UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA – MESTRADO EM PRODUÇÃO E PROTEÇÃO VEGETAL

WAGNER TEIXEIRA SORIANO

AVALIAÇÃO DE MÉTODOS ALTERNATIVOS NO CONTROLE DE *Phytophthora* sp EM LARANJA PÊRA E LIMÃO CRAVO

RIO LARGO
2011

WAGNER TEIXEIRA SORIANO

AVALIAÇÃO DE MÉTODOS ALTERNATIVOS NO CONTROLE DE *Phytophthora* sp EM LARANJA PÊRA E LIMÃO CRAVO

Dissertação apresentada à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Agronomia – Centro de Ciências Agrárias (CECA) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL) – como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Produção e Proteção Vegetal.

Orientadora: Profª Drª Edna Peixoto da Rocha Amorim

RIO LARGO
2011

Catalogação na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

S714a Soriano, Wagner Teixeira.
Avaliação de métodos alternativos no controle de *Phytophthora* sp em laranja pêra e limão cravo / Wagner Teixeira Soriano. – 2011.
68 f. : tabs., grafs.

Orientadora: Edna Peixoto da Rocha Amorim.
Dissertação (mestrado em Agronomia: Produção e Proteção Vegetal) – Universidade Federal de Alagoas. Centro de Ciências Agrárias. Rio Largo, 2011.

Bibliografia: f. 52-64.
Apêndices: f. [65]-68.

1. Laranja pêra. 2. Limão cravo. 3. *Phytophthora* sp. 4. Controle alternativo. 5. Produtos naturais. 6. Tratamento hidrotérmico. I. Título.

CDU: 581.2

TERMO DE APROVAÇÃO

WAGNER TEIXEIRA SORIANO
Matrícula Nº: 09130090

AVALIAÇÃO DE MÉTODOS ALTERNATIVOS NO CONTROLE DE *Phytophthora* sp EM LARANJA PÊRA E LIMÃO CRAVO

Dissertação aprovada em 10 de agosto de 2011, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Produção e Proteção Vegetal do Curso de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal de Alagoas, pela seguinte banca examinadora:

_____
Profª. Drª. Edna Peixoto da Rocha Amorim
(Orientadora/CECA – UFAL)

_____
Drª. Marissônia de Araújo Noronha
(EMBRAPA – Tabuleiros Costeiros)

_____
Prof. Dr. Júlio Alves Cardoso Filho
(CECA – UFAL)

_____
Prof. Dr. Marcelo de Menezes Cruz
(CECA – UFAL)

Dedico essa dissertação...

...aos meus pais*, Berenice Teixeira Soriano e Warner Rodrigues Soriano, por todo amor dado e pelo apoio nas horas de dificuldades.*

...as minhas irmãs*, Cristina Maria Soriano Ramalho e Virgínia Maria Teixeira Soriano de Melo, pelo carinho e companheirismo. E em especial a minha irmã Vera Carla Teixeira Soriano, pelas caronas e tempo gasto para resolver meus problemas.*

...aos meus cunhados*, Alcy Claudio de Araújo Ramalho e Ricardo Moreira de Melo, pelo apoio.*

...aos meus sobrinhos*, Bruno Teixeira Soriano Gomes, Jannine Teixeira Soriano Gomes, Juliana Soriano Ramalho e Rafael Soriano de Brito Lira, pelo incentivo e pelo carinho.*

...aos meus tios*, Astréia Teixeira de Araújo, Disnaldo Teixeira de Araújo* (*In Memorian*) *e Elsa Maria Salete Soriano Valença, pelo carinho e dedicação.*

...aos meus padrinhos*, Cristina de Araújo Medeiros e José Corrêa Medeiros, pelo carinho e apoio.*

...aos meus primos*, Astra Teixeira Koehler Maciel, Cristiano Robério Araújo Medeiros, Isabel Cristina Rocha Teixeira, José Corrêa Medeiros Júnior, José Roberto Araújo Medeiros, Júlio César Araújo Medeiros, Sânia Teixeira Koehler, Sayra Teixeira Koehler Bezerra e Samuel Koehler Júnior, pelo incentivo.*

