardia citricarpa</i> (Arquivo pessoal, 2013).....  | 40 |
| Figura 12. Inibição do desenvolvimento de <i>G. citricarpa</i> por compostos voláteis produzidos e liberados pelos isolados T17, T1A, T4 e T8 de <i>Trichoderma</i> spp (Arquivo pessoal, 2013).....   | 41 |
| Figura 13. Inibição in vitro do desenvolvimento de <i>G. citricarpa</i> por compostos voláteis produzidos e liberados pelos isolados T17, T1A, T4 e T8 de <i>Trichoderma</i> spp (Arquivo pessoal, 2013).....  | 42 |
| Figura 14. Atividade quitinase de <i>Trichoderma</i> T17, induzido por glicose (meio 1); glicose + micélio desativado de <i>G. citricarpa</i> (meio2); micélio desativado de <i>G. citricarpa</i> (meio3) e; micélio desativado de <i>Trichoderma</i> T17 (meio 4) spp (Arquivo pessoal, 2013).....                | 43 |
| Figura 15. Atividade quitinase de <i>Trichoderma</i> T1A, induzido por glicose (meio1); glicose + micélio desativado de <i>G. citricarpa</i> (meio 2); micélio desativado de <i>G. citricarpa</i> (meio 3) e; micélio desativado de <i>Trichoderma</i> T1A (meio 4) spp (Arquivo pessoal, 2013).....               | 44 |
| Figura 16. Sobrevivência dos isolados. A) <i>Trichoderma</i> sp. isolado T1A aspergidos sobre folhas de laranjeiras. B) <i>Trichoderma</i> sp. isolado T17 aspergidos sobre folhas de laranjeiras. As letras iguais não apresentam diferença significativa entre si ( $P \leq 0,05$ ) (Arquivo pessoal, 2013)..... | 45 |

## RESUMO

A cultura do citros é produzida mundialmente, sendo consumidos in natura ou na forma de produtos industrializados. Os frutos cítricos são hospedeiros de muitos patógenos. A pinta preta é uma doença que afeta a citricultura, e tem como agente causal *Guignardia citricarpa* Kiely. A pinta preta dos citros é controlada mais comumente com defensivos sintéticos, mas esta prática tem acarretado em consequências indesejáveis, tais como, aumento do custo de produção, contaminação do meio ambiente, envenenamento de produtores e consumidores. Em vista disso, faz-se necessário a procura por novos defensivos agrícolas alternativos de baixo impacto ambiental. Desde muito tempo, diversos estudos têm mostrado a ação antagonista de inúmeras linhagens dos fungos do gênero *Trichoderma* sobre outros fungos. Embora existam estudos sobre o controle de *Guignardia citricarpa* kiely com espécies de *Trichoderma*, é sabido que a variabilidade genética entre linhagens do antagonista e do patógeno apresentam uma consequência diferencial na eficiência do controle. Este trabalho teve por objetivo avaliar a capacidade antagonista de quatro linhagens de *Trichoderma* spp sobre *Guignardia citricarpa*, buscando identificar os isolados que possam ser aplicadas nos cultivos de citros no Rio Grande do Sul, com incidência da pinta preta. Para tal estudo foram feitos teste de antagonismo e teste de compostos voláteis com as linhagens T1A, T4, T17 e T8 de *Trichoderma* spp. Avaliação da atividade enzimática quitinolítica com as linhagens T1A e T17 e avaliação da sobrevivência dos conídios dos isolados T1A e T17 de *Trichoderma* spp. na parte aérea das mudas de laranjeira da variedade valência. Os isolados T8, T4, T1A e T17 de *Trichoderma* spp. em cultura dupla apresentam maior velocidade de crescimento que o isolado A49/11 de *Guignardia citricarpa*, estas mesmas linhagens em cultura dupla desenvolveram micoparasitismo sobre o isolado A49/11 de *Guignardia citricarpa*. Os isolados T8, T4, T1A e T17 de *Trichoderma* spp. foram capazes de inibir o crescimento micelial do isolado A49/11 de *Guignardia citricarpa* por emissão de metabólitos voláteis. Os isolados T1A e T17 de *Trichoderma* spp. liberaram quitinases ativas na presença de micélio desativado de *G. citricarpa* e *Trichoderma* spp. A população de *Trichoderma* spp. aspergida na parte aérea das plantas reduz acentuadamente no período de trinta dias, porém ainda mantém uma concentração que possivelmente pode agir como agente de controle biológico. Sendo assim as linhagens de *Trichoderma* utilizadas neste trabalho podem ser uma alternativa aos defensivos sintéticos para o controle da pinta preta dos citros.

**Palavras chaves:** citricultura, pinta preta, controle biológico.

## ABSTRACT

The culture of citrus is produced worldwide, being consumed in natura or as industrialized products. The citric fruits, such as the orange trees, host many pathogens. The black spot is one disease that affects the citrus culture and has as its usual cause agent *Guignardia citricarpa* Kiely. The black spot of citrus is more commonly controlled with synthetic pesticides, but this measure has caused undesirable consequences such as the increase of production costs, environment contamination, producers and consumer poisoning. Due to this fact, it is necessary the search for new alternatives of agricultural pesticides of low environmental impact. Since long time ago, several studies have shown the opposite action of several lineages of fungi of genre *Trichoderma* over other fungi. Although there are studies about the control of *Guignardia citricarpa* kiely with species of *Trichoderma*, it is known that the genetic variability of the antagonist and the pathogens show a significant consequence in the efficiency control. This paper has as its objective to evaluate the antagonist capacity of four lineages of *Trichoderma* spp in controlling *Guignardia citricarpa*, looking for the identification of isolated ones that could be applied in the citrus cropping in Rio Grande do Sul, with incidence of the black spot. For this study, antagonism tests and volatile compounds tests were carried out with lineages T1A, T4, T17 and T8 of *Trichoderma* spp. Evaluation of enzyme chitinolytic with lineages T1A and T17 and evaluation survival of conidium of isolated T1A and T17 de *Trichoderma* spp in the top part of seedling of orange trees of the Valencia type. The isolated T8, T4, T1A and T17 of *Trichoderma* spp. in coupled culture show faster speed growing than the isolated A49/11 of *Guignardia citricarpa*, the same lineages of coupled culture have developed mycoparasitism over the isolated A49/11 of *Guignardia citricarpa*. The isolated T8, T4, T1A and T17 of *Trichoderma* spp were capable of inhibiting the mycelia growing of isolated A49/11 of *Guignardia citricarpa* by emission of volatile metabolites. The isolated T1A and T17 of *Trichoderma* spp released active chitinases in the presence of non active mycelium of *G. citricarpa* and *Trichoderma* spp. The population of *Trichoderma* spp. sprayed in the top parts of plants sharply reduces in the period of thirty day, however it still maintains a concentration that can possibly acts as a biologic control agent. As a consequence the lineages of *Trichoderma* spp. used in this paper can be an alternative to synthetic pesticides to control the citrus black spot.

KEY WORDS: citrus culture, *Guignardia citricarpa*, *Trichoderma* spp. biological control

## 1. INTRODUÇÃO

A cultura do citros é produzida mundialmente, seus frutos possuem características nutricionais importantes, sendo consumidos in natura ou na forma de produtos industrializados. O sistema agroindustrial citrícola no Brasil detém 40% da produção mundial de laranja e 60% do suco de laranja, ainda apresentando crescimento. Os frutos cítricos, como as laranjeiras, são hospedeiras de muitos patógenos, que manifestam-se naturalmente, que são ampliados como consequência de práticas de condução da cultura e das condições climáticas favoráveis aos patógenos. Sendo o controle dificultado, dentre outros fatores, pela resistência adquirida dos patógenos, como consequência do mal uso de agroquímicos.

Uma das doenças dos citros é a pinta preta dos citros, causada pelo fungo *Guignardia citricarpa* Kiely, que dificulta comercialização dos frutos in natura. A doença pode ser controlada por defensivos sintéticos, mas esta prática, que é muito comum, tem acarretado em consequências indesejáveis, tais como, aumento do custo de produção, contaminação do meio ambiente, envenamento de produtores e consumidores, além de propiciar o aparecimento de linhagens de patógenos resistentes.

Diante desta problemática, faz-se necessária a procura por defensivos agrícolas alternativos, que possam controlar doenças de plantas, de baixo impacto ambiental, que sejam viáveis economicamente, de fácil aplicação, e que reduzam a utilização de fungicidas sintéticos.

Desde muito tempo, diversos estudos têm mostrado a ação de antagonica de inúmeras linhagens dos fungos do gênero *Trichoderma* sobre outros fungos, o que tem lhes capacitado um efetivo controlador de alguns fungos fitopatogênicos, tais como: *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Pythium aphanidermatum*, *Fusarium oxysporum*, entre outros.

Espécies de *Trichoderma* tem atuado com sucesso como agentes de controle biológico, e são comunmente utilizadas em sistemas integrados para prevenção e controle de diversas doenças de plantas, são encontradas em diferentes formulações comerciais á base de diversas linhagens, produzidas por pequenas e médias empresas no Brasil e mais recentemente comercializada por multinacionais.

Embora existam estudos sobre o controle de *Guignardia citricarpa* kiely com espécies de *Trichoderma*, é sabido que a variabilidade genética entre linhagens do

antagonista e do patógeno apresentam uma consequência diferencial na eficiência do controle.

Este trabalho teve por objetivo geral avaliar a capacidade antagonista de quatro linhagens de *Trichoderma* spp em controlar *Guignardia citricarpa*, buscando identificar os isolados que possam ser aplicadas nos cultivos de citros no Rio Grande do Sul, como também em outros estados do país, com incidência da pinta preta. E como objetivos específicos avaliar o efeito dos isolados de *Trichoderma* spp. sobre o isolado patogênico de *Guignardia citricarpa*, por meio de confronto paralelo em placa de Petri com meio de cultura, observar se os isolados de *Trichoderma* spp. liberam substâncias voláteis nocivas a *Guignardia citricarpa*, determinar as atividades de quitinases de *Trichoderma* spp. em cultura líquida, com diferentes substratos e estimar a meia vida da população de *Trichoderma* spp. introduzido na parte aérea de plantas de citros.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Importância econômica da citricultura**

O Brasil é o líder mundial de produção de citros e de exportação de suco de laranja concentrado congelado. Segundo o Ministério de Agricultura e Produção Animal - MAPA (2012), a Citricultura representa um setor altamente organizado e competitivo, considerada uma das mais destacadas agroindústrias brasileiras, responsável por 60 % da produção mundial de suco de laranja. O Brasil é também o campeão de exportações do produto. Ainda, segundo a FAO/FAOSTAT (2012), o Brasil é o maior produtor de laranjas no mundo, seguido dos Estados Unidos e China. No Brasil, a produção está concentrada no estado de São Paulo, responsável por aproximadamente 77 % da produção.

Cerca de 50 % da produção mundial de laranja e 80% da brasileira resultam em sucos industrializados. A maior parte das importações mundiais (85%), é absorvida por apenas três mercados: Estados Unidos, Canada e União Europeia, sendo este o principal comprador. Até o ano de 2012 os percentuais de importação registrados pelo MAPA demonstraram que anualmente vem ocorrendo aumento na taxa de importação por esses países. O suco de laranja é o subproduto mais vendido, mas outros, como o bagaço, também são negociados. As exportações de sucos prontos para o consumo representam 43 % dos negócios no setor.

O cultivo de laranja no Brasil se divide em dois períodos distintos: o primeiro, de 1990 a 1999, se caracteriza pelo aumento da produção e conquista da posição de líder do setor. O segundo, a partir de 1999, se caracteriza pela consolidação da capacidade e desempenho produtivo. São colhidas, anualmente no País, mais de 18 milhões de toneladas de laranja ou cerca de 30 % da safra mundial da fruta. Para manter a liderança do setor, o MAPA tem investido no apoio a adoção de sistemas mais eficientes, como a produção integrada, com medidas para reduzir os custos, e aperfeiçoar e ampliar a comercialização do produto. O ministério tem, ainda, ação efetiva na fiscalização e prevenção ao aparecimento de pragas e doenças (MAPA, 2012).

Em relação ao mercado interno o MAPA projeta um crescimento de 0,89 % de produção de laranja, devendo chegar há 20,5 milhões de toneladas da fruta em 2018/2019.

O Rio Grande do Sul é o sexto produtor brasileiro de laranja com uma produção média de 370.592 toneladas no período de 2009 a 2011 – 1,9 % da produção nacional.

Segundo a EMBRAPA (2012), desde a década de 90, a cultura de citros vem se expandido especialmente no Médio Alto Uruguai e na Campanha gaúcha. Na Campanha estão sendo implantados pomares de perfil empresarial, de 30 a 300 hectares em média, enquanto que na do Médio Alto Uruguai, a citricultura é de base familiar, a exemplo do que ocorre nos Vales do Caí e Taquari (SEPLAG - <http://www.scp.rs.gov.br/atlas/conteudo.asp>).

Nos Vales do Caí e Taquari os agricultores produzem laranja, tangerina, lima, limão e bergamota em sistema de produção convencional e também em sistema orgânico. No sistema de produção alternativo, os fertilizantes sintéticos são substituídos por compostos produzidos a partir da compostagem de restos da lavoura, esterco e até de resíduos de agroindústrias. As plantas invasoras dos pomares são tratadas como espontâneas e não como daninhas, sendo manejadas de forma a não causarem danos econômicos e a aumentarem a diversidade biológica dos pomares, sem uso de herbicidas. No manejo das pragas e doenças, são utilizadas práticas culturais de controle biológico e de produtos naturais, na forma de caldas, que inibem a proliferação das pragas, em substituição aos acaricidas, inseticidas e nematicidas de origem sintética, o que resulta em redução no custo de produção em relação à produção convencional, mas a produção por hectare é menor em função do sistema de cultivo adotado (Oliveira *et al.*, 2010).

