

ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS DE SOLO PARA CONTROLE BIOLÓGICO DE FITOPATÓGENOS DE CITROS

BIANA PELISSARI GADANHOTO¹, LEONARDO PIRES BOAVA², RENATO NALLIN MONTAGNOLLI³

¹Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Ambiente, Universidade Federal de São Carlos, Rodovia Anhanguera km 174, 13600-970, Araras, São Paulo, Brasil, bianapelissari@gmail.com.

²Departamento de Pesquisa e extensão, Centro Universitário Dr. Edmundo Ulson, Rua Ernâni Lacerda de Oliveira, 100, Jardim Cândida, Araras, São Paulo, Brasil, leoboava@yahoo.com.br

³Departamento de Ciências da Natureza, Matemática e Educação, Universidade Federal de São Carlos, Universidade Federal de São Carlos, Rodovia Anhanguera km 174, 13600-970, Araras, São Paulo, Brasil, renatonm@ufscar.br

RESUMO: A citricultura é um dos setores mais representativos do agronegócio brasileiro, entretanto enfrenta adversidades geradas por doenças e pragas que são responsáveis por expressivas perdas de produção. Na cultura dos Citros, mais de cinquenta fitopatologias são atribuídas a fungos. As medidas de controle ocorrem pela aplicação de agrotóxicos, porém as questões ambientais evidenciam o controle biológico como alternativa ao controle químico, constituindo-se também como tecnologia poupadora de capital. Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo o isolamento de microrganismos de solo de pomar de Laranja Pêra, onde os isolados foram submetidos a teste de cultivo pareado *in vitro* a fim de determinar a porcentagem de inibição do crescimento dos fitopatógenos de citros: *Geotrichum citri-aurantii* e *Alternaria alternata*. Da amostra de solo foram isolados três fungos, que foram submetidos a avaliação de crescimento de área, e posteriormente à análise estatística pelo teste de ANOVA a 5% de probabilidade. Foi possível identificar potencial de inibição em todos os isolados com diferença estatística significativa em todas as repetições. Os isolados interferem no crescimento dos patógenos de formas distintas, mas ainda sim evidenciam o caráter inibitório e antagonístico dos isolados e de seus metabólitos biologicamente ativos.

Palavras-chaves: *Geotrichum citri-aurantii*, *Alternaria alternata*, antagonismo

ISOLATION OF SOIL MICROORGANISMS FOR BIOLOGICAL CONTROL OF CITRUS PHYTOPATHOGENS

ABSTRACT: Citriculture is one of the most representative sectors of Brazilian agribusiness, however it faces adversities generated by diseases and pests that are responsible for significant production losses. In Citrus cultivation, more than fifty phytopathologies are attributed to fungi. Control measures occur through the application of pesticides, however, environmental issues highlight biological control as an alternative to chemical control, also constituting a capital-saving technology. In view of the above, this work aimed to isolate microorganisms from the soil of a Laranja Pêra orchard, where the isolates were subjected to an *in vitro* paired culture test in order to determine the percentage of inhibition of the growth of citrus phytopathogens: *Geotrichum citri-aurantii* and *Alternaria alternata*. Three fungi were isolated from the soil sample, which were subjected to area growth assessment, and subsequently to statistical analysis using the ANOVA test at 5% probability. It was possible to identify inhibition potential in all isolates with statistically significant differences in all replicates. The isolates interfere with the growth of pathogens in different ways, but they still demonstrate the inhibitory and antagonistic nature of the isolates and their biologically active metabolites.

Keywords: *Geotrichum citri-aurantii*, *Alternaria alternata*, antagonismo

1 INTRODUÇÃO

Os citros emergem como uma das mais importantes e amplamente cultivadas na produção global de frutas (TALON; GMITTER JÚNIOR, 2008). A citricultura é uma das cadeias de maior relevância para o agronegócio brasileiro. O inventário de árvores e estimativa de safra de laranja 2022/2023 da Fundecitrus (2022) mostra que a projeção de estimativa mesmo diante das variações climáticas é de 316,95 milhões de caixas. O cultivo de citros é focado predominantemente na região sudeste do Brasil, com ênfase especial no estado de São Paulo, segundo dados da FAESP (2022) em 2020 só o estado foi responsável pela produção de 13,7 milhões de toneladas da fruta.