...aos meus amigos*, Adélia Carla Vertano da Silva, Ana Rúbia Batista Ribeiro, Clarissa França Tavares de Souza, Inaura Patrícia da Silva Santos, Jairo Cassimiro dos Santos, Júlio César da Silva, Laís Peixoto da Rocha Soares, Leonardo da Fonseca Barbosa, Letícia Marroquim, Maíra Estanislau Soares de Almeida, Maria Danielma dos Santos Reis,*

Marianna Brandão Baptista, Nádia Maria Moraes, Paula Walleska Sena, Plácido Fabrício Silva Melo Buarque, Polyanne Souto de Brito, Raíssa Cavalcante Pinto, Sandra Hiromi Kamei, Victor Xavier Brito, Washington Soares Ferreira Júnior e Willian Fernandes de Araújo Barbosa, por compreenderem a minha ausência em momentos importantes, pela troca de conhecimentos e pela motivação.

***...aos colegas de mestrado**, Adriano Jorge Nunes dos Santos, Alice Maria Nascimento de Araújo, Ana Cristina Nascimento dos Santos, Ana Paula Pereira da Fonseca, Clênio da Silva Santana, Djison Silvestre dos Santos, Hully Monaísy Alencar Lima, Inaura Patrícia da Silva Santos, Leilianne Souza, Leonardo da Fonseca Barbosa, Maria Quitéria Cardoso dos Santos, Romel Duarte Vilela, Taciana de Lima Salvador, Valdelane Tenório da Silva, Vanessa de Melo Rodrigues, Tiago Jorge de Araújo Barbosa e Wellington costa da Silva.*

***...a minha orientadora**, Edna Peixoto da Rocha Amorim, pela paciência e apoio, pelos ensinamentos profissionais e de vida, por ter sido uma verdadeira educadora e amiga.*

***...a Deus**, qualquer que seja o nome que Ele receba nas diferentes religiões, essa força espiritual e mágica, que nos ampara e fortalece nos momentos difíceis, e nos enche de paz, alegria e amor.*

...a todas as demais pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para a execução desse trabalho.

AGRADECIMENTOS

***A Universidade Federal de Alagoas (UFAL)**, na pessoa da Magnífica Reitora Ana Dayse Rezende Doria, pelo ensino gratuito e de qualidade.*

***A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoas de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Alagoas (FAPEAL)** pela concessão das bolsas de mestrado.*

***Aos professores doutores**, Edna Peixoto da Rocha Amorim, Gaus Silvestre de Andrade Lima, Iraildes Pereira de Assunção, Jorge Braz Torres, Laurício Endres, Leila de Paula Rezende, Maria de Fátima Silva Muniz, Paulo Vanderlei Ferreira, Sonia Maria Forti Broglio e Vilma Marques Ferreira, pela contribuição na minha formação profissional.*

***A minha orientadora**, Edna Peixoto da Rocha Amorim, pela orientação nesse trabalho.*

***Aos colegas de laboratório**, David Vitor dos Santos, Edypo Jacob da Silva, Georgia de Souza Peixinho, Inaura Patrícia da Silva Santos, Júlio César da Silva, Laís Peixoto da Rocha Soares, Leonardo da Fonseca Barbosa, Marylia Gabriella Silva Costa, Otávio Couto Salgado e Tiago Alexandre da Silva, pela troca de experiências, ajuda na montagem dos experimentos e contribuição na produção desse trabalho.*

***A Milânya Paula Duarte de Assis** pela ajuda na montagem dos experimentos.*

***Aos funcionários do CECA-UFAL**, por sempre se mostrarem solícitos e prestativos.*

"...a reforma agrária atual, que chamamos agora de popular, deve vir combinada com novas técnicas agrícolas respeitosas do meio ambiente, naquilo que chamamos de agroecologia. E esse tipo de reforma agrária não só está na ordem do dia, como se acentua cada vez mais sua necessidade, na medida em que o agronegócio produz apenas para exportação, produz alimentos cada vez mais contaminados pelo alto uso de agrotóxicos, e expulsa a mão-de-obra do campo... E a população começa a se dar conta que precisa mudar. Os ricos já migraram para as gôndolas de produtos orgânicos, por que sabem como se produz a comida pelo capitalismo, que a reduziu a uma mercadoria. Comida não é mercadoria, é um direito natural de sobrevivência de todo ser humano..."