## **2.2 Histórico da produção de citros no Brasil**

No ano de 1501 os portugueses trouxeram da Espanha, as primeiras plantas cítricas para o Brasil. (NEVES, 2000)

Em 1800, mudas de laranja Bahía surgiram no Brasil, provavelmente a partir de uma mutação da variedade seleta, que era cultivada nos arredores de Salvador (BA). (AMARO,1973)

Já em 1880, cerca de 30 a 50 mil caixas de laranja produzidas no Ceará, eram exportadas anualmente para a Inglaterra. (AMARO,1973)

No ano de 1927 o governo de São Paulo criou o Serviço de Citricultura, vinculado ao Instituto Agrônomo de Campinas e à Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ) da USP, e os regulamentos que definiam a fiscalização da exportação foram então reformulados. (BOTEON,2006).

Em 1937, os primeiros casos da doença denominada “tristeza” foram identificados. Em poucos anos, a doença eliminou todas as plantas enxertadas em

laranja azeda (aproximadamente 10 milhões de árvores) no Estado de São Paulo.(NEVES,2000).

No ano de 1957, no sudoeste de São Paulo surgiu nova ameaça: o cancro cítrico, que tem como agente causal *Xanthomonas campestris* (pv. citri). (BOTEON, 2006).

Em 1977, foi criada a Fundecitrus (Fundo de Defesa da Citricultura), durante a Campanha Nacional de Erradicação do Cancro Cítrico promovida pelo Ministério da Agricultura. (Fundecitros, 2013).

No ano de 1988, a produção paulista superou 200 milhões de caixas. (NEVES,2000)

Em 1997, a produção brasileira de laranjas atinge recorde de 428 milhões de caixas. (NEVES,2000)

No ano 2000, foi diagnosticada pela primeira vez no Estado de Minas Gerais a “morte súbita dos citros”, causada pelo vírus da Tristeza; doença que também foi rapidamente encontrada nos pomares paulistas. (FUNDECITROS, 2013).

No ano 2002, a mancha marrom (MMC) tornou-se importante fator de redução na produção de tangerinas. Esta doença, causada por *Alternaria alternata* elevou o custo de produção da tangerina murcote. (NEVES & LOPES, 2005)

Em 2004, surgiu uma nova ameaça aos pomares paulistas, o *greening*, causado por *Candidatus liberibacter*. E conseqüentemente, o preço do suco de laranja no mercado internacional atingiu patamares recordes tendo os produtores que renegociar contratos com as indústrias de suco (Centro de Citricultura ,2006 ).

Até o momento o *greening* não foi detectado no estado do Rio Grande do Sul.

### **2.3 Plantas cítricas**

Segundo Swingle, 1967, os citros pertencem a família Rutaceae e a subfamília Aurantioideae. Dentre as frutíferas desta família encontram-se a laranja doce (*Citrus sinensis*), o limoeiro (*C. limon*), a toranjeira (*C. reticulata*), a cidreira (*C. medica*), a laranja azeda (*C. auranticum*) e a toranja (*C. grandis*).

Os frutos cítricos podem ser consumidos *in natura* ou processados industrialmente e possuem alto valor nutritivo por apresentarem alto teor de fibras, potássio e vitamina C. Da laranja, além do suco, são extraídos óleos essenciais e líquidos aromáticos. O bagaço de citros, com alto teor energético, é um subproduto industrial de expressivo valor econômico, para alimentação animal, sobretudo para ruminantes e, em especial para a vaca de leite.



## 2.4. Estado Fitossanitário da Produção de Citros no Brasil

Segundo Neves (2000), os problemas fitossanitários na citricultura são de grande importância, pois o custo com defensivos químicos chega a 45 % do custo de produção. Entre estes problemas que acometem as plantas cítricas estão as doenças causadas por fungo fitopatogênicos. As doenças de origem fúngica mais comuns são a gomose (*Phytophthora* spp.), a verrugose [*Elsinoë fawcettii* (anamorfo: *Sphaceloma fawcettii*) e *E. australis* (*S. australis*)], a melanose e podridão peduncular [*Diaporthe citri* (anamorfo: *Phomopsis citri*)], a podridão floral dos citros ou estrelinha (*Colletotrichum acutatum*), a mancha graxa [*Mycosphaerella citri* (anamorfo: *Stenella citri-grisea*)], a mancha marrom, podridão negra e mancha foliar de *Alternaria* (*Alternaria alternata*), a antracnose [*Glomerella cingulata* (anamorfo: *Colletotrichum gloeosporioides*)], a rubelose (*Erythricium salmonicolor* (sin. *Corticium salmonicolor*), e a mancha-preta ou pinta-preta [*Guignardia citricarpa* (anamorfo: *Phyllosticta citricarpa*)]. Para o comércio de frutas *in natura* e a exportação esta última tem grande importância devido ao aspecto dos frutos e a forma de tratamento que usualmente é o químico (Aguilar-Vildoso, 2002). Segundo a [Instrução Normativa MAPA nº 3, de 8 de janeiro de 2008, que aprova os Critérios e Procedimentos para Aplicação das Medidas Integradas em um Enfoque de Sistemas para o Manejo de Risco - SMR da Praga Mancha Preta ou Pinta Preta dos Citros \(MPC\)](#) que tem como "Art. 1º Aprovar os Critérios e Procedimentos para Aplicação das Medidas Integradas em um Enfoque de Sistemas para o Manejo de Risco - SMR da Praga Mancha Preta ou Pinta Preta dos Citros (MPC) *Guignardia citricarpa* Kiely (*Phyllosticta citricarpa* Van der Aa) em espécies do gênero *Citrus* destinadas à exportação e quando houver exigência do país importador". Nesta mesma normativa, e neste mesmo artigo, parágrafo 2º "O Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária, por meio das Instâncias Intermediárias nas Unidades da Federação - UF, delimitará e publicará, em legislação complementar, as áreas com ocorrência da praga com base em levantamentos oficiais." A seguir descrevemos esta doença, alvo do presente trabalho.

## 2.5. Pinta Preta dos Citros

A PPC, ou Pinta Preta dos Citros, causada pelo fungo *Guignardia citricarpa*, provoca depreciação estética dos frutos de *Citrus* sp., acarretando prejuízos no comércio de frutas frescas e, em decorrência das barreiras fitossanitárias as frutas não são aceitas pelos países como Estados Unidos e Comunidade Europeia. Além do efeito estético, quando ocorre alta infecção na região do pedúnculo de frutos em desenvolvimento pode haver queda prematura dos frutos, refletindo-se na produtividade do sistema (Aguilar-Vildoso, 2002).

Em 1925, esta doença foi constatada pela primeira vez na província de Natal, na África do Sul (Doidge, 1929). No ano de 1985 foi relatada na Austrália, ocasionando perdas significativas na variedade Valência, tanto nos frutos ainda nos pomares como em fase de pós-colheita (Sutton & Waterson, 1996). Posteriormente, foi detectada em diversos continentes como Ásia, África e América do Sul (Feichtenberger *et al.*, 1997).

No Brasil, esta enfermidade foi diagnosticada inicialmente no Estado de São Paulo, em 1940 a partir de frutas cítricas coletadas em uma feira livre do município de Piracicaba, (Averna-Saccá, 1940). No Estado do Rio Grande do Sul, a doença foi descrita em 1986 no Vale do Caí (Feichtenberger & Góes, 1998).

## 2.6. Sintomatologia da Pinta Preta dos Citros

Nas plantas cítricas os órgãos atacados pela doença pinta preta dos citros – PPC ou mancha preta dos citros - MPC, de maior à menor frequência são: frutos, folhas, pedúnculos, pecíolos, ramos verdes e espinhos. Uma característica importante é a ausência de sintomas típicos visuais nos tecidos vegetais jovens, mesmo já estando infectados (Aguilar-Vildoso, 2000). O surgimento dos sintomas pode demorar até um ano (fase latente), dependendo da variedade cítrica e das condições ambientais. O aparecimento dos mesmos é favorecido pela luminosidade combinada com altas temperaturas, sendo comum encontrar frutos com maior número de lesões na face exposta à luz do sol. Nos frutos em processo de amadurecimento e maduros, as lesões são estritas ao epicarpo, desfavorecendo a comercialização de frutas *in natura*. Este fato

implica em perdas econômicas, pois o fruto com lesões deixa de ser comercializado (Goes, 1998).

A pinta preta dos citros apresenta-se com vários tipos de sintomas, dependendo do tamanho, da fase de maturação do fruto, condições climáticas e tipo de esporo responsável pela infecção (Fundecitrus, 2000). As diversas sintomatologias são denominadas como a seguir:

- Mancha preta ou mancha dura – é o sintoma mais comum e surge na época da maturação externa. As lesões são deprimidas, com bordos definidos, com centros acinzentados e pontos escuros que constituem as frutificações (picnídios) (Figura1). Nos frutos verdes as lesões apresentam-se com um halo amarelado ao redor. Frutos colhidos assintomáticos podem apresentar sintomas posteriormente (Fundecitrus, 2000).



Figura 1. Mancha preta ou mancha dura (*G. citricarpa*) (Fundecitrus, 2000).

- Falsa melanose – a doença apresenta-se como pequenas lesões com numerosos pontos escuros ao redor (Figura 2). Frequentemente este sintoma é confundido com a doença melanose dos citros provocada por *Diaporthe citrus*. A diferença entre os dois tipos de sintomas está na textura: a melanose é áspera enquanto a pinta preta é lisa (Fundecitrus, 2000).



Figura 2. Mancha de falsa melanose (*G. citricarpa*) (Fundecitrus, 2000).

- Mancha rendilhada – o fungo forma lesões superficiais sem bordas definidas e textura lisa, as quais podem atingir grande parte da superfície em frutos verdes (Figura 3),(Fundecitrus, 2000).



Figura 3. Mancha rendilhada (*G. citricarpa*) (Fundecitrus, 2000).

- Mancha trincada – as lesões formadas pelo fungo são superficiais e ocorrem em pequeno número de frutos verdes. Este sintoma está sempre associado à falsa ferrugem causada pelo ácaro *Phyllocoptruta oleivora* (Fundecitrus, 2000).



Figura 4. Mancha trincada (*G. citricarpa*) (Fundecitrus, 2000).

- Mancha marrom ou sardenta – as lesões são levemente deprimidas e avermelhadas, com bordos definidos e formato irregular e, normalmente não apresentam frutificações do patógeno. Este sintoma pode ser observado em frutos maduros no período pré-colheita ou no pós-colheita durante o transporte ou armazenamento.



Figura 5. Mancha sardenta (*G. citricarpa*) (Fundecitrus, 2000).

- Mancha virulenta – este sintoma é resultado da fusão dos diferentes tipos de sintomas e caracteriza-se pela formação de lesões grandes que podem tomar grandes áreas dos frutos no decorrer do seu desenvolvimento. As lesões são escuras ou de coloração marrom, com ou sem frutificações, de formato irregular podendo ser deprimidas ou não. Geralmente as lesões surgem no final da safra quando os frutos estão maduros e expostos à temperatura do ambiente (Góes, 1998; Fundecitrus, 2000).



Figura 6. Mancha virulenta (*G. citricarpa*) (Fundecitrus, 2000).

- Manchas folhares – as folhas podem apresentar lesões irregulares de centro acinzentada, com bordos salientes marrom-escuros e circundadas por um halo amarelo. Estas lesões são frequentemente observadas em tangerinas e limoeiros verdadeiros e raramente em plantas de pomelo (Goes, 1998; Fundecitrus, 2000).



Figura 7. Sintoma de pinta preta em folhas (Fundecitrus, 2000).

## 2.7. O patógeno *Guinardia citricarpa* e a epidemiologia da pinta preta dos citros

O fungo *G. citricarpa* (Kiely), representa a fase sexual ou perfeita (teleomorfo) que foi descrita em 1948 (Kiely, 1948). A sua forma assexual ou imperfeita (anamorfo) corresponde a *Phyllosticta citricarpa* (McAlp.) Van Der Aa.), primeiramente denominada de *Phoma citricarpa* (McAlpine, 1889) (Robbs, 1990).

*G. citricarpa* está inserida no Reino Fungi, Sub-reino Dycaria, Filo Ascomycota, Classe Dothiomycetes e Ordem Botryosphaerales.

Os fatores que podem afetar de modo direto a epidemiologia da pinta preta dos citros são a disponibilidade de inóculo do fungo, o clima favorável à infecção (quente e

úmido), o ciclo de crescimento do hospedeiro e a fase de maturação do fruto em relação a suscetibilidade à infecção e eventual desenvolvimento dos sintomas (Kotzé, 1988).

De acordo com o seu ciclo biológico (Figura 8), *G. citricarpa* possui dois tipos de esporos. Os sexuados (ascósporos) se desenvolvem em pseudotécios somente nas folhas de citros em decomposição no solo (Fundecitrus, 2000). Os pseudotécios são isolados ou agregados, globosos, imersos, de cor castanha escura a preta, com 95-125  $\mu\text{m}$  de diâmetro e pseudoparáfises ausentes. Os ascos são cilíndricos clavados (40-64 x 12-15  $\mu\text{m}$ ), de parede bitunicada, contendo oito ascósporos unicelulares, hialinos, multigutulados, cilíndricos com centro dilatado e apêndices hialinos nas duas extremidades obtusas (Baldassari *et al.*, 2001).