A projeção realizada pela Fundecitrus (2022) que engloba o cinturão citrícola de São Paulo e Triângulo/ Sudoeste mineiro aponta que a próxima safra apresenta um incremento de 1,11%, uma recuperação após dois anos consecutivos de safras pequenas. Apesar disso, pragas e doenças representam uma grande ameaça, sendo responsáveis por expressivas perdas em produção e uma demanda muito grande de químicos para tratamento fitossanitário.

Dentre as muitas doenças que acometem as plantas, as fúngicas apresentam grande participação na problemática para a agricultura. Somente na cultura dos citros no Brasil, mais de cinquenta são atribuídas a fungos (FEICHTENBERGER; SPÓSITO, 2004). Estima-se que esses patógenos estão presentes de forma endêmica em praticamente todos os municípios produtores e seu controle é basicamente o emprego de fungicidas, e conseqüentemente demanda de inúmeras pulverizações (BALDASSARI *et al.*, 2007).

Dentre as doenças que acometem a cultura dos citros as podridões fúngicas destacam-se na pós-colheita, onde podem atingir até 50% de perda de safra em decorrência das mesmas após o período de armazenamento (FISHER *et al.*, 2007). O agente causal da podridão azeda é o fungo filamentosso leveduriforme *Geotrichum citri aurantii*. O fungo é comumente encontrado em solos e na superfície de frutos de citros. Seus esporos são facilmente disseminados pelo ar,

água e outros meios de transporte e são predominantes nas packing-houses. Os frutos são infectados por meio de lesões, onde o fitopatógeno se adentra. Os sintomas iniciais são de bolores na fruta, posteriormente formando camadas enrugadas e com cobertura micelial de coloração branca e posteriormente levando o fruto a degradação total (CUNHA, 2013). Outro patógeno de relevância para o setor é a *Alternaria alternata*, agente causal da Mancha Marrom de *Alternaria*. Os fungos do gênero *Alternaria* são reconhecidos pelos conídios, caracterizados pela coloração escura, presença de septos longitudinais e transversais caracterizada pelos sintomas em frutos logo após a queda das pétalas que podem induzir a abscisão do fruto, o que acaba limitando a produção da planta. Já em frutos novos podem amarelecer rapidamente e apresentar coloração marrom na casca, próximo à região estiolar (MARTELLI, 2011).

Diversas metodologias têm sido implementadas para o manejo dessas doenças que afetam a cultura dos citros, abrangendo aplicações de agroquímicos, seleção e melhoramento de resistência do hospedeiro, estratégias de manejo da cultura e controle biológico. Diante disso, existe um grande interesse em alternativas como o controle biológico de fitopatógenos, além de maneiras para mitigar os impactos diretos nos recursos naturais. Este trabalho consiste em buscar microrganismos de solo com capacidade de controle biológico as doenças causadas pelos agentes fitopatogênicos *Geotrichum citri aurantii* e *Alternaria alternata* na cultura dos Citros.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos experimentais para fins de obtenção de resultados foram realizados no Laboratório de Microbiologia Agrícola e Molecular (Lamam) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), campus de Araras. As cepas de *Geotrichum citri-aurantii* e *Alternaria alternata* são pertencentes a coleção microbiana do Lamam.

A coleta de solo foi realizada em pomar de laranja Laranja Pêra na cidade de Araras/SP (22o20'21.59"S 47o13'6.32"O). Para culturas

perenes como citros, a amostragem deve ser realizada na projeção da copa da entrelinha das plantas, que é a localidade alvo de aplicações dos pulverizadores. Ao todo foram coletadas quinze amostras simples na profundidade de 0-20 cm em diferentes pontos do pomar e posteriormente homogeneizadas em recipiente plástico para obter uma amostra composta. A região de coleta é pertencente ao cinturão citrícola do país. A região de Araras é predominantemente ocupada por Latossolos (SOUZA; FERREIRA, 2005).