João Pedro Stédile

RESUMO

Phytophthora spp são responsáveis por uma das principais doenças da cultura dos citros. As dificuldades de controle e o impacto causado pelo uso de agroquímicos têm levado a procura de métodos alternativos de controle. Assim, este trabalho teve por objetivo avaliar o controle de *Phytophthora* sp, utilizando produtos naturais, termoterapia, *Trichoderma* spp e rizobactérias. Foram realizados experimentos visando avaliar o efeito da manipueira, Ecolife®, óleo de nim, óleo de eucalipto, óleo de citronela, óleo de pimenta-de-macaco e fungicida (metalaxyl + mancozeb) em diferentes concentrações, bem como o efeito de rizobactérias e *Trichoderma* spp, sobre a inibição do crescimento micelial do patógeno em meio batata-dextrose-ágar. Frutos de laranja pêra inoculados com uma suspensão do patógeno (20 esporângios/fruto) foram pulverizados com os óleos e extratos vegetais (5 mL/fruto) ou foram submetidos à termoterapia em banho-maria, sob diferentes temperaturas, para avaliar a capacidade dos tratamentos em diminuir a porcentagem das áreas lesionadas. Sementes de limão cravo foram microbiolizadas, semeadas em tubos de ensaio contendo Ágar-Água e incubados a 28°C sob luz constante, para avaliar a capacidade dos microrganismos em colonizar o sistema radicular. Em outro ensaio, as sementes microbiolizadas foram semeadas em vasos contendo substrato autoclavado e infestado, mantidos em telado por 45 dias. A incidência da doença e a promoção de crescimento foram avaliados ao final do período de incubação. Em todos os ensaios foi utilizado delineamento inteiramente casualizado e as médias comparadas pelo teste de Tukey (5%). Dentre as concentrações de óleos, extratos e do fungicida destacaram-se as concentrações: manipueira 20%, óleo de citronela 1,5%, óleo de eucalipto 1,0%, óleo de pimenta-de-macaco 0,5%, Ecolife® 1,0%, óleo de nim 1,5% e fungicida 2,5 g. L^{-1} que apresentaram porcentagem de inibição de crescimento micelial do patógeno, variando de 73,8% a 100%. Algumas das rizobactérias testadas e *Trichoderma* spp foram capazes de inibir o crescimento micelial do patógeno. O tratamento com óleo de pimenta-de-macaco foi o que apresentou as menores áreas lesionadas nos frutos com média de 8,57%. O controle da doença foi obtido tratando-se os frutos de laranja pêra a 52ºC por três minutos e 50ºC, 51ºC, 52ºC e 53ºC por cinco minutos. Os isolados de rizobactérias possuem a capacidade de colonizar as raízes de citros, mas *Trichoderma* spp não apresentaram esse comportamento. Todos os isolados estudados apresentaram a capacidade de controlar a severidade da doença causada por *Phytophthora* sp sob condições controladas. Métodos alternativos se mostraram promissores no controle de *Phytophthora* sp.

Palavras-chave: Óleos essenciais. Extratos vegetais. Hidrotermoterapia. Oomiceto. Gomose