A fase assexuada representada por *P. citricarpa* produz picnídios em lesões nos ramos, frutos e folhas e, em folhas em decomposição. Os picnídios são solitários, às vezes agregados, globosos, com 115-190  $\mu\text{m}$  de diâmetro, de coloração marrom escura para preta, ostíolo levemente papilado, circular e com 12-14,5  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Os conídios possuem formato obovoide para elíptico, hialinos, unicelulares, com um apêndice hialino em uma das extremidades, base truncada e medem 8-10,5 x 5,5-7  $\mu\text{m}$ . O conidióforo é cilíndrico e alongado com 9  $\mu\text{m}$  de comprimento (Baldassari *et al.*, 2001).

O ciclo primário da doença é constituído pela fase sexual de *G. citricarpa*, cujas estruturas infectivas são os ascósporos, responsáveis pela introdução do patógeno na área e o início da epidemia a cada ciclo da cultura. Já o ciclo secundário é caracterizado pela fase assexuada do fungo (*P. citricarpa*), sendo os conídios os responsáveis pelo aumento da incidência e severidade da doença na planta hospedeira e ao seu redor (Figura 8) (Kiely, 1948; Aguilar-Vildoso, 2002).



Figura 8. Ciclo do *Guignardia citricarpa* (Timmer, 1999).

As estruturas onde ocorrem os ascos e ascósporos são os pseudotécios, que são encontrados maduros apenas em folhas caídas no solo. A produção de ascósporos é influenciada pelas condições de temperatura e precipitação (Alcoba *et al.*, 2000) e estes quando produzidos são lançados e disseminados a grandes distâncias pelo vento, podendo atingir até 25 km de distância (Klotz, 1973). A produção de esporos sexuais é de grande importância, pois além da capacidade de dispersão possuem maior viabilidade e tolerância ao ressecamento favorecendo a sobrevivência do patógeno no campo (Alcoba *et al.*, 2000).

Os picnídios, estruturas responsáveis pela disseminação a curtas distâncias, produzem conídios formados principalmente em lesões de frutos maduros, assim como em folhas velhas e caídas e ocasionalmente em folhas novas, hastes de frutos e ramos mortos (Smith, 1996). Os conídios emergem dos picnídios através do ostíolo e estão envolvidos por uma substância mucilaginosa que é rapidamente solubilizada. Estes



esporos assexuais são transportados pela água das chuvas, orvalho ou irrigação podendo alcançar a superfície de um tecido suscetível e assim iniciar novas infecções durante o ciclo secundário da doença. As folhas infectadas quando caem no solo do pomar formam novos ascósporos, dando continuidade ao ciclo (Kieli, 1948; Kotzé, 1981; Robbs *et al.*, 1985).

O período crítico para infecção ocorre após a queda das pétalas das flores e estende-se por até seis meses de desenvolvimento dos frutos (Baldassari, 2001). Os esporos originados sexual ou assexuadamente germinam na superfície dos órgãos suscetíveis e emitem o tubo germinativo e o apressório, do qual se origina o *peg* de penetração que perfura os tecidos vegetais e entra através da cutícula, originando uma pequena massa de micélio entre a cutícula e a epiderme do órgão afetado. Nessa fase o fungo pode permanecer dormente até por um ano ou até que o fruto atinja seu tamanho final e inicie a maturação e, nas folhas caídas, até que entrem em processo de degradação. Nos frutos, o fungo cresce a partir do micélio subcuticular e coloniza tecidos mais profundos, produzindo sintomas típicos da doença (McOnie, 1997; Kotzé, 1988).

Os mecanismos envolvidos no processo destas infecções não são bem conhecidos, porém sabe-se que sintomas mais severos normalmente estão associados à elevação de temperatura, maior incidência de raios solares, estresse hídrico e debilidade das plantas como desequilíbrio nutricional, sendo as plantas mais velhas e estressadas as mais afetadas pela doença (Feichtenberger *et al.*, 1997).

## **2.8 Controle da pinta preta**

O combate às doenças em plantas é altamente dependente de defensivos químicos que de modo geral são eficazes, apresentando, no entanto, consequências indesejáveis. Estes produtos são apontados como substâncias químicas altamente tóxicas aos organismos expostos e são capazes de causar câncer e mutações genéticas em descendentes (Lima *et al.*, 2000).

Em relação ao combate da pinta preta dos citros, as medidas de controle devem considerar o período de susceptibilidade dos frutos e as fontes de inóculo do patógeno. A susceptibilidade do fruto ocorre até cerca de cinco meses após a queda das pétalas das

flores e, em folhas a susceptibilidade ao fungo ocorre até cerca da metade do seu tamanho final (quatro semanas de idade) (Aguilar-Vildoso, 2002).

Para que se possa prevenir a mancha preta, deve-se ter em mente as duas fontes de inóculos: ascósporos e conídios. No caso dos ascósporos é importante reduzir a sua produção mediante: (i) manejo da vegetação verde existente nas ruas de plantio, através do uso de roçadeiras ecológicas; (ii) uso de decompositores de folhas como a ureia ou as formulações de Compostaid® e Stable Aid®, aplicados através das barras de herbicidas; (iii) eliminação física das folhas através de “flammer” (queimador a gás) ou rastelos mecânicos conjugados com trinças e; (iv) supressão ou minimização da queda de folhas das plantas.

Para o caso dos conídios, já que esses na sua maioria são formados em galhos secos recomenda-se controlar os fatores que predisõem à sua formação, como: (i) bom manejo nutricional das plantas; (ii) controle de rubelose (*Erytricum salmonicolor*) e demais doenças que causam o secamento de galhos e ramos e; (iii) minimizar e/ou evitar a quebra de galhos e ramos (Mendes & Freitas, 2005).

De acordo com Feichtenberger *et al.* (1997), dentre as medidas clássicas de controle e prevenção da pinta preta dos citros, é também recomendado o plantio de mudas saudáveis, a remoção dos frutos temporões infectados antes do início da florada a fim de reduzir a fonte de inóculo, nutrição adequada e o uso de fungicidas.

No sistema de produção convencional, todos os talhões que apresentam plantas com sintomas de pinta preta são pulverizados, independentemente da intensidade da doença. O número de pulverizações pode variar entre seis a oito por ano, em função do histórico da doença na área, das condições ambientais, da suscetibilidade da variedade, dos fungicidas utilizados e do destino da produção (Fundecitrus, 2004).

Dentre os fungicidas registrados para a PPC em citros, encontram-se os de contato, como os a base de cobre (sulfato de cobre, hidróxido de cobre, oxiclreto de cobre e óxido cuproso) e os ditiocarbamatos (mancozeb e propineb), e com ação sistêmica do grupo dos benzimidazóis (carbendazim e tiofanatometílico) e das estrobilurinas (piraclostrobina, azoxistrobina, trifloxistrobina). Para aumentar a eficácia do controle é preconizado que os fungicidas devam ser misturados com óleo vegetal ou mineral a 0,25 - 0,5%. A aplicação de fungicidas cúpricos é feita em intervalos de quatro semanas enquanto os benzimidazóis e as estrobilurinas, mesmo em mistura com protetores, os intervalos são maiores, de até seis semanas (Feichtenberger *et al.*, 2005).

O controle químico da pinta preta dos citros depende principalmente do destino final da produção: exportação, mercado interno de fruta fresca ou processamento industrial (Laranjeira *et al.*, 2005). Caso a fruta seja destinada à indústria para a produção de suco, o controle pode ser realizado utilizando-se somente fungicida à base de cobre e óleo vegetal ou mineral (Feichtenberger *et al.*, 2005).

No entanto, cuidados devem ser observados dentro deste sistema de controle, pois o uso indiscriminado desses fungicidas já promoveu à seleção de isolados resistentes ao benomil, o que levou a restrição ao seu uso (Ghini & Kimati, 2000). A aplicação regular de fungicidas causa pressão de seleção sobre a população de patógenos, alterando a estrutura da população e aumentando a probabilidade de estabelecimento de isolados resistentes. No caso da PPC esta possibilidade pode ser potencializada pelo aumento da pressão e pela existência de duas formas do fungo, teleomórfica (*G. citricarpa*) e anamórfica (*P. citricarpa*), ambas presentes nos pomares brasileiros (Silva-Pinhati *et al.*, 2009).

## **2.9 Controle biológico da pinta preta dos citros**

Em função dos efeitos indesejáveis dos defensivos químicos sobre o ambiente, a utilização de estratégias alternativas como o controle biológico e a indução de resistência são interessantes (Pascholati, 1998).

Cook & Baker (1983) definiram controle biológico como “a redução de inóculo ou das atividades determinadas por fitopatógenos causadores de doenças, por um ou mais organismos que não o homem”.

O controle biológico determinados por micro-organismos antagonistas, pode ocorrer por meio dos diversos modos de ação, como antibiose, competição por ferro e outros nutrientes, competição por sítios de colonização, indução de resistência sistêmica na planta hospedeira, inativação de fatores de germinação e de toxinas do patógeno, parasitismo e produção de enzimas degradadoras da parede celular do patógeno (Whipps, 2001).

Nas últimas décadas vem sendo relatados resultados de pesquisas para desenvolver o controle biológico da *G. citricarpa*, como por exemplo a utilização da

levedura *Saccharomyces cerevisiae* Meyen (Pascholati, 1998; Fialho, 2004) e *Trichoderma harzianum* e *Bacillus subtilis*, micro-organismos usualmente utilizados no controle biológico de doenças de plantas (Bernardo & Bettiol, 2010).

## **2.10 *Trichoderma* spp. como agente de controle biológico**

Algumas espécies de *Trichoderma* estão entre as mais estudadas e as que mais possuem relatos de atividade antagonista aos fungos fitopatogênicos (Ribeiro *et al.*, 2002).

Segundo Samuels (1996), o gênero *Trichoderma* Persson foi descrito em 1794 para quatro espécies de fungos, e em 1969 foi novamente classificado por Rifai.

O gênero pertence ao Reino Fungi, Filo Ascomycota, Classe Euascomycetes, Ordem Hypocreales, Família Hypocreaceae (Krunger & Bacchi, 1995), sendo que até os anos de 1990 foram descritas 75 espécies de *Trichoderma* (Samuels, 1996).

Segundo Samuels 2006, até a presente data foram descritas 85 espécies do gênero *Trichoderma* sendo elas: *Trichoderma aggressivum*, *Trichoderma amazonicum*, *Trichoderma asperellum*, *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma aureoviride*, *Trichoderma austrokonigii*, *Trichoderma brevicompactum*, *Trichoderma candidum*, *Trichoderma caribbaeum* var. *aequatoriale*, *Trichoderma caribbaeum* var. *caribbaeum*, *Trichoderma catoptron*, *Trichoderma cremeum*, *Trichoderma ceramicum*, *Trichoderma cerinum*, *Trichoderma chlorosporum*, *Trichoderma chromospermum*, *Trichoderma cinnamomeum*, *Trichoderma citrinoviride*, *Trichoderma crassum*, *Trichoderma cremeum*, *Trichoderma dingleyae*, *Trichoderma dorotheae*, *Trichoderma effusum*, *Trichoderma erinaceum*, *Trichoderma estonicum*, *Trichoderma férti*, *Trichoderma gelatinosus*, *Trichoderma ghanense*, *Trichoderma hamatum*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma helicum*, *Trichoderma intricatum*, *Trichoderma konilangbra*, *Trichoderma konigii*, *Trichoderma koningiopsis*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma longipile*, *Trichoderma minutisporum*, *Trichoderma oblongisporum*, *Trichoderma ovalisporum*, *Trichoderma petersenii*, *Trichoderma phyllostahydis*, *Trichoderma piluliferum*, *Trichoderma pleuroticola*, *Trichoderma pleurotum*, *Trichoderma polysporum*, *Trichoderma pseudokonigii*, *Trichoderma pubescens*, *Trichoderma reesei*, *Trichoderma rogersonii*, *Trichoderma rossicum*, *Trichoderma saturnisporum*, *Trichoderma sinensis*, *Trichoderma sinuosum*, *Trichoderma* sp. MA 3642, *Trichoderma*

*sp. PPRI 3559, Trichoderma spirale, Trichoderma stramineum, Trichoderma strigosum, Trichoderma stromaticum, Trichoderma surrotundum, Trichoderma taiwanense, Trichoderma thailandicum, Trichoderma thelephoricolum, Trichoderma theobromicola, Trichoderma tomentosum, Trichoderma velutinum, Trichoderma virens, Trichoderma viride.*

Muitas espécies de *Trichoderma* são micoparasitas necrotróficas eficazes no controle de inúmeros fungos fitopatogênicos, principalmente aqueles com estruturas de resistência, consideradas difíceis de serem atacadas, como esporos, escleródios, clamidósporos e micro- escleródios (Melo, 1996).

O gênero *Trichoderma* possui uma vasta distribuição geográfica, ocorrendo no mundo inteiro, nos mais variados tipos de solo e habitats naturais, principalmente naqueles ricos em matéria orgânica. Diferentes espécies podem estar restritas à condições abióticas, entretanto, são escassas as informações sobre sítios preferenciais ou fatores críticos para seu crescimento e estabelecimento nos mais diferentes ecossistemas (Danielson & Davey, 1973). Este gênero de fungo também é encontrado nas raízes de diversas plantas (Parkinson *et al.*, 1963), sobre cascas de árvores caídas, especialmente quando estão lesadas por outros fungos (Danielson & Davey, 1973).

Em meio de cultura como mostra a figura (9), as colônias de *Trichoderma* spp. crescem rapidamente, apresentando superfície lisas e quase translúcidas, tornando-se posteriormente flocosas ou compactas. A coloração da colônia permeia em tons de verde (às vezes, muito claro – cor gelo), devido à pigmentação dos conídios e a quantidade de conídios produzidos, podendo ainda ser influenciada pelo tipo e pH do meio de cultivo. O micélio é composto por hifas hialinas, muito ramificadas e de parede lisa. Clamidósporos estão presentes na maioria das espécies intercaladas nas hifas ou, ocasionalmente terminais (Melo, 1991).