As amostras de solo compostas foram submetidas a diluição seriada com o objetivo de amplificar o fator de diluição que permite diluir progressivamente a quantidade de soluto em relação ao diluente. Para o isolamento dos microrganismos das amostras de solo, 10 g de cada amostra foram distribuídos em Erlenmeyers de 125 ml com 90 ml de solução salina de NaCl 0,85%, e agitados em Shaker a 160 rpm por 30 minutos. O meio de cultura utilizado para o crescimento foi Batata Dextrose Agar (BDA) + Cloranfenicol. Foi pipetado 0,1mL de cada diluição na superfície dos meios citados acima, seguido do espalhamento por alça de Drigalski. Após o plaqueamento, as placas ficaram incubadas em estufa BOD a 28°C e seu crescimento acompanhado diariamente durante 7 dias. A seleção das colônias foi realizada por meio de análise visual, onde são distinguidas morfologicamente, por aspectos como cor, textura e borda. Todos foram transferidos para o meio de cultura de origem da colônia, e assim

realizado repetitivamente até o crescimento de colônias puras. A fim de verificar a ausência de contaminação os microrganismos foram submetidos a microscopia. Foram selecionados 23 microrganismos, sendo bactérias, leveduras e fungos. Para preservação os isolados foram cultivados em tubos de ensaios com meio inclinado e incubados em BOD a 30° até seu crescimento, decorrido esse processo foram cobertos com óleo mineral e armazenados a -80°C.

2.1 Cultivo Pareado

Dentre os 23 isolados, foram selecionados 3 fungos para o ensaio de antagonismo, nomeados como F-1, F-2 e F-3 (Figura 1). Os microrganismos foram cultivados em placas de Petri contendo meio de cultura BDA (Batata Dextrose Agar) e discos de micélio de 5 mm em lado oposto *Geotrichum citri-aurantii* e *Alternaria alternata*. Segundo Jung (2012) os fitopatógenos devem ser inoculados na placa 3 dias antes do microrganismo de estudo, entretanto para este trabalho foi realizado a inoculação simultânea para que não houvesse vantagem competitiva na escala de tempo de crescimento. Para grupo controle apenas cilindros de micélio de forma individual foram em meio BDA de forma lateral. As placas foram vedadas com filme plástico e mantidas em BOD a 28°C durante 7 dias. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado e todos os ensaios foram realizados com três repetições.

Figura 1. Isolados F-1, F-2 e F-3 selecionados.



Fonte: Autor, 2022.