ABSTRACT

Phytophthora spp are responsible for a major disease of citrus crops. The difficulties of control and the impact caused by the use of agrochemicals have led the search for alternative control methods. Thus, this study aimed to evaluate the control of Phytophthora sp using natural products, thermotherapy, and Trichoderma spp rhizobacteria. Experiments were performed to evaluate the effect of manipueira, Ecolife ®, neem oil, eucalyptus oil, citronella oil, oil of *Piper aduncum* and fungicide (metalaxyl + mancozeb) at different concentrations, as well as the effect of rhizobacteria and *Trichoderma* spp, on the inhibition of mycelial growth of the pathogen in potato-dextrose-agar medium. Orange fruits variety "pêra" inoculated with a suspension of the pathogen (20 sporangia/fruit) were sprayed with oils and plant extracts (5 mL/fruit) or underwent thermotherapy in a water bath, at different temperatures, to assess the ability of the treatments decrease in the percentage of injured areas. Seeds of "cravo" lemon were microbiolized and sown in test tubes containing water-agar and incubated at 28 °C under constant light, to assess the ability of microorganisms to colonize the root system. In another experiment, microbiolized seeds were sown in pots and infested autoclaved substrate, kept in a greenhouse for 45 days. The incidence of the disease and the promotion of growth were measured at the end of the incubation period. In all tests were used a randomized design and means were compared by Tukey test (5%). Among the concentrations of oils, extracts and the fungicide concentrations stood out: manipueira 20%, citronella oil 1.5%, eucalyptus oil 1.0%, oil of *Piper aduncum* 0.5%, Ecolife ® 1.0%, neem oil 1.5% and fungicide 2.5 g. L^{-1} showed that the percentage of inhibition of mycelial growth of the pathogen, ranging from 73.8% to 100%. Some of rhizobacteria and *Trichoderma* spp tested were able to inhibit the mycelial growth of the pathogen. Treatment with oil of *Piper aduncum* presented the injured areas in the smaller fruits with an average of 8.57%. The disease control was obtained treating orange fruits variety "pêra" at 52 °C for three minutes and 50 °C, 51 ºC, 52 ºC and 53 °C for five minutes. The isolates of rhizobacteria have the ability to colonize the roots of citrus, but *Trichoderma* spp didn't show this behavior. All isolates studied had the ability to control the severity of disease caused by *Phytophthora* sp under controlled conditions. Alternative methods showed promise in control of *Phytophthora* sp.

Keywords: Essential oils. Plant extracts. Hydrothermoterapy. Oomycete. Gummosis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Sintomas causados por *Phytophthora* spp em citros. A) Laranjeira apresentando secamento. B) Necrose do tecido vegetal. C) Apodrecimento do sistema radicular. D) Podridão-parda em fruto de laranja. E) Lesão com exudação de goma. F) Rachaduras no tronco..... 20

Figura 2 – Isolamento de *Phytophthora* sp por meio de isca. A) Becker contendo solo de áreas com histórico de gomose e fruto de pêra; B) Pêra apresentando sinais e sintomas do patógeno após cinco dias..... 27

Figura 3 – Teste de patogenicidade, fruto de pêra apresentando sintomas característicos de podridão causada por *Phytophthora* sp..... 34

Figura 4 – Placa de Petri contendo o crescimento micelial de *Phytophthora* sp (A). Hifas cenocíticas e esporângio de *Phytophthora* sp (B)..... 35

Figura 5 – Crescimento micelial de *Phytophthora* sp em presença de rizobactérias..... 39

Figura 6 – Inibição *in vitro* do crescimento micelial de *Phytophthora* sp..... 40

Figura 7 – Efeito de produtos naturais e de fungicida no controle da podridão de *Phytophthora* em frutos de laranja pêra..... 41

Figura 8 – Efeito do tratamento térmico no controle da podridão de *Phytophthora* sp em frutos de laranja pêra..... 44

Figura 9 – Frutos de laranja pêra tratadas com hidrotermoterapia: T = testemunha, T 1 = 50 ºC/3'; T 2 = 51 ºC/3'; T 3 = 52 ºC/3'; T 4 = 53 ºC/3'; T 5 = 50 ºC/5'; T 6 = 51 ºC/ 5'; T 7 = 52 ºC/5'; T 8 = 53ºC/5'; F = fungicida..... 45

Figura 10 – Raízes de limoeiro cravo tratadas com os isolados bacterianos em substrato infestado com *Phytophthora* sp..... 48

Figura 11 – Controle de *Phytophthora* sp através da microbiolização de sementes de limão cravo com rizobactérias e *Trichoderma*, após 40 dias de inoculação... 49

Figura 12 – Altura da parte aérea de mudas de citros, obtidas de sementes microbiolizadas com rizobactérias e *Trichoderma* spp, em substrato infestado com *Phytophthora* sp..... 49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Efeito de óleos essenciais, extratos vegetais e fungicida sobre o crescimento micelial de *Phytophthora* sp 36

Tabela 2 – Modo de ação dos produtos testados sobre o crescimento micelial de *Phytophthora* sp..... 38

Tabela 3 – Avaliação da colonização do sistema radicular nos tratamentos com *Trichoderma* spp, rizobactérias e fungicida, após 30 dias de incubação (*in vitro*)..... 46