Figura 9. *Trichoderma harzianum* em meio de cultura sólido batata-dextrose-ágar (BDA). Fonte: Arquivo Pessoal, 2013, Laboratório de Controle Biológico.

Em relação à função no ambiente, alguns autores definem as linhagens de *Trichoderma* como organismos simbiontes, oportunistas, avirulentos, capazes de colonizar raízes de plantas por meios similares àqueles demonstrados pelos fungos micorrízicos, e de produzir compostos que estimulam o crescimento e os mecanismos de defesa das plantas (Harman *et al.*, 2004).

Desde o trabalho pioneiro de Weindling (1934), sobre a atividade de *Trichoderma* spp. contra fungos fitopatogênicos, diversos pesquisadores têm debatido a função de substâncias e enzimas envolvidos no processo de antagonismo (Belanger *et al.*, 1995).

**Tabela 1.** Substâncias produzidas por *Trichoderma* spp. e suas atividades.

| Substâncias produzidas por <i>Trichoderma</i> spp. e suas atividades        |  |                 |
|---|--|-----------------|
| Substâncias   | Atividade                                  | Autor           |
| Gliotoxinas, Viridinas, Trichoderminas, Suzucalina, Calaniticina, Dermadina | Antibiótica                                | Harman, (2000)  |
| Enzimas hidrolíticas extracelulares   | Antagonista                                | Chet, (1990)    |
| Proteases   | Degrada enzimas sintetizadas pelo patógeno | Harman, (2000)  |
| Quitinases, glucanases e peroxidases  | Indução de resistência                     | Samuels, (1996) |
| Ácido indolacético (auxina)   | Promoção de crescimento                    | Pérez, (2001)   |
| Sideróforos   | Solubilização                              | Harman, (2000)  |

Por meio da liberação de antibióticos ocorre a antibiose, propriedade muito importante apresentada pelas espécies antagônicas de *Trichoderma*, a qual resulta na inibição do desenvolvimento de muitos fungos (Bettiol, 1991). Os antibióticos podem apresentar os mais variados efeitos sobre os patógenos, desde a redução ou a paralisação

do crescimento e esporulação, redução na germinação de esporos, além de distorções nas hifas e endólise. Além destas propriedades, algumas espécies de *Trichoderma* também apresentam atividade antiviral, antimicrobiana, imunossupressora, citostática e inibidora de formação de ATP (Mello, 1998). Espécies de *Trichoderma* produzem também metabolitos tóxicos voláteis e não-voláteis que impedem a colonização de micro-organismos antagonizados, tais como os ácidos harziânico e heptelídico, alameticina, tricholina, 6-pentil-pirano, massoilactona, viridina, gliovirina, glisoprenina, entre outros. Esses metabolitos agem em sinergismo com outros mecanismos de ação para que sejam efetivas as formas de controle exercidas pelas espécies antagonistas de *Trichoderma*.

Espécies de *Trichoderma* produzem enzimas extracelulares degradadoras de parede celular, tais como quitinases, celulases, glicanases, glicosidases e proteases (Mello, 1991). De acordo com Cherif & Benhamou (1990) e Lorito *et al.* (1993), espécies antagônicas de *Trichoderma* produzem quitinases contra *Fusarium* spp. e endoquitinases e beta 1,3-glicanases contra *Rhizoctonia solani*. Segundo alguns autores, micro-organismos utilizados no controle biológico produzem enzimas quitinolíticas, o que os qualifica para o controle de doenças de plantas (Zhang *et al.*, 2000 e Zhang & Yuen, 2000), pois podem interferir no crescimento de fungos que apresentam quitina na sua estrutura (De Boer *et al.*, 1999).

De acordo com Benitez *et al.* (2004), ocorre sinergismo entre enzimas e metabólitos produzidos por *Trichoderma* spp. Este fato foi confirmado pela maior inibição do crescimento micelial de *Rizoctonia meloni* pela combinação de quitinase e beta-1,3-glucanase, do que quando estas enzimas foram utilizadas separadamente. Segundo Ridout *et al.* (1986) e Elad *et al.* (1982), as quitinases e outras enzimas que lizam a parede celular de outros organismos estão diretamente associadas ao processo de micoparasitismo. De acordo com Harman *et al.* (2004) espécies de *Trichoderma* podem atuar em biocontrole direto, infectando uma série de fungos fitopatogênicos por meio da ação de enzimas como quitinases, glicanases e proteases.

Micoparasitismo é o fenômeno que consiste em um fungo parasitar o outro. Os micoparasitas atacam hifas e estruturas de reprodução e sobrevivência dos patógenos de plantas, reduzindo a infecção e o inóculo do patógeno. Entre as espécies de *Trichoderma* são encontradas várias com atividade de micoparasitismo, eficazes no controle de inúmeros fungos fitopatogênicos, inclusive aqueles com estruturas de

resistência, consideradas difíceis de serem atacadas, como esporos, escleródios, clamidósporos e micro escleródios (Melo, 1996). Entre as diversas espécies, *T. harzianum* é talvez a mais estudada para biocontrole e provavelmente a mais efetiva (Bettiol, 1991).

Pode-se afirmar, portanto, que o micoparasitismo envolve uma série de mecanismos e ações que possibilitam os fungos do gênero *Trichoderma* spp. a parasitar outros micro-organismos. Sequencialmente, os fungos antagonistas apresentam vários passos para parasitar o fungo hospedeiro como o reconhecimento e contato com o alvo, o enrolamento em torno das hifas hospedeiras e a secreção de enzimas e metabólitos secundários que levam o fungo hospedeiro à morte.

A parede celular de fungos patogênicos é constituída principalmente por quitina, beta-1,3-glicana e proteínas que são as primeiras biomoléculas a serem atacadas pelo micoparásita até a invasão total da hifa hospedeira. A quitina representa o principal componente da parede celular fúngica e, junto com glicanos e peptídeos possuem função estrutural ou de reconhecimento entre os micro-organismos. Desta forma, enzimas capazes de hidrolisar estes biopolímeros são consideradas essenciais para a eficácia do micoparasitismo no biocontrole de fungos fitopatogênicos. beta-1,3-glicanase (Noronha *et al.*, 2000a e 2000b; Monteiro & Ulhoa, 2006; De Marco & Félix, 2007; Marcelo *et al.*, 2008), N-acetil-glicosaminidases (Silva *et al.*, 2004); proteases (De Marco & Félix, 2002; Suarez *et al.*, 2005); e quitinases (Ulhoa & Peberdy, 1991; Ulhoa & Peberdy, 1992; Lima *et al.*, 1997) tem sido alvo de pesquisas (Noronha & Ulhoa, 1996; De Marco *et al.*, 2003; Sanz *et al.*, 2004 e Sanz *et al.*, 2005; Almeida *et al.*, 2007; Tseng *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2009; Monteiro *et al.*, 2010).

O estudo dessas enzimas no processo do micoparasitismo vem contribuindo para o desenvolvimento de novas estratégias de biocontrole, inclusive já foram destacadas pelo grande potencial nas formulações de fungicidas, desempenhando o papel de componentes ativos (Hermosa *et al.*, 2000; Mohamed *et al.*, 2010).

Além da produção de enzimas degradadoras de parede celular e a produção e liberação de toxinas, *Trichoderma* spp. compete por sítios de infecção e nutrientes disponíveis com outros micro-organismos. Esta ação tem um importante papel na inibição do desenvolvimento de diferentes patógenos, impedindo a germinação de propágulos ou a própria infecção (Punja; Utkhrde, 2003).

Outra atividade demonstrada por espécies de *Trichoderma* spp. é a indução dos mecanismos de defesa das plantas (Rodov *et al.*, 1994). Esse processo ocorre quando as plantas expostas a um agente indutor têm seus mecanismos de defesa ativados, não



apenas no sitio de indução como também em outros locais dele distantes, de forma mais ou menos generalizada (Romeiro, 1999).

A sobrevivência natural de *Trichoderma* spp. depende de temperatura, umidade, aeração, pH e teor de matéria orgânica no solo. *T. viride* é um antagonista ativo, em condições de solo úmido, mas é inibido na presença de baixa umidade e acima do pH 5,4. Foi observado antagonismo de *T. harzianum* em vários valores de pH menores que 6,5, sendo a faixa ótima entre 4,5 e 5,3 (Cook & Baker, 1983). Atualmente pouco se sabe sobre a sobrevivência dos conídios de *Trichoderma* na parte aérea das plantas, porem segundo Geraldine (2011), a sobrevivência dos esporos de *Trichoderma* nessa situação é influenciada pela radiação solar e também pelas diferentes formulações em que os conídios são inoculados.

Por ser um fungo muito estudado e por ter sua eficácia comprovada no controle biológico de várias culturas, a comercialização de produtos industriais voltados para o controle biológico têm crescido mundialmente e também no Brasil. O gênero *Trichoderma* apresenta grande diversidade genética. Isolados podem ser usados para produzir material de interesse comercial e ecológico, como enzimas que degradam quitina e celulose, produtos pra biocontrole e etc (De Marco *et al.*, 2003; Lima *et al.*, 2001; Harman *et al.*, 2004).

### 3.0 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Material biológico

##### 3.1.1 Fungo fitopatogênico

*Guignardia citricarpa* A49/11 foi isolado de frutas com sintomas da doença e disponibilizado pelo Laboratório de Fitopatologia, do Bloco 74 da Agronomia, do Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul (UCS). Para os experimentos o isolado foi revigorado e mantido em meio de cultura BDA.

##### 3.1.2 Fungo antagonista

Os isolados T8, T4, T17 e T1A de *Trichoderma* spp. são mantidos na micoteca do Laboratório de Fitopatologia (Instituto de Biotecnologia – Universidade de Caxias do Sul). Para os experimentos os isolados foram revigorados e mantidos em meio de cultura BDA.

#### 3.2 Meios de cultivo

A seguir serão detalhados os meios de cultura utilizados no presente trabalho.

- CEGA: cenoura 200 g, folhas secas de eucalipto 200 g, glicose 20 g, agar 15 g e água destilada 1000 mL. O desenvolvimento do fungo *G. citricarpa* A49/11 foi realizado a 26° C, sob fotoperíodo de 12 h, por 7 dias (Guimarães, 2008).
- CEG: cenoura 200 g, folhas secas de eucalipto 200 g, glicose 20 g e água destilada 1000 mL. O desenvolvimento do fungo *G. citricarpa* A49/11 foi realizado a 26° C, sob agitação de 150 rpm, fotoperíodo de 12 h, por 7 dias (Guimarães, 2008).
- BDA (batata 200 g, dextrose 20 g, agar 15 g e água destilada 1000 mL. Os isolados de *Trichoderma* spp foram cultivados a 26° C, sob fotoperíodo de 12 h, por 7 dias (Alfenas & Mafia, 2007). para o crescimento em meio líquido foi utilizado o meio BD (batata dextrose).
- MM (meio mínimo): sulfato de amônio 6,72 g, Dihidrogenofosfato de potássio 9,60 g, Fosfato de sódio 33,12 g, Sulfato de Magnésio 1,44 g, Peptona bacteriológica 4,80 g, Ureia 1,44 g, Glicose 36 g dissolvidos em 1L de água destilada.
- MTV (Meio de *Trichoderma viride*): Fosfato de potássio dihidratado 2,4 g; Sulfato de amônio 1,68 g; Sulfato de magnésio 0,36 g; Ureia 0,36 g; Cloreto de cálcio 0,36 g; Peptona bacteriológica 1,2 g, SCS 120 □ l dissolvidos em 1,200 ml água destilada.

### 3.3 Soluções

- SL - Solução salina: NaCl 9 g; 1000 mL de água destilada e esterilizada.
- SCS - Solução concentrada de sais: Sulfato de ferro 2,5 g; Sulfato de magnésio 0,75g; Sulfato de zinco 0,7; Cloreto de cobalto 1g; 50 mL de água destilada e esterilizada.

### 3.4 Preparo dos micélios desativados

#### 3.4.1 Substrato composto de micélio desativado de *G. citricarpa*

Para produção de micélio desativado, *G. citricarpa* foi desenvolvido em meio líquido conforme metodologia modificada de Ribeiro *et al.* (2001). Propágulos do fungo desenvolvido em meio CEGA por 14 dias foram raspados da placa de Petri com auxílio de um pincel de cerdas duras e logo depois inoculados em frascos Erlenmeyer contendo meio de cultivo líquido CEG. Os frascos foram incubados em agitador orbital por 10 dias a 26° C e 150 rpm. A biomassa resultante foi filtrada em papel Whatman nº.1 e lavada três vezes em água destilada autoclavada. A biomassa de *G. citricarpa* foi seca a 50° C até o peso da amostra não sofrer mais alteração, moída em almofariz, aliqüotada, autoclavada e armazenada a – 20° C até o uso como substrato.

#### 3.4.2 Substrato composto de micélio desativado dos isolados de *Trichoderma* spp.

Para produção de micélio desativado, os isolados T1A e T17 de *Trichoderma* spp. foram desenvolvidos conforme metodologia modificada de Ribeiro *et al.* (2001). Propágulos dos isolados do fungo desenvolvidos separadamente em meio BDA por sete dias foram removidos das placas de Petri com auxílio de uma alça de Drigalsky e salina para se obter uma suspensão aquosa na concentração  $1.10^6$  conídeos.mL<sup>-1</sup>. Dez mL desta suspensão foram inoculados em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio BD. Os frascos foram mantidos em incubadora orbital a 25° C e 180 rpm por 72 h. A biomassa resultante foi filtrada em papel Whatman nº.1 e lavada três vezes em água destilada autoclavada. A biomassa dos isolados de *Trichoderma* spp. foi seca na temperatura de 50° C até seu peso estabilizar, moída em almofariz, aliqüotada, autoclavada e armazenada a -20° C até o uso como substrato.