2.2 Cálculo de Área

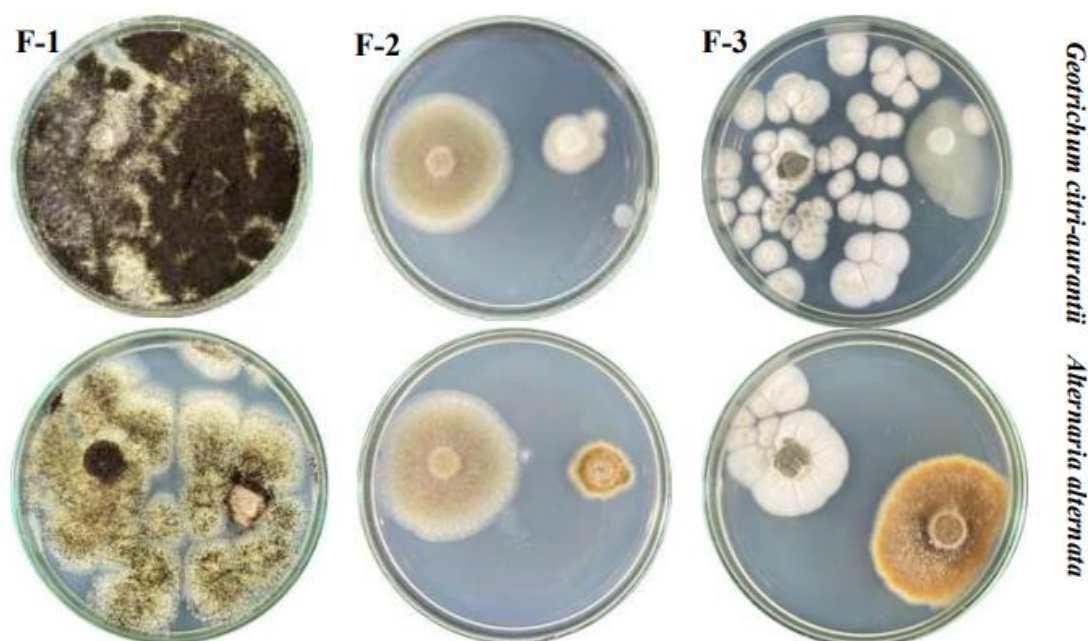
A porcentagem de inibição de crescimento dos fitopatógenos foi realizada de forma a estimar a diferença entre a média de crescimento do fitopatógeno e a média de crescimento dos isolados (JUNG, 2012). Os valores de área foram calculados pelo software AutoCAD® e seus valores submetidos a teste de normalidade, seguidos por Análise de Variância (ANOVA) e Teste de Tukey.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise de área do crescimento das colônias, após os sete dias transcorridos, demonstrou que os isolados interferem no crescimento dos fitopatógenos em tempo e intensidade proporcionais. A Figura 2 demonstra como o teste de antagonismo pode

sofrer alterações em competição conforme o isolado, mas ainda sim apresentar inibição ou alterações de forma micelial. De forma qualitativa é possível identificar que o isolado F-1 apresenta inibição completa de *Geotrichum citri-aurantii* e *Alternaria alternata* por sobrepor a área micelial com cobertura total de placa, entretanto por maior que seja a coberta também é possível notar uma zona de crescimento antagonístico sobre *Alternaria alternata*. Já o isolado F-2 interrompe o desenvolvimento de ambos, mas não inibe seu crescimento inicial. Para *Geotrichum citri-aurantii* isolado F-3 ocupa grande área micelial e também fica evidente a sobreposição, indicando potencial inibição.

Figura 2. Cultivo pareado dos isolados com *Geotrichum citri-aurantii* e *Alternaria alternata*.



Fonte: Autor (2022)

Para avaliar a diferença de crescimento primeiramente foi realizado o teste de normalidade de dados, considerando como hipótese nula que os erros têm distribuição normal e como hipótese alternativa que não possuem uma distribuição normal. Como o p-valor teve valor de 0,308, então com 95% de

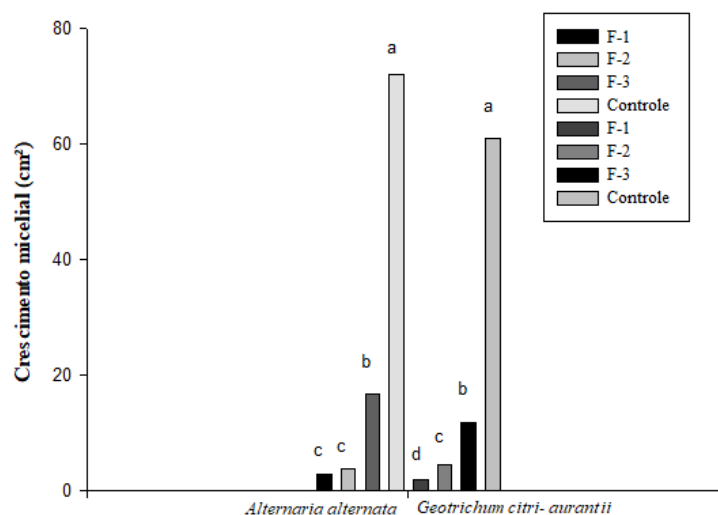
confiança há evidências para aceitarmos a hipótese de normalidade dos dados, portanto a ANOVA pode ser realizada. No Gráfico 1 abaixo, podemos observar que as diferenças nos valores médios entre os grupos de tratamento são maiores do que seria esperado ao acaso, portanto há uma diferença estatisticamente