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 12
2 REVISÃO DA LITERATURA 14
2.1 Botânica, distribuição geográfica, importância econômica e problemas fitossanitários dos citros 14
2.2 Gomose de *Phytophthora* em citros 17
2.3 Controle da gomose de *Phytophthora* 19
3 METODOLOGIA 26
3.1 Obtenção do isolado de *Phytophthora* sp 26
3.2 Isolamento e seleção de rizobactérias para o controle de *Phytophthora* sp 27
3.3 Inibição do crescimento micelial de *Phytophthora sp in vitro* 28
3.3.1 Efeito de óleos essenciais, extratos vegetais e fungicida 28
3.3.2 Efeito da ação de rizobactérias 29
3.3.3 Efeito da ação de *Trichoderma* spp 30
3.4 Controle da podridão de *Phytophthora* em frutos de laranja pêra 31
3.4.1 Efeito de produtos naturais e de fungicida 31
3.4.2 Efeito do tratamento térmico 31
3.5 Controle biológico de *Phytophthora* sp com rizobactérias e *Trichoderma* spp 32
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 34
4.1 Teste de patogenicidade 34
4.2 Identificação do patógeno 35
4.3 Efeito de óleos essenciais, extratos vegetais e fungicida sobre o crescimento micelial de *Phytophthora* sp *in virto* 35
4.4 Seleção e antagonismo de rizobactérias para o controle de *Phytophthora* sp 39
4.5 Efeito de *Trichoderma* spp sobre o crescimento micelial de *Phytophthora* sp *in vitro* 40
4.6 Efeito dos óleos essenciais, extratos vegetais e fungicida no controle da podridão de *Phytophthora* em frutos de laranja pêra 41
4.7 Efeito do tratamento térmico no controle da podridão de *Phytophthora* em frutos de laranja pêra 43
4.8 Colonização de raízes de citros por rizobactérias e *Trichoderma in vitro* 46
4.9 Controle biológico de *Phytophthora* sp com rizobactérias e *Trichoderma* spp em condições controladas 48
5 CONCLUSÕES 51
REFERÊNCIAS 52

APÊNDICES 65

1 INTRODUÇÃO

Os citros são cultivados e comercializados em todo o mundo, sendo uma das fruteiras de maior destaque do agronegócio. Seus frutos são bastante apreciados no mundo todo, podendo ser consumidos *in natura* ou em forma de sucos, néctares, geléias e doces. A citricultura mundial movimenta bilhões de dólares por ano em serviços e produtos comercializados (NEVES et al., 2011).

O Brasil ocupa posição de destaque no cenário mundial, sendo o principal produtor e exportador de suco de laranja, produzindo 80% de todo o suco que é comercializado mundialmente (NEVES et al., 2011; VIANA et al., 2004), durante essa produção a indústria gera toneladas de resíduos, a chamada polpa cítrica. Este subproduto pode ser utilizado na alimentação de animais, principalmente de ruminantes (TOKARNIA; PEIXOTO; CUNHA, 2001), e na produção de silagem (RODRIGUES et al., 2005). Da polpa cítrica podem ser extraídos óleos essências, principalmente das cascas e sementes.

O Estado de São Paulo é o maior produtor de citros do país, destacando-se na produção de laranja, que representa aproximadamente 93% da produção de citros do estado (BOTEON, 2011). Essa realidade se reflete nos demais estados produtores do país. No Estado de Alagoas a atividade citrícola é favorecida pelas condições climáticas, que apresentam aspectos benéficos para o desenvolvimento da cultura, além da tradição no cultivo da laranja "Lima", cujos frutos, favorecidos pelas condições ambientais, apresentam excelente qualidade e amplas possibilidades de competir com os que são produzidos em outras regiões (COELHO, 2004).

Entretanto, a citricultura mundial sofre com diversos problemas fitossanitários, que são responsáveis por perdas na produtividade e, conseqüentemente, nos lucros, além de elevar os custos da produção. Ataques por insetos fitófagos, nematóides, fungos, bactérias, vírus e viróides, são alguns dos problemas enfrentados pela cultura dos citros (MALAVOLTA *et al*., 1994).