### **3.5 Desenvolvimento de conídeos dos isolados T17, T4, T1A e T8 de *Trichoderma* spp.**

Cada um dos isolados de *Trichoderma* foi desenvolvido durante 7 dias a 28° C em sacos plásticos com volume de 5 L preenchidos com 100 g arroz parbolizado autoclavado. Após este período, foi acrescentado ao arroz colonizado pelo fungo em cada saco, 100 mL de água destilada autoclavada. O arroz foi então homogeneizado manualmente para liberação dos conídeos e em seguida coado em gaze esterilizada, obtendo-se uma suspensão de conídeos. Para o ajuste da concentração os conídeos foram contados em câmara de Neubauer e a concentração ajustada em  $1.10^6$  conídeos.mL<sup>-1</sup>.

### **3.6 Avaliação *in vitro* de antagonismo**

Para avaliar o potencial antagônico dos isolados de *Trichoderma* spp. foi utilizado o método de confronto pareado (Mariano, 1993). Um disco de cinco mm de diâmetro de ágar colonizado por micélio e retirado do bordo de uma colônia em crescimento de *G. citricarpa*, foi colocado distante um cm do bordo de uma placa de Petri contendo meio CEGA, e incubada por 7 dias a 26° C. Depois deste período, foi colocado em cada uma das placas um disco de ágar colonizado por micélio de cada um dos isolados de *Trichoderma* spp., em posição oposta à colônia de *G. citricarpa*. As placas foram incubadas sete dias a 25° C e fotoperíodo de 12 horas. Para cada isolado de *Trichoderma* ou tratamento foram realizadas três repetições e, a testemunha constituiu-se apenas do fungo fitopatogênico *G. citricarpa*. Para avaliação, foram utilizados os critérios de Bell *et al.* (1982), sendo avaliados o tempo de ocupação de 100 % da placa pelos isolados de *Trichoderma* spp. e o tamanho do halo da colônia do patógeno.

### **3.7 Avaliação *in vitro* do efeito dos compostos voláteis liberados pelos isolados de *Trichoderma* spp.**

Fundos e tampas de placas de Petri foram preparadas com meio CEGA e ajustadas tampa com tampa e fundo com fundo com filme plástico, estabelecendo-se uma distância de pelo menos 2 cm entre as superfícies do meio de cultura. Na centro da placa superior foi inoculado um disco de cinco mm de diâmetro de agar colonizado por micélio e retirado do bordo de uma colônia em crescimento de *G. citricarpa* e, na inferior um disco de cinco mm de diâmetro de agar colonizado por micélio e retirado do bordo de uma colônia em crescimento de um dos isolados de *Trichoderma*. As placas

foram sobrepostas e vedadas com filme PVC e incubadas a 26° C, por 14 dias, sob fotoperíodo de 12 horas. Cada isolado de *Trichoderma* constituiu um tratamento com três repetições mais a testemunha, apenas com o fitopatógeno (Bharat *et al.*, 1980). Para avaliação foram medidas com parquímetro os halos das colônias de *Guignardia citricarpa*.

### **3.8 Avaliação da atividade enzimática dos isolados de *Trichoderma* spp.**

#### **3.8.1 Cultivo de *Trichoderma* spp. em meio específico para indução de atividade enzimática**

Para a produção de inóculo, os isolados T17 e T1A de *Trichoderma* spp. foram cultivados em placas de Petri com meio BDA a 25° C por 7 dias e fotoperíodo de 12 h, de acordo com Ribeiro *et al.*, (2001). Depois deste período, dois mL de água destilada foram adicionados a cada placa e os conídeos coletados para a formação de uma suspensão aquosa com a concentração de  $1.10^6$  conídeos.mL<sup>-1</sup>. Um mL desta suspensão foi ajustada para  $.10^6$  conídeos.mL<sup>-1</sup> e foram inoculados em 250 mL de meio mínimo, em frascos Erlenmeyer de 500 mL. As culturas foram mantidas a 25° C em incubadora orbital, a 180 rpm por 72 h. Depois de desenvolvida, a biomassa do fungo foi coletada e lavada três vezes com água destilada autoclavada e inoculada em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo meio (MTV) com diferentes fontes de carbono, constituindo-se quatro tratamentos: (1) Glicose 1 % ; meio (2) Glicose 0,5 % + 0.5 % de micélio desativado de *G. citricarpa*; (3) micélio desativado de *G. citricarpa* 1 %; (4) micélio desativado de *Trichoderma* spp. 1 %. Para cada substrato e horário de amostragem (24, 48, 72 e 96 h) foram preparados três frascos, mantidos em agitador orbital, a 180 rpm e 25°C. As amostras foram coletadas a cada 24 horas até completar 120 h de cultivo. Para cada amostragem, a cultura correspondente foi filtrada em papel filtro Whatman n°.1. O filtrado foi alíquotado e armazenado a -20° C até o uso.

#### **3.8.2 Ensaio para determinação da atividade enzimática**

##### **3.8.2.1 Atividade quitinase**

A atividade quitinase foi analisada por liberação de N-acetil-glucosamina (GlcNAc), determinada pelo método de Reissig *et al.* (1955), utilizando-se GlcNAc (Sigma Chemical Co. St. Louis, EUA) como padrão.

### 3.8.2.2 Hidrólise enzimática e dosagem de N-acetilglicosamina

Primeiramente em tubos de ensaio foi colocado 500µL de suspensão de quitina coloidal (5µg.mL<sup>-1</sup>) em tampão acetato de 50mM como substrato, incubadas com 500µL de solução de enzima a 40°C durante 60 min, de acordo com Pinto et al. (1997).

Após foi colocado 500µL de amostra em tubos de ensaio acrescentando-se 100µL de uma solução 0,8M de tetraborato de potássio sendo esta mistura mantida em água fervente por 3 min. Os tubos de ensaio com a mesma foram resfriados em água corrente e adicionado 3mL de uma solução diluída de dimetilamino-benzaldeído (DMAB) e ácido acético (12,5 mL de ácido clorídrico 10M completado para 100 mL de ácido acético glacial). Para uso, a solução concentrada foi diluída em uma proporção de 1/10 em ácido acético glacial. As soluções contendo DMAB foram dispostas em banho maria a 36-38°C por 20 minutos e lidas em espectrofotômetro ( $\lambda= 538$  nm).

Para a obtenção da curva padrão foi preparada uma solução contendo 11mg de N-acetilglicosamina completando-se para 100 mL com água destilada. Desta solução foram utilizados volumes de 100 a 500 µL, completando-se com água destilada para um volume final de 500 µL, para a reação com 3 mL da solução de DMAB.

### 3.9 Sobrevivência dos conídeos dos isolados de *Trichoderma* spp. na parte aérea das mudas de laranjeira da variedade valência

Para avaliação da sobrevivência dos conídeos de *Trichoderma* foi utilizada a metodologia de Geraldine *et al.* (2011), modificada. O experimento foi realizado na casa de vegetação no Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul com mudas de laranjeira da variedade Valência.

Para cada isolado de *Trichoderma* spp. foi preparada uma muda de laranjeira e, em cada muda foram consideradas úteis para o experimento cinco folhas, nas quais foi delimitada uma área de 2 cm<sup>2</sup>. As folhas foram depois aspergidas com uma solução de glicose 1% em água. Após a solução de glicose secar, as folhas foram novamente aspergidas, mas com uma suspensão de conídeos de um dos isolados de *Trichoderma* spp. Para análise as folhas selecionadas foram destacadas e recortadas na área delimitada. Cada fragmento foi então colocado dentro de um tubo de ensaio com 9 mL de solução salina e submetido a agitação com aparelho vortex com rotação de 100 rpm

durante 40 segundos, para a liberação de propágulos do fungo. Em seguida, o material foi diluído de forma seriada e semeado em placas de Petri contendo meio BDA. Durante sete dias as placas foram matidas em incubadora a 28°C e fotoperíodo de 12 h. Após este período foram feitas as contagens de unidades formadoras de colônia (UFC).

A avaliação iniciou 15 minutos após a inóculoção e a seguir durante 15 dias, sendo coletadas as folhas de 3 em 3 dias. Para controle foram coletadas folhas de uma planta não inoculada.

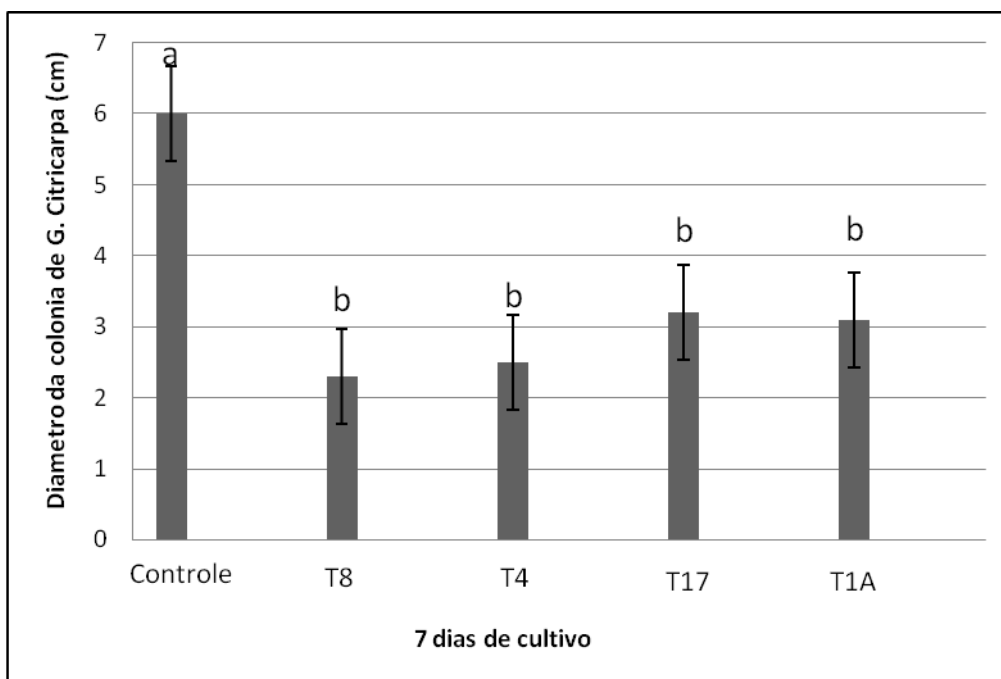
### **3.10. Análise Estatística**

Os resultados foram analisados estatisticamente pela análise da variância com o pós-teste de Tukey para um  $p < 0,05$ , utilizando-se o programa SPSS 17.0.

## 4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Antagonismo em cultura dupla

No teste de antagonismo em cultura dupla onde os fungos foram colocados em posição oposta em placa de petri, todos os isolados de *Trichoderma* spp. desafiados, exerceram ação inibitória sobre o desenvolvimento de *G. citricarpa* como podemos observar na figura abaixo.



**Figura 10.** Antagonismo das linhagens T8, T4, T17 e T1A *Trichoderma* spp. sobre *Guignardia citricarpa*. Médias com letras iguais não apresentam diferença significativa entre si ( $p \leq 0,05$ ).

Os isolados T8, T4, T17 e T1A de *Trichoderma* spp. no teste de antagonismo em placa de Petri, contra *G. citricarpa*, mostraram-se eficientes, porém sem diferenças significativas entre eles ( $p \leq 0,05$ ), sendo que cresceram sobre o patógeno tomando toda a placa cinco dias após a inoculação como mostra a figura 11. Os isolados T8 e T4 inibiram 58% e 62% respectivamente as colônias de *Guignardia citricarpa*. Este dado corrobora os resultados de Guimarães (2008) que utilizou um isolado de *T. koningii* e obteve rápido crescimento micelial no confronto pareado com *G. citricarpa* não chegando esta a alcançar 8 mm de diâmetro na colônia. Os isolados T17 e T1A inibiram



47% e 49% o crescimento micelial de *G. citricarpa* com semelhante metodologia Kupper *et al.* (2011) relataram que os isolados de *Trichoderma* spp. ACB14 e ACB40 inibiram o crescimento micelial de *G. citricarpa* em 50 e 57 % respectivamente em relação ao controle em seis dias de incubação.