significativa entre o crescimento do grupo controle somente com o inóculo de *Alternaria alternata* e um crescimento reduzido quando inoculado com qualquer um dos três isolados. Pela Teste de Tukey (Gráfico 1) é possível identificar que mesmo tendo inibição por meio dos três isolados, existe diferença significativa em seu caráter inibitório frente ao fitopatógeno, com exceção do isolado F-1 e F-2, ao nível de significância de 5%.

Para *Geotrichum citri aurantie*, os dados obtiveram um p-valor 0,063, considerando como hipótese nula que os erros têm distribuição normal e como hipótese alternativa que não possuem uma distribuição normal, então com 95% de confiança há

evidências para aceitarmos a hipótese de normalidade dos dados, portanto a ANOVA pode ser realizada. As diferenças nos valores médios de área entre os grupos de tratamento são maiores do que seria esperado ao acaso, portanto há uma diferença estatisticamente significativa ($P = <0,001$) entre o crescimento do grupo controle somente com o inóculo de *Geotrichum citri aurantie* e crescimento reduzido quando inoculado com qualquer um dos três isolados. Pelo teste de Tukey (Gráfico 1) é possível identificar que a inibição ocorre de forma diferente quando comparado o caráter inibitório dos isolados entre si, ao nível de significância de 5%.

Gráfico 1. Médias de área de crescimento micelial (cm^2)



Fonte: Autor (2022)

Os resultados deste estudo demonstram o potencial de três isolados de solo para o controle biológico dos fitopatógenos *G. citri-aurantii* e *A. alternata*. O tratamento com F-1 foi o mais promissor na inibição do crescimento de ambos os patógenos, sugerindo a presença de mecanismos de ação antagônicos eficazes. Estudos como de Jung (2012) observa que a inibição em cultivo pareado ocorre por fatores variados, como a produção de metabólitos voláteis, liberação de metabólitos no meio de cultura e competição por nutrientes e espaço. Poveda, Abril-Urias e Escobar (2020) revelam que diversos mecanismos podem estar envolvidos na inibição do crescimento fúngico por microrganismos. Entre os principais,

destacam-se a competição por nutrientes, produção de antibióticos, produção de enzimas líticas, e indução de resistência sistêmica. Embora não tenha sido o escopo desse trabalho, os autores reconhecem que a observação das interações microbianas F-1, F-2 e F-3, associada à compreensão dos mecanismos de ação desses isolados, permitiria o desenvolvimento de formulações otimizadas para o controle biológico de doenças em citros. Além disso, a utilização de biocontroladores microbianos para aumento da sustentabilidade da agricultura.

A obtenção de isolados com potencial para biocontrole em solos de pomares cítricos demonstra a riqueza e a importância da

comunidade microbiana do solo para a agricultura, corroborando com a pesquisa de Köberl *et al.* (2020). A bioprospecção de microrganismos com propriedades antagônicas em ambientes agrícolas, especialmente como encontrados na linhagem F-1 desse estudo, pode levar à descoberta de novos agentes de controle biológico para diversas doenças. Dove *et al.* (2021) demonstram que a diversidade microbiana do solo está diretamente relacionada à saúde das plantas e ecossistemas. Solos com alta diversidade microbiana apresentam maior capacidade de suprimir doenças e promover o crescimento das plantas. Dessa forma, a bioprospecção de microrganismos em diferentes ambientes agrícolas pode revelar uma ampla gama de agentes de controle biológico com potencial para o manejo de diversas doenças. A utilização de biocontroladores microbianos pode contribuir para a construção de sistemas agrícolas mais sustentáveis e resilientes.

4 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos com os isolados do solo demonstram alto potencial para bioprospecção na agricultura. É possível identificar caráter inibitório e antagônico por fatores variados, incluindo a produção de metabólitos, competição por nutrientes e liberação de metabólitos no meio de cultura, além da velocidade de crescimento e capacidade de esporulação como o isolado F-1.