Alguns oomicetos do gênero *Phytophthora* são causadores de doenças que acometem os citros, tanto em pré-colheita, quanto em pós-colheita. *Phytophthora* spp causam gomose, podridão de raízes e radicelas, podridão-parda nos frutos e damping-off em plântulas, sendo a gomose uma das principais doenças da cultura dos citros (FEICHTENBERGER, 2001).

O controle de *Phytophthora* spp envolve um conjunto de medidas preventivas e curativas (BASSAN et al., 2010). O controle químico é bastante eficiente, mas não é o mais indicado, visto que o uso de agrotóxicos gera uma série de impactos ambientais, como contaminação de alimentos e lençóis freáticos, e pode causar desequilíbrio nas populações microbianas no solo, acarretando o surgimento de populações do patógeno resistentes a estes compostos químicos (DAVIS, 1982; LEONI; GHINI, 2003; MORANDI; BETTIOL, 2009; SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN; CRUZ, 2000).

A pressão da sociedade por alimentos sem resíduos de agrotóxicos, que não sejam um risco potencial a saúde do consumidor e para o ambiente, torna urgente a busca por alternativas no controle das doenças (LEONI; GHINI, 2003; LUDWIG et al., 2009; PRIMAVESI, 1997; QUEIROZ; MELO, 2006; VERZIGNASSI et al., 2003).

A utilização de compostos naturais e de microrganismos, utilizados como bioprotetores em microbiolizações ou como promotores de crescimento, tem mostrado bons resultados no controle de fitopatógenos (BARGUIL et al., 2005; FURTADO, 2006; POZO et al., 2007; VINALE et al., 2008). Estes últimos, com a vantagem de serem capazes de se reproduzir, podendo dispensar novas aplicações (SPIEGEL; CHET, 1998).

Sendo assim, esse trabalho teve por objetivos:

- Testar a ação de óleos essenciais, extratos vegetais e microrganismos sobre o crescimento micelial do patógeno *in vitro*;
- Avaliar o uso de extratos vegetais, óleos essenciais e termoterapia no controle da podridão-parda causada por *Phytophthora* sp em frutos de laranja “pêra”;
- Verificar a capacidade de microrganismos em servir como bioprotetores de sementes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Botânica, distribuição geográfica, importância econômica e problemas fitossanitários dos citros

Os citros apresentam uma taxonomia muito complexa, principalmente com relação ao número de espécies que constituem o gênero *Citrus* e os gêneros correlacionados (WEILER et al., 2010). Atualmente, o sistema mais utilizado para taxonomia de *Citrus* é o de Swingle, que, em 1943, propôs 16 espécies distribuídas em dois subgêneros: *Citrus*, com dez espécies, e *Papeda*, com seis espécies (CORAZZA-NUNES et al., 2005). O gênero *Citrus* se destaca dos demais por possuir uma economia considerável (SOUZA; LORENZI, 2008).

As espécies que compõem o gênero *Citrus* Linnaeus são plantas dicotiledôneas pertencentes à família *Rutaceae*, subfamília *Aurantioideae* (= *Citroidea*), tribo *Citreae*, subtribo *Citrinae* (CORAZZA-NUNES et al., 2005; MEDINA-FILHO; BORDIGNON; BALLVÉ, 1998; SOUZA, F. et al., 2007). A subtribo *Citrinae* contém treze gêneros, incluindo *Citrus, Fortunella* e *Poncirus*, os quais têm importância econômica mundial (WEILER et al., 2010).

Esse gênero é representado por árvores perenes, copas com ramos angulares, espinhos axilares, folhas unilobadas, flores brancas e aromáticas, isoladas ou em grupos, em geral com 4-5 sépalas, 4-8 pétalas. O androceu é constituído por numerosos estames ligados em feixes e o gineceu apresenta ovário único com 8-15 carpelos fusionados, contendo normalmente 4-8 óvulos. Os frutos, com cor e forma variadas, são envolvidos por uma casca coriácea. A polpa é constituída por vesículas de suco pedunculadas e ligadas à parede dorsal do loco. Os septos carpelares são separados pelo endocárpio, um tecido branco denominado de albedo. As sementes, de formato obovóide a arredondado, podem conter de um a vários embriões (SWINGLE; REECE, 1967[1] apud CORAZZA-NUNES et al., 2005).