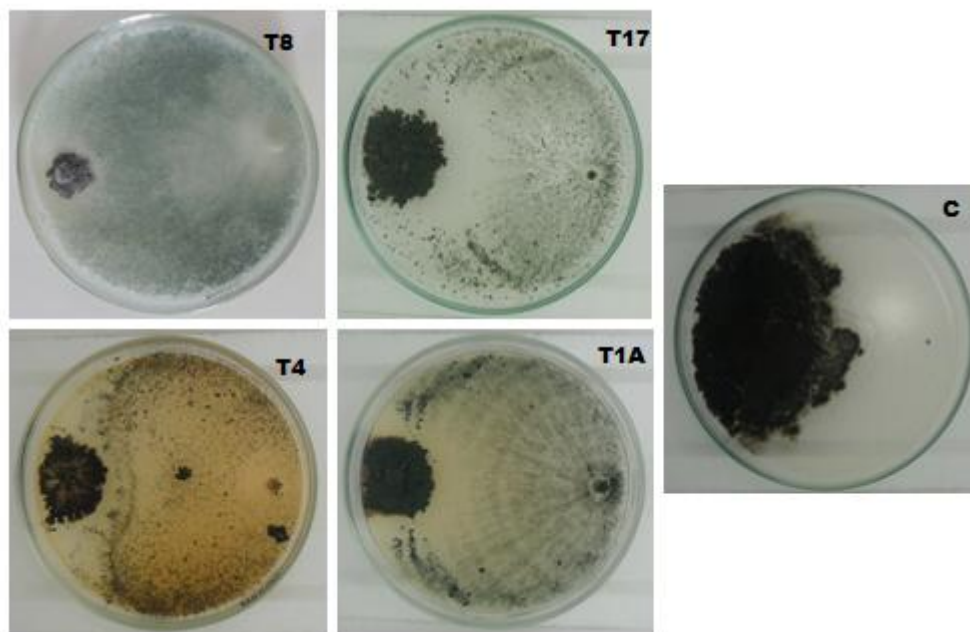
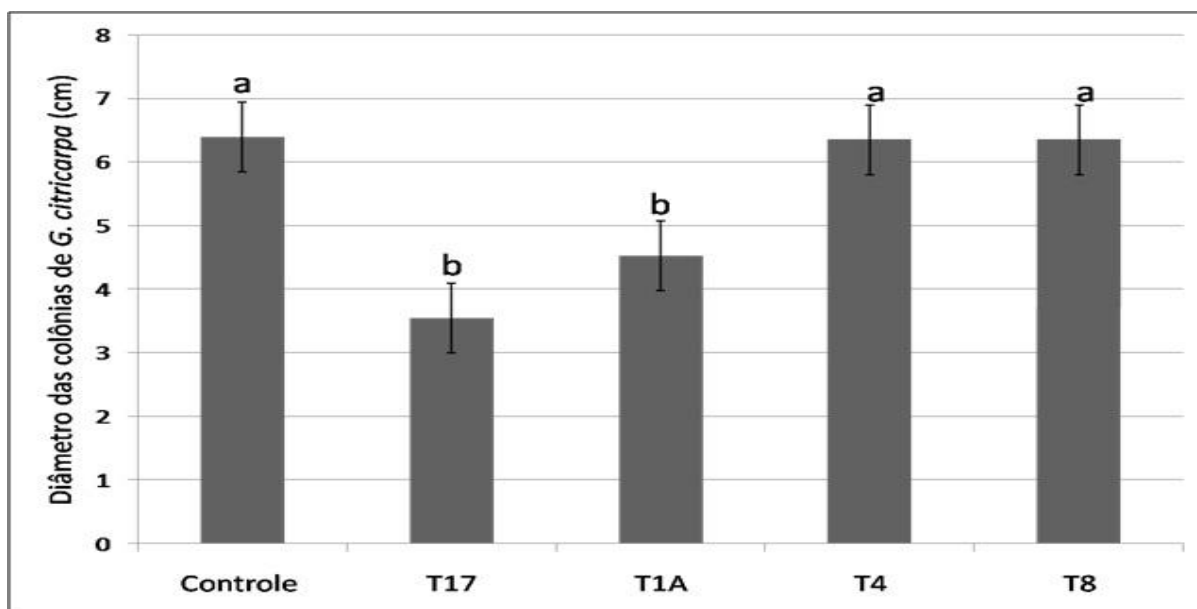


Figura 11. Teste de antagonismo em cultura dupla com os isolados (T8, T17, T4 e T1A) de *Trichoderma* spp. e isolado A49/11 de *Guignardia citricarpa*. Fonte: Arquivo Pessoal, 2013, Laboratório de Fitopatologia.

O rápido crescimento e estabelecimento dos isolados T8, T4, T17 e T1A de *Trichoderma* spp. sobre o isolado de *G. citricarpa* demonstram que a capacidade de competição, indispensável para um bom agente de controle biológico, é característica de todos eles. De acordo com Howell (2003), a competição é uma das principais características dos isolados de *Trichoderma* usados como agentes de biocontrole. No caso do controle da pinta preta do citros, o agente de biocontrole precisa ser altamente competitivo, pois deverá exercer esta propriedade na parte aérea da planta, onde certamente o patógeno tem vantagem.

## 4.2 Inibição de crescimento do isolado de *G. citricarpa* por compostos voláteis

Os resultados alcançados no teste de inibição de crescimento por compostos voláteis onde o isolado de *G. citricarpa* e os isolados de *Trichoderma* spp. (T8, T4, T17 e T1A) foram colocados sem contato físico em placas de petri sobrepostas estão apresentados na figura 12.



**Figura 12.** Inibição do desenvolvimento de *G. citricarpa* por compostos voláteis produzidos e liberados pelos isolados T17, T1A, T4 e T8 de *Trichoderma* spp. Médias com letras iguais não apresentam diferença significativa entre si ( $p \leq 0,05$ ).

Os dados obtidos sobre o desenvolvimento de *G. citricarpa* e isolados T4, T8, T17 e T1A de *Trichoderma* spp. em placas sobrepostas, demonstraram que compostos ou substâncias gasosas foram liberadas e mostraram efeitos inibitórios por dois dos isolados antagonistas, desde que foram observadas diferenças significativas entre as colônias desafiadas do patógeno e o controle ( $p \leq 0,05$ ) destacando-se os isolados T17 e T1A que apresentaram maior poder inibitório sobre o patógeno como mostra a figura 13.

Com semelhante metodologia, Guimarães (2008), obteve redução micelial de *G. citricarpa* com compostos voláteis liberados por um isolado de *T. koningii*. Os resultados alcançados no atual trabalho também reforçam aqueles de Dennis e Webster (1971), que relataram que espécies de *Trichoderma* são eficientes produtoras de

compostos voláteis inibidores de crescimento de outros micro-organismos em meio de cultura.

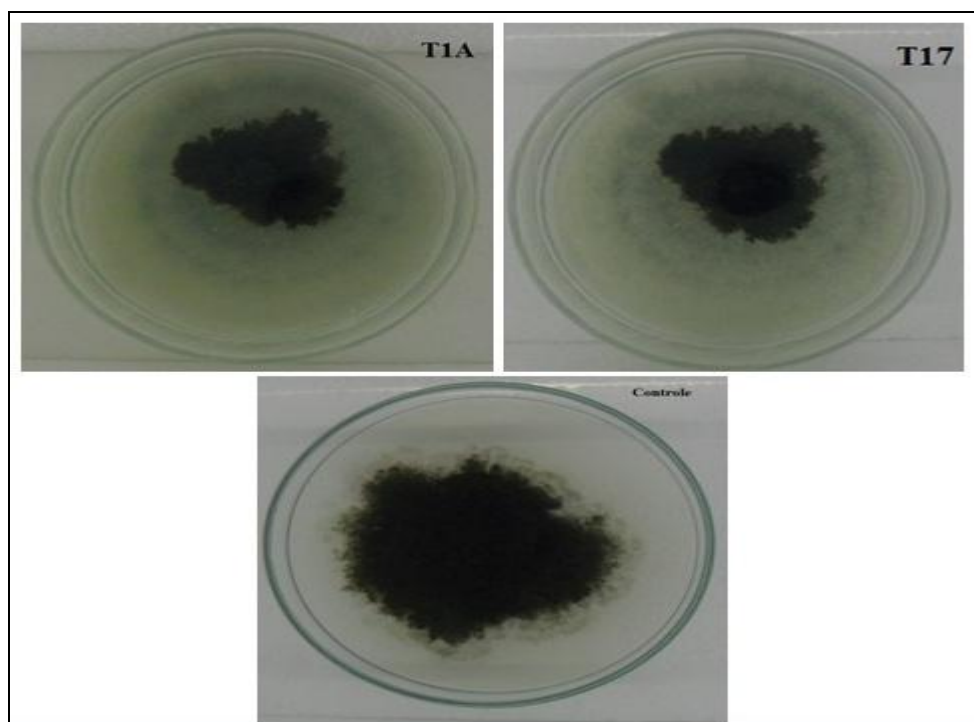
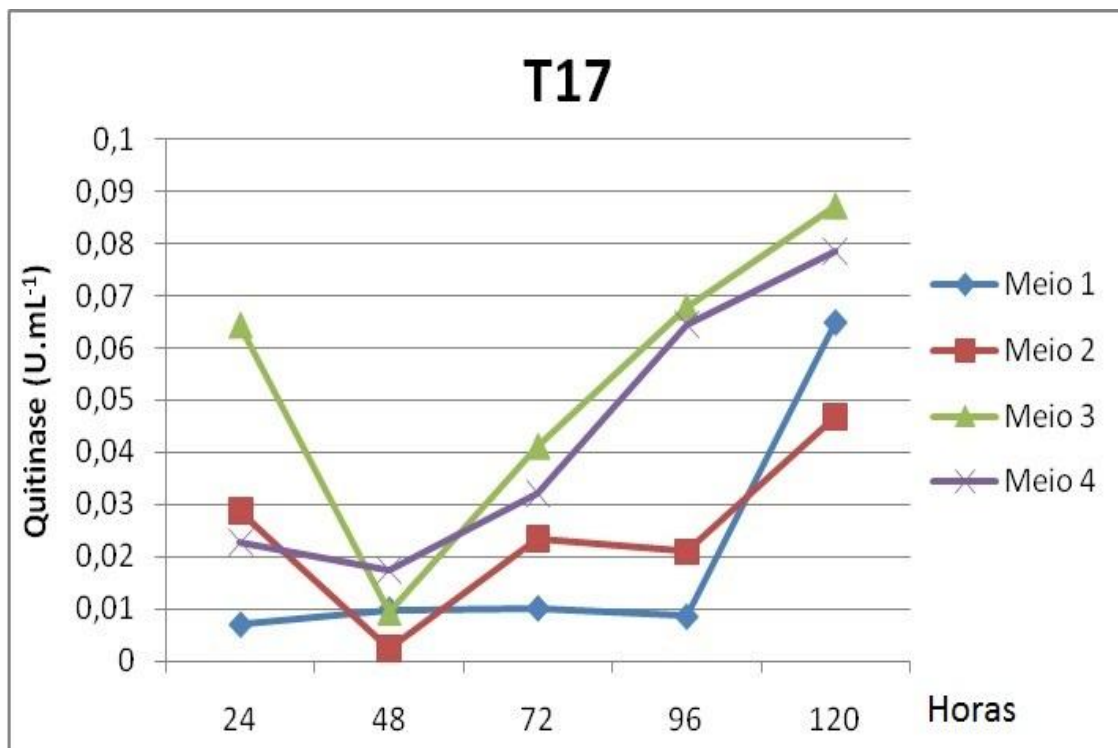


Figura 13. Teste de compostos voláteis liberados pelos isolados T17 e T1A de *Trichoderma* spp. contra *Guignardia citricarpa*.

### 4.3 Atividade quitinase

A metodologia descrita por Reissig *et al.* (1955) foi eficiente para a avaliação de atividade quitinase do isolado T17 de *Trichoderma* spp. Na figura 14 podemos observar a atividade de quitinase liberada pelo isolado T17 de *Trichoderma* spp com diferentes meios de cultura e em diferentes tempos de análise.

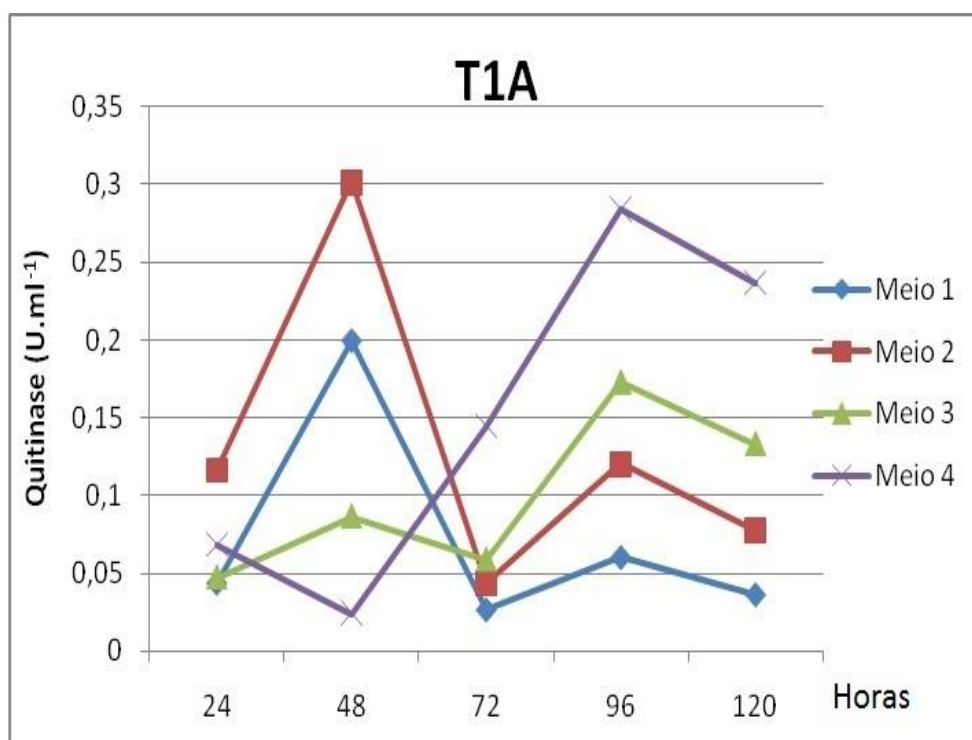


**Figura 14.** Atividade quitinase de *Trichoderma* T17, induzido por glicose (meio 1); glicose + micélio desativado de *G. citricarpa* (meio2); micélio desativado de *G. citricarpa* (meio3) e; micélio desativado de *Trichoderma* T17 (meio 4).