Pode ser considerado nos resultados de inibição de crescimento, que os isolados pertencem a uma comunidade microbiana adaptada a esses patógenos por suas interações frequentes no ambiente agrícola, onde tais se encontram de forma endêmica a anos. O crescimento micelial dos isolados frente a *Geotrichum citri-aurantii* e *Alternaria alternata*, apresentam características para potencial bioprospecção no mercado de fungicidas biológicos no cenário citrícola.

5 REFERÊNCIAS

- BALDASSARI, R. B.; BRANDIMARTE, I.; ANDRADE, A. G.; SOUZA, D. C. G. S.; MORRETO, C.; GOES, A. Indução da expressão precoce de sintomas de *Guignardia citricarpa* em frutos de laranja 'Pêra-rio'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 29, n. 2, p. 269-275, ago. 2007.
- CUNHA, T. Potencial de leveduras isoladas do solo e do filoplano de plantas cítricas no biocontrole de doenças de pós-colheita de citros. 2013. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2013.
- DOVE, N. C.; KLINGEMAN, D. M.; CARELL, A. A.; CREGGER, M. A.; SCHADT, C. W. Fire alters plant microbiome assembly patterns: integrating the plant and soil microbial response to disturbance. **New Phytologist**, v. 230, n. 6, p. 2433-2446, 2021
- FAESP, **Citricultura Paulista em recuperação**, São Paulo, 2022. Disponível em: <https://faespsenar.com.br/citricultura-paulista-em-recuperacao>.>Acesso em: 26 julho de 2022.
- FEICHTENBERGER, E.; SPÓSITO, M. B. Doenças fúngicas dos citros: manejo integrado. **Revista Visão Agrícola**, Piracicaba, n. 2, p. 44-47, 2004.
- FISCHER, I. H.; TOFFANO, L.; OURENÇO, S. A.; AMORIM, L. Caracterização dos danos pós-colheita em citros procedentes de "packinghouse". **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, n. 4, p. 304-310, 2007.
- FUNDECITRUS. **Inventário de árvores e estimativa da safra de laranja do cinturão citrícola de São Paulo e Triângulo/Sudoeste Mineiro** Araraquara: Fundecitrus, 2022.
- JUNG, L. F. Fungos Endofíticos de Citros no controle biológico de *Phyllosticta citricarpa*. 2012. Dissertação (Mestrado em Genética) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

KÖBERL, M.; WAGNER, P.; MULLER, H.; MATZER, R.; UNTERFRAUNER, H.; CERNAVA, T.; BERG, G. Unraveling the complexity of soil microbiomes in a large-scale study subjected to different agricultural management in Styria. **Frontiers in microbiology**, Graz, v. 11, article 1052, p. 1-11, 2020.

MARTELLI, I. B. Manejo da mancha marrom de alternaria em citros: Poda de limpeza e correlação com a lagarta minadora. 2011. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical/ Tecnologia de Produção Agrícola) – Instituto Agrônomo de Campinas, Universidade de Campinas, Campinas, 2011.

POVEDA, J.; ABRIL-URIAS, P.; ESCOBAR, C. Biological Control of Plant-Parasitic

Nematodes by Filamentous Fungi Inducers of Resistance: *Trichoderma*, Mycorrhizal and Endophytic Fungi. **Frontiers in Microbiology**, Salamanca, v. 11, n. 992. p. 1-14, 2020.

SOUZA, J. L.; FERREIRA, F. J. F. Anomalias aerogamaespectrométricas (K, eU e eTh) da quadricula de Araras e suas relações com processos pedogenéticos e fertilizantes fosfatados. **Revista Brasileira de Geofísica**, Curitiba, v. 23, n. 3, p. 251-274, 2005.

TALON, M.; GMITTER JÚNIOR., F. G. Citrus Genomics, **International Journal of Plant Genomics**, Moncada, v. 2008, article 528361, p. 1-17, 2008.