Estima-se que o gênero *Citrus* e gêneros correlatos surgiram há cerca de 20 a 30 milhões de anos e que seu provável centro de origem e diversidade compreenda as regiões tropicais e subtropicais do continente Asiático e Arquipélago Malaio, de onde se

[1] SWINGLE, W. T.; REECE, P. C. The botany of *Citrus* and its wild relatives. In: REUTHER, W.; WEBBER, H. J.; BATCHERLOR, L. D. (Ed.). **The citrus industry**. v. 1. Riverside: University of California Press, 1967. p. 190-430.

disseminaram para todo o mundo (CAMPOS, 1976; WEBBER, 1967[2] apud CORAZZA-NUNES et al., 2005).

A disseminação mundial de citros tem sido associada às grandes explorações e aos conflitos da história, incluindo as conquistas de Alexandre, o Grande, a dispersão da religião mulçumana, que durante a Idade Média disseminou os citros pela Europa, e as explorações de Colombo, que trouxeram para as Américas as plantas cítricas, em fins do século XV (CAMPOS, 1976; NEVES et al., 2011; WEILER et al., 2010).

A citricultura foi introduzida no Brasil pelos primeiros colonizadores, nos primórdios do descobrimento, mais especificamente no atual Estado da Bahia, expandindo-se para todo o território nacional (KOLLER, 1994[3] apud WEILER et al., 2010). A maior região produtora de laranja do país é a Sudeste, que abrange 82,2% da produção nacional, seguida pelo Nordeste (10,3%), Sul (5,5%), Norte (1,3%) e Centro-Oeste (0,7%) (IBGE, 2011).

O Estado de São Paulo é responsável por 80% da produção de frutas do mercado nacional e 70% da produção mundial de suco de laranja concentrado (MEHTA et al., 2007; SOUZA et al., 2007a). Neste estado existem 517 viveiros com plantios de 8,6 milhões de porta-enxertos e 17,6 milhões de mudas (AMARO; BAPTISTELLA, 2009). Os benefícios gerados pela produção citrícola não se restringem apenas ao Estado de São Paulo, compreendem outros estados que também possuem grande relevância na citricultura, como Minas Gerais, Bahia, Sergipe, Rio Grande do Sul e Paraná (BORGES; COSTA, 2006).

O Estado de Alagoas é o terceiro maior produtor de citros da Região Nordeste do Brasil, sendo ultrapassado apenas por Bahia e Sergipe, possuindo uma área cultivada em torno de 4.428 hectares e uma produção que se aproxima de 35 mil toneladas. A citricultura de Alagoas tem como diferencial a sua produção baseada no cultivo de laranja da variedade "lima", particularidade que destaca o Estado como o principal produtor desta variedade no Nordeste (COELHO, 2004).

Entre as espécies de citros, a cultura da laranja [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] ocupa praticamente 100% da área cultivada com citros em Alagoas, sendo a terceira mais importante dentre as frutíferas, com uma produção estimada para 2011 de 51.036 toneladas, em uma área colhida de 4.253 hectares, um aumento superior a 10% em relação à produção do ano anterior. (IBGE, 2011) Os municípios alagoanos que se destacam na produção de laranja são Branquinha, Santana do Mundaú, União dos Palmares, São José da Laje e Ibateguara, tais

[2] WEBBER, J. H. History and development of the Citrus industry. In: REUTHER, W.; BATCHELOR, L. D.; WEEBER, H. J. (Ed.). **The citrus industry**. Berkeley: University of California Press, 1967. p. 01-39.

[3] KOLLER, O. C. **Citricultura: laranja, limão e tangerina**. Porto Alegre: Rigel, 1994. p. 446.

municípios fazem parte do APL (Arranjo Produtivo Local) da laranja (ESTADO DE ALAGOAS, 2008).

Dentre as fruteiras cultivadas comercialmente os citros são as de maior importância econômica no mundo, sendo cultivado em países desenvolvidos e em desenvolvimento (IGLESIAS et al., 2007), com uma produção mundial no ano de 2009 de aproximadamente 67.601.635 toneladas (FAO, 2011). O cultivo de citros desempenha um papel de acentuada importância sócio-econômica, destacando-se principalmente o consumo *in natura* da fruta ou do seu suco (BATISTA; AZEVEDO; BERNHARD, 2002).