No presente trabalho foram observados valores mais altos de atividade quitinase, do que aqueles encontrados por Ribeiro (2001) para o mesmo isolado *Trichoderma* spp., embora o substrato indutor utilizado tenha sido *Botrytis cinerea*, por esse autor. A maior atividade foi encontrada em meio contendo micélio desativado de *G. citricarpa* 0,088 U.mL<sup>-1</sup> no tempo de 120 h, enquanto que Ribeiro (2001) para o mesmo isolado, encontrou como a maior atividade 0,03 U.mL<sup>-1</sup> no tempo de 96 h. Outros autores também relataram resultados diferentes, aparentemente relacionados com o tipo de substrato - patógeno alvo utilizado como substrato indutor. Qualhato *et al.* (2013) relataram a maior atividade enzimática de quitinase por *T. harzianum* em meio enriquecido com parede celular de *Fusarium oxysporum* no tempo de 24 h com 0,158 U.mL<sup>-1</sup> e, para *F. solani* em 24 h apenas 0,0006 U.mL<sup>-1</sup>. Esses resultados podem sugerir que um mesmo isolado de *Trichoderma* sp. pode apresentar diferenças na atividade enzimática de acordo com o tipo de patógeno alvo. Corroborando esse fato, os dados obtidos quando o substrato indutor de atividade quitinase era o próprio isolado T17, foram observados valores próximos mas não iguais àqueles encontrados no meio com micélio desativado de *G. citricarpa*.

Como controle neste experimento foi utilizada a glicose, que reduziu a produção de quitinase por *Trichoderma* spp. T17 até as 96 horas do experimento, no entanto nas 120 h de experimento foi observado atividade quitinase igual a  $0,065 \text{ U.mL}^{-1}$  quando provavelmente o fungo entrou em processo de autólise.

Na avaliação da atividade quitinase do isolado T1A de *Trichoderma* spp. foram verificados diferenças importantes comparando-se com os dados encontrados para T17, induzido pelos mesmos substratos: valores de atividades bem maiores e o horário de maior produção Figura 15.



**Figura 15.** Atividade quitinase de *Trichoderma* T1A, induzido por glicose (meio1); glicose + micélio desativado de *G. citricarpa* (meio 2); micélio desativado de *G. citricarpa* (meio 3) e; micélio desativado de *Trichoderma* T1A (meio 4).

O isolado T1A de *Trichoderma* sp. demonstrou a maior atividade quitinase no horário de 48 h, com o meio que continha 0,5% de glicose e 0,5% de micélio desativado de *G. citricarpa* o que nos sugere que o isolado T1A de *Trichoderma* spp tenha utilizado a glicose nas primeiras 24h para se desenvolver liberando mais quitinases ativas  $0,3 \text{ U.mL}^{-1}$  no tempo de 48h.

No meio contendo somente micélio de *G. citricarpa* como substrato indutor era esperado a maior atividade quitinase, no entanto em 96 horas de experimento foi obtido

atividade de  $0,18 \text{ U.mL}^{-1}$ , inferior aquela demonstrada pelo fungo quando o substrato fora preparado com as suas próprias células. Este tipo de variabilidade encontrada na atividade enzimática do isolado T1A de *Trichoderma*, não era esperado. Segundo Silva e Chet (1989) o isolado T-35 de *T. harzianum* produziu quitinase no processo de micoparasitismo contra *Rhizoctonia solani* e *Pythium aphanidermatum*, porém o mesmo não aconteceu sobre *Fusarium oxysporum*. Esse resultado pode ter ocorrido em função da composição e da atuação das proteínas da parede celular do patógeno que interferem na ação das enzimas, aumentando sua resistência à lise.

A atividade de quitinase foi maior para o meio 3 e meio 4 em 96h de experimento, onde em ambos tínhamos presença de micélio desativado e em todos os meios testados houve redução da quitinase ativa em 120h de análise. Estes resultados diferem dos resultados encontrados por Ribeiro (2000), com o patógeno *Botrytis cinerea*, onde a atividade de quitinase para este patógeno foram menores.

#### 4.4 Avaliação da sobrevivência dos conídios de isolados de *Trichoderma spp.* em condições de ambiente na parte aérea de citros

A metodologia desenvolvida para avaliação da sobrevivência dos conídios em condições naturais proporcionou informações importantes sobre o comportamento do fungo, cujos dados estão apresentados na figura 16.

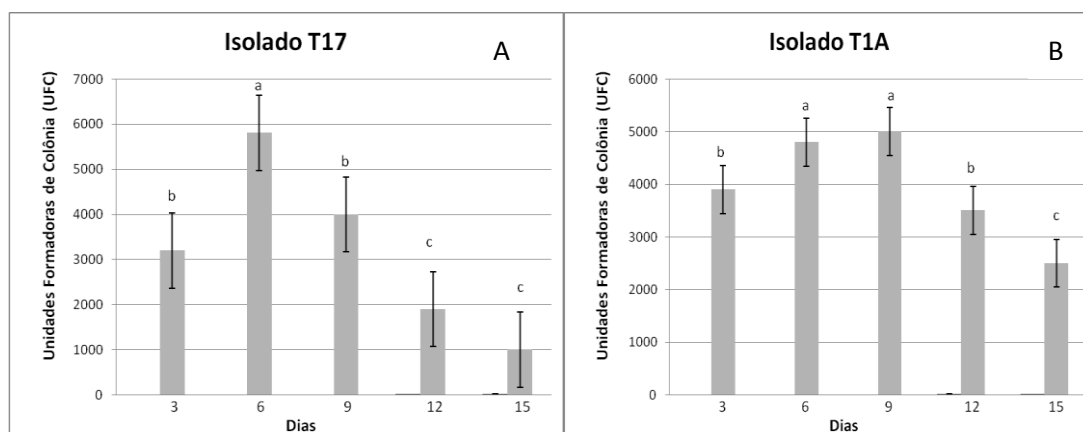


Figura 16. Sobrevivência dos isolados T17 e T1A de *Trichoderma sp.* aspergidos sobre folhas de laranjeiras. Médias com letras iguais não apresentam diferença significativa entre si ( $p \leq 0,05$ ).

Para o desenvolvimento deste experimento o inóculo inicial formado com cada um dos isolados foi preparado e aspergido com a concentração de  $1 \times 10^6$  conídios.mL e

os dados apresentados em relação aos dois isolados selecionados demonstraram viabilidade até o final do período de 15 dias de avaliação.

Em relação ao isolado T17 como mostra a figura 16.a, na avaliação feita três dias após a aspersão dos conídios, foi observada redução na concentração dos conídios. No entanto, na segunda (6 dias) os valores de concentração foram maiores e terceira (9 dias) os valores da concentração se reduziram. A partir da quarta avaliação (12 dias) mas principalmente na quinta avaliação (15 dias) houve diminuição significativa no número de unidades formadoras de colônias, demonstrando a já esperada baixa habilidade de sobrevivência de *Trichoderma* nos órgãos aéreos das plantas. No entanto, mesmo com esta redução os dados apresentados neste trabalho demonstram que após a inoculação,  $1 \times 10^3$  conídios.mL<sup>-1</sup>. 2 cm<sup>2</sup> de folha, ainda estavam presentes nas laranjeiras. Resultados semelhantes foram encontrados para os isolados T1A. Para os isolados T1A como mostra a figura 17.b os dados demonstraram que as maiores concentrações de conídeos viáveis ocorreram nos sexto e nono dias após o início do tratamento. Também foi observado redução significativa no décimo quinto dia de experimento, mas uma população aproximada de  $2,5 \times 10^3$  conídios.mL<sup>-1</sup>. 2 cm<sup>2</sup> permaneceu nas folhas de laranjeira. Poucas informações são disponíveis na literatura sobre este assunto, principalmente porque *Trichoderma* é um fungo naturalmente encontrado no solo e não na parte aérea das plantas, onde pode sofrer com os efeitos da radiação ultra violeta. Ethur (2006) demonstrou a sobrevivência de conídios de *Trichoderma* no solo por 135 dias após o tratamento, o que pode ser um resultado esperado. Por outro lado, Geraldine *et al.* (2011), trabalhando com espécies de *Trichoderma* no controle da fusariose em feijoeiro, relataram que as mesmas tiveram desempenhos diferentes em 24 h, após aplicação em folhas expostas ao sol ou sombreadas, concluindo que a exposição de conídeos de *Trichoderma* spp. à radiação solar afeta a sua sobrevivência, o que pode explicar a redução da viabilidade dos isolados de *Trichoderma* maior a partir de quinze dias após a aplicação na parte aérea das laranjeiras.

## 5.0 CONCLUSÕES

Os dados obtidos neste trabalho permitem concluir que:

- Os isolados T8, T4, T1A e T17 de *Trichoderma* spp. em cultura dupla apresentam maior velocidade de crescimento que o isolado A49/11 de *Guignardia citricarpa*.
- Os isolados T8, T4, T1A e T17 de *Trichoderma* spp. em cultura dupla desenvolveram micoparasitismo sobre o isolado A49/11 de *Guignardia citricarpa*.
- Os isolados T8, T4, T1A e T17 de *Trichoderma* spp. foram capazes de inibir o crescimento micelial do isolado A49/11 de *Guignardia citricarpa* por emissão de metabólitos voláteis.
- Os isolados T1A e T17 de *Trichoderma* spp. liberaram quitinases ativas na presença de micélio desativado de *G. citricarpa*.
- Os isolados T1A e T17 de *Trichoderma* spp. liberaram quitinases ativas na presença de micélio desativado de *Trichoderma* spp.
- A população de *Trichoderma* aspergida na parte aérea das plantas reduz acentuadamente no período de 15 dias, porém ainda mantém uma concentração que possivelmente pode agir como agente de controle biológico.



## 6.0 PERSPECTIVAS

Para a continuidade deste trabalho, é importante:

- Avaliar *in vivo* a potencialidade dos isolados individualizados e em conjunto de *Trichoderma* spp. utilizados neste estudo contra a doença pinta preta dos citros.
- Analisar quais os metabolitos voláteis majoritários do processo de micoparasitismo dos isolados de *Trichoderma* spp contra *G. citricarpa*.
- Avaliar a sobrevivência dos isolados de *Trichoderma* spp na parte aérea das folhas de laranjeira, por um período de tempo mais longo.
- Comparar os resultados deste trabalho com o controle da doença pinta preta dos citros utilizando produtos comerciais à base de *Trichoderma*.

## 7.0 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILAR-VILDOSO, C.I (Cordenador). **Manual técnico de procedimientos da mancha preta dos citrus**. Brasilia: 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: epidemiologia y control**. San Salvador de Jujuy: Ediciones Universidad Nacional de Jujuy, 2000.56p.

AMARO, A. A. Industrialização da laranja. São Paulo: IEA, 1973.

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

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**, v.67, p. 956-960, 2001.

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

\*BARSANTI, L.; VISMARA, R.; PASSARELLI, V.; GUALTIERI, P. Paramylon content in wild type and WZSL mutant of *euglena gracilis*. Effects of growth conditions. *Journal of Applied Phycology*, Dordrecht, v. 13, p. 59-65, 2001.

BERNARDO, E. R. A.; BETTIOL, W. Controle da pinta preta dos frutos cítricos em cultivo orgânico com agentes de biocontrole e produtos alternativos. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 35, n. 1, p. 37-42, 2010. Artigo disponível em:<http://www.scielo.br/pdf/tpp/v35n1/a06v35n1.pdf>

\*BÉLANGER, R. R; 1999. Control of powdery mildews without chemicals: biological and prophylatic alternatives. In: **International Powdery Midew Conference, 1.**, Avignon, Resumos. Avignon, p37.

BÉLANGER R. R.; DUFOUR, N.; CARON, J.; BENHAMOU, N. 1995. Chronological events associated with the antagonistic properties of *Trichoderma harzianum* against *Botrytis cinerea*: indirect evidence for sequential role of antibiosis and parasitism. **Biocontrol Science and Technology**, **5:41-53**.

BELL, D.K.; WELLS, H.D.; MARKHAM, C.R. In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology*, v. 72, n. 4, p.379-382, 1982.

BENITEZ, T., LIMON, C., DELGADO-JARANA, J. & Rey, M. in *Trichoderma and Gliocladium* Vol. 2 (eds Kubicek, C. P. & Harman, G. E.) 101–127 (Taylor and Francis, London, 1998).

BENHAMOU, N., GARAND, C. & GOULET, A. Ability of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strain Fo47 to induce resistance against *Pythium ultimum* infection in cucumber. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 4044–4060 (2002).

BETTIOL, W. Controle Biológico de Doenças de Plantas. Jaguariúna: EMBRAPA – CNPDA, 1991. 226p.

BETTIOL, W.; GHINI, R. Proteção de plantas em sistemas agrícolas alternativos. In: **Métodos Alternativos de Controle Fitossanitário**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2003. 279 p. **LARANJA** **30**(1-2)45-64, Cordeirópolis. 2009.

BOTEON, M. 10 desafios da citricultura. *Hortifruti Brasil*, Piracicaba, ano 5, nº6, maio 2006.

CENTRO APTACITROSSYLVIO MOREIRA – IAC. Disponível em: <http://www.centrodecitricultura.br>. Acesso em: 20 abr.2013.

COOK, R. J.; BAKKER, K. F. **The nature and practice of biological control of plant pathogens**. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1983. 615p.

CHERIF, M.; MENZIES, J.G.; BENHAMOU, N.; BELANGER, R.R. **Studies of silicon distribution in wounded and *Pythium ultimum* infected cucumber plants.** *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v.41, p. 371-385.1990.

CHET, . 1990. Mycoparasitism – recognition, physiology and ecology. In: **New directions in Biological Control: Alternatives for Suppressing Agricultural Pests and Diseases** (UCLA Synposia o Molecular and Cellular Biology, New Series, Vol.112) Baker, R. R., Dunn, P. E. (Eds.) New York: Alan R. Liss,pp. 725-733.