As frutas cítricas estão entre as principais categorias responsáveis pelo crescimento da fruticultura nacional. A citricultura constitui um importante segmento na estrutura sócio-econômica do Brasil, com segmentos altamente organizados e iniciativas competitivas (CASTRO, 2009; CRISTOFANI-YALY et al., 2007; SOUZA et al., 2007b; TAKITA et al., 2007). A importância brasileira como produtor de citros está embasada principalmente na laranja (CASTRO, 2009).

O PIB do setor citrícola é de US$ 6,5 bilhões (2009), sendo US$ 4,39 bilhões no mercado interno e US$ 2,15 bilhões no mercado externo. A citricultura gera, entre empregos diretos e indiretos, um contingente de 230 mil posições, e uma massa salarial anual de R$ 676 milhões, arrecadando US$ 189 milhões em impostos para o Brasil. Na safra 2009/2010, a produção brasileira foi de 397 milhões de caixas de laranja de 40,8 Kg, sendo que o faturamento total dos elos da cadeia produtiva de frutas cítricas foi de US$ 14,6 bilhões em 2009 (NEVES et al., 2011).

As exportações não se restringem ao suco de laranja, pois a pectina, a polpa cítrica utilizada na alimentação animal, e óleos essenciais são uma parte importante dessas receitas. O óleo essencial de laranja é um subproduto da produção de suco e, portanto, torna o Brasil o principal produtor no mundo (TAKITA et al., 2007).

As frutas cítricas produzem moléculas de terpeno pertencentes a diferentes classes, a produção ocorre principalmente nas folhas, na epiderme do fruto (flavedo) e no suco. Estes terpenos são de especial interesse econômico, pois são os principais componentes dos óleos essenciais e alguns deles (carotenóides) conferem ao suco sua cor especial. Além disso, os carotenóides são bem conhecidos por serem importantes para a saúde humana (DORNELAS; MAZZAFERA, 2007).

No Brasil, como também em outros países, a polpa cítrica vem sendo amplamente utilizada na alimentação de bovinos, em especial de vacas leiteiras (TOKARNIA; PEIXOTO; CUNHA, 2001), por sua disponibilidade e seu preço de mercado, pode ser mais uma opção

como substituto ao milho para redução dos custos de produção. (MENDES NETO et al., 2007). A polpa cítrica também se mostrou como um ingrediente viável a ser utilizado em programas de restrição alimentar qualitativa de porcos (WATANABE et al., 2010).

A inclusão de polpa cítrica peletizada, em quantidades pré-determinadas, com base na massa fresca do capim, é capaz de promover uma melhora substancial na qualidade da fermentação e no valor nutritivo da silagem, visto que oferece grandes quantidades de massa seca e de carboidratos (RODRIGUES et al., 2005; RODRIGUES et al., 2007).

A citricultura mundial e brasileira apresenta inúmeras pragas e doenças (Anexos 01 e 02) que limitam sua produção e comprometem a segurança alimentar (FREITAS-ASTÚA et al., 2007; MEHTA et al., 2007). A produtividade dos citros no Estado de Alagoas é baixa devido ao uso generalizado de mudas sem boa qualidade genética e sanitária (MUNIZ; QUEIROZ; MENEZES, 2004).

O Estado de Alagoas ainda não dispõe de normatização para produção de mudas de citros. Em função disso, a produção das mudas é feita no campo, na mesma área dos plantios comerciais, contribuindo assim, para a contaminação das mudas por pragas e patógenos (MUNIZ; QUEIROZ; MENEZES, 2004). O índice de contaminação em viveiros é alto, o que pode comprometer o bom desenvolvimento das mudas no campo (MAY-DE-MIO; GHINI; KIMATI, 2002).

2.2 Gomose de *Phytophthora* em citros

O gênero *Phytophthora* está classificado dentro do Reino *Stramenopila* ou *Chromista*, Filo *Oomycota*, Classe *Oomycetes*, Ordem *Pythiales* (FLORES; IZAQUIRRE, 2009; SASSERON, 2008). A maioria das espécies desse gênero são fitopatógenos residentes no solo de pomares de citros, presentes na maioria das áreas citrícolas do mundo (FLORES; IZAQUIRRE, 2009; FEICHTENBERGER