CHET, I.; INBAR, J. 1997. Biological control: fungi. In: *Fungal Biotechnology* (ed. T. Anke),pp.63-80. Chapman & Hall: Weinhiem.

DANIELSON,R.M.; DAVEY,C.B. Nonnutritional factors affecting the growth of *Trichoderma* in culture. ***Soil Biology and Biochemistry***, v. 5, p 495-504, 1973.

DE BOER, M.; VAN DER SLUIS, I.; VAN LOON, L.C., BAKKER, P.A.H.M. Combining fluorescent *Pseudomonas*.spp. strains to enhance suppression of fusarium wilt of radish. *Eur. J. Plant Pathol.* 105:201-10. 1999.

DE LA CRUZ, J.; REY, M.; LORA, J. M.; HIDALGO-GALEGO, A.; DOMINGUEZ, F.;PINTOR-TORO, J. A.; LLOBELL, A.; BENITEZ, T. 1993. Carbon source control on □ □glucanases, chitobiase and chitinase from *Trichoderma harzianum*. *Arch. Microbiol.*, 159: 316-122.

DE MARCO,J.L; FELIX, C.R. Purification and characterization of a beta-Glucanase produced by *Trichoderma harzianum* showing biocontrol potential. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 50 (1), p. 21-29,2007.

DEBONO, M.; GORDEE, R. S. 1994 Antibiotics that inhibit fungal cell wall development. ***Annual Review Microbiology* 48:471-497.**

DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*, III Hyphal interactions. *Transactions British Mycological Society*, v. 57, p. 363-369, 1971.

DOIDGE, E.M. Some diseases of citrus prevalent in South Africa. *South African Journal of Science*, Pretoria, v.26, p.320-325, 1929.

ELAD, Y.; CHET, I.; HENIS, Y. Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v.28, p.719-725, 1982.

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.

EMBRAPA- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em: <<http://www.embrapabr.br>>. Acesso em: 14 set. 2012.

ETHUR, L.Z. Dinâmica populacional e ação de *Trichoderma* no controle de fusariose em mudas de tomateiro e pepineiro. 2006. 154f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2006.

FAO- Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em : <http://www.fao.org> . Acesso em: 24 ago.2012.

FEICHTENBERGER, E.; GOES, A. **Manual Técnico Sobre Pinta Preta**. Araraquara: Fundecitrus, 1998.

FEICHTENBERGER, E.; MULLER, G. W.; GUIRADO, N. Doenças dos citros (*Citrus spp.*). In KIMATI, H.; AMORIN, 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.

FIALHO, M. B. **Efeito in vitro de *Saccharomyces cerevisiae* sobre *Guinardia 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.

FLEURI, L. F.; SATO, H. H.  $\beta$ -1,3 Glucanases e quitinases: aplicação na lise de leveduras e inibição de fungos. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 32, p. 1224-1231, 2008.

FUNDECITROS – Fundo de Defesa da Citricultura. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br>> . Acesso em: 24 de abr.2013.

FUNDECITRUS. **Manual Técnico sobre pinta preta**. Araraquara: Fundo Paulista de Defesa da Agricultura, 2000.10p. (Boletim Técnico, Edição especial).

GARCIA, I.;LORA, K. M.; DE LA CRUZ, J.; BENITEZ, T.; LLOBELL, A.; PINTOR-TORO, J. A. 1994. Cloning and characterization of a chitinase (chit 42) Cdna from the mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum*. **Current genetics** **27**:83-89.

GERALDINE, A. M; FILHO, C. R. P; LOBO, M. Sobrevivência de esporos de trichoderma spp. na superfície foliar de feijoeiro comum após exposição à radiação solar. Disponível em: [ainfo.cnptia.embrapa.br](http://ainfo.cnptia.embrapa.br). Acesso em: 22 de agosto de 2012

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

GUIMARAES, M. A. Bioprospecção de microrganismos epifíticos de tangerinas cv. Montenegrina para o manejo da mancha preta dos citros causada por *Guignardia citricarpa* Kiely. Porto Alegre:UFRGS, 2008. 60f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

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

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,p377-393,2000.

HARAN, S.; SCHICKLER, H.; OPPENHEIN, A.; CHET, I. 1995. New components of the chitinolytic system of *Trichoderma harzianum*. **Mycol.Res.** **99**:441-446.

HJELJORD, L.; TRONSMO, A. 1998. Trichoderma and Glicocadium in biological control: an overview, p. 129-151. In. G. E. Herman and C. P. Kubicek (Ed.), Trichoderma and Glicocadium . vol.2. **Enzimes, biological control and commercial application**. Taylor and francis Ltd.,London, United Kingdom.

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

INVAR, J.; CHET, I. 1995. The role of recognition in the induction of specific chitinases during mycoparasitism by *Trichoderma harzianum*. **Microbiology**, **141**:2823-2929.

KIELY, T. B. **Control and epiphytology of Black spot of citrus on the central coast PF New South Wales**. New South Wales,v.73,p.249-292,1948b.

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

KUPPER, Katia Cristina et al . Control of Guignardia citricarpa by Bacillus subtilis and Trichoderma spp. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal, v. 33, n. 4, Dec. Disponível em: <<http://www.scielo.br/scielo>>. Acesso em: 27 mai. 2013.

KURANDA, M. J.; ROBBINS, P. W. Chitinase is required for cell separation during growth of *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biol. Chem.** **266**:19758-19767, 1991.

KLOTZ, L. J. **Color handbook of citrus disease**. 4.ed. Berkeley: University of California, Division of Agricultural Sciences, 122p, 1973.

KLOTZ, L.J. Fungal, bacterial, and nonparasitic diseases and injuries originating in the seedbed, nursery and orchard. In: Reuther, W., Calavan, E.C & Carman, G.E. (Eds.) The Citrus Industry. Riverside:University of California. 1978. pp.1-66.

LIMA, L. H. C.; MARCO, J. L. de; FELIX, C. R. Enzimas hidrolíticas envolvidas no controle biológico por micoparasitismo. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Controle Biológico**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, v.2, cap.8, p.268-304, 2000.

LORITO, M .; MACH, R. L.; SPOSATO, P.; STRAUSS, J.; PETERBAUER, C. K.; KUBICEK, C. P. 1993. Mycoparasitic interaction relieves binding of the Cre1 carbon catabolite repressor protein to promoter sequences of the ech42 (endochininase-encoding) gene in *Trichoderma harzianum*. **Proceedings National Academic Science USA** **93**:14868-14872.

MAPA- Ministério da agricultura e produção animal. Disponível em <http://www.agricultura.gov.br> .Acesso em: 02 mai.2012.

MARIANO, R. L. R. Métodos de seleção in vitro para o controle microbiológico de patógenos de plantas. Revisão Anual de Patologia de Plantas, v. I, p. 369-409.1993.

MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. Controle Biológico. Melo, I. S.; Azevedo, J. L. Eds. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, v.1, 1998.

MELO, I . S.; Potencialidades de utilização de *Trichoderma* spp. no controle biológico de doenças de plantas. In: BETTIOL, W. (Org.) **Controle Biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA- CNPDA,p.7-23, 1991.

MELO, I. S.; *Trichoderma* e *Glicocadium* como bioprotetores de plantas. In: LUZ, W. C. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.4p.261-295,1996.

MELO, I. S.; Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos.In: MELO, I. S. de.; AZEVEDO, J. L. de. **Controle Biológico**. Jaguariúna: EMBRAPA, 1998.



MENDES, M.A.S.; FREITAS, V.M. Comunicado Técnico 130 – Espécies invasoras para a citricultura. Brasília: EMBRAPA, 2005. Disponível em: <<http://www.cenargen.embrapa.br/publica/trabalhos/cot130.pdf>>. Acesso em 15 junho 2012.

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

MOHAMED, H.A.L.A.; HAGGAG, W.M. 2006. Biocontrol potential of salinity tolerant mutants of *Trichoderma harzianum* against *Fusarium oxysporum*. *Braz. J. Microbiol.* 37(2):181-191. *Phytopathology* 62(4):442-447.

NEVES, E.M. Economia de produção citrícola e efeitos alocativos. *Preços Agrícolas*, Piracicaba, 2000. p.9-12.

NEVES, M. F.; LOPES, F.F. Estratégias para a laranja no Brasil. São Paulo: Atlas, 2005. 225p.

OLIVEIRA, R. P.; SCIVITTARO, W. B.; SCHRODER, E. C.; ESSWEIN, F. J. Produção de citros orgânicos no Rio Grande do Sul. **Boletim Técnico 20** Embrapa Clima Temperado, pp. 296. 2010.

PARKINSON, D., TAYLOR, G.S., PEARSON, R. Studies on fungi in the root region. I. The development of fungi on young roots. *Plant Soil*, v.19, p. 322-339, 1963.

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

PATIL, R. S.; GHORMADE, V.; DESHPANDE, M. V. Chitinolytic enzymes: na exploration. **Enzyme Microbial Technol.**, 26: 473-483, 2000.

PEBERDY, J. F. Fungal cell wall – a review, p. 5-25. In. P. J. Kuhn, A. P. J. Trinci, M. J. Jung, M. M. Goosey, and I. G. Cooping (Eds.), **Biochemistry of cell walls and membranes in fungi**. Spring-Verlag, Heidelberg, Germany., 1990.

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.

PÉREZ LM, BESOAIN X, REYES M, LESPINASSE M, MONTEALEGRE J (2001) The expression of enzymes involved in biological control of tomato phytopathogens by *Trichoderma* depends on the phytopathogen to be controlled and on the biocontrol isolate. IOBC WPRS Bull vol 24: 353-356

PINTO, N.F.J. de A. Tratamento de sementes de sorgo visando o controle de fungos do solo e associados às sementes. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v.24, n.1, p.26-29, 1997

QUALHATO, F.T. Avaliação do perfil enzimático e expressão gênica de cinco espécies de *Trichoderma* e potencial antagônico contra *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani*, e *Sclerotinia sclerotium*. Goiania, 2013. 70f.Dissertação (Mestrado em Biologia). Universidade Federal de Goias. Goias, 2013.

REISSIG, J. L., J. L. STROMINGER, and L. F. LELOIR. 1955. A modified colorimetric method for the determination of N-acetylamino sugars. J. Biol. Chem. 217:959-966.

RIBEIRO. S. T. R. **Avaliação do potencial do uso de Trichoderma spp como agente para biocontrole contra Botrytis cinérea**. Porto Alegre: UFRGS, 2001. 81f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.2001.

RIDOUT, C.J.; COLEY-SMITH, J.R.; LYNCH, J.M. Fractionation of extracellular enzymes from mycoparasitic strain of *Trichoderma harzianum*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.10, p.180-187, 1986.

ROBBS, C. F. A mancha preta dos frutos cítricos (*Phyllosticta citriparpa*): ameaça à citricultura paulista. **Laranja**, Cordeirópolis, v.11, p.87-95, 1990.

RODOV, V.; BEN-YEHOSSHUA, 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.

SAMUELS, G.J. *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. *Mycol. Res.*, 100:923-935, 1996.

SEPLAG – Secretaria de Planejamento, Gestão e Participação Cidadã. Atlas Sócio Econômico do Rio Grande do Sul – Disponível em: <<http://www.scp.rs.gov.br/atlas/conteudo.asp>>. Acesso em: 26 ago.2012.

SILVA-PINHATI, A. C. O.; GOES, A.; WICKERT, E; ALMEIDA, FERREIRA, T.; MACHADO, M. A. Mancha Preta dos Citros: Epidemiologia e manejo da doença. **LARANJA 30**(1-2)45-64, Cordeirópolis. 2009.

SHAIKH, S. A. e DESHPANDE, M. V. Chitinolytic enzymes: their contribution to basic and applied research. **World J. Microbiol. Biotechnol**, **9**:468-475, 1996.

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.

SUTTON, B.C.; WATERSTON, J.M. *Guignardia citricarpa*. Kew: C.M.I. Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria 85, CAB International, Wallingford, UK, 1996.

SPÓSITO, M.B.; AMORIM, L.; BELASQUE JÚNIOR, J.; BASSANEZI, R.B.; AQUINO, R.de. Elaboração e validação de escala diagramática para avaliação da severidade de mancha preta em frutos cítricos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.29, n.1, p.81-85.2004.

SWINGLE, W. T.; REECE, R. C. The botany of Citrus and its wild relatives. In: REUTHER, W.; BATCHELLOR, L. D.; WEBER, H. J. (Ed.). The citrus industry. Berkeley: University of California, p. 190-430, 1967.

TIMMER, L.W. diseases of fruit and foliage. In: Timmer, L.W. & Duncan, L.W. (Eds.). Citrus health management. SI. Paul. APS Press. P. 107-115. 1999.

ULHOA, C.J.; PEBERDY, J.F.; (1991). Regulation of chitinase synthesis in *Trichoderma harzianum*. *J. Gen. Microbiol.*, 137, 2163-2169.

ZHANG, Zhongge; YUEN, Garry Y. The role of chitinase production by *Stenotrophomonas maltophilia* strain C3 in biological control of *Bipolaris sorokiniana*. **Phytopathology**, v. 90, n. 4, p. 384-389, 2000.

WEINDLING, R. 1934. Studies on a lethal principle effective in the parasitic action of *Trichoderma lignorum* on *Rhizoctonia solani* and other fungi. *Phytopathology* 24:1153-1179.

WHIPPS, J. M. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.* **52**, 487–511 (2001).

WHEELER, B.E.J. **An introduction to plant diseases**. London: John Wiley, 1969.374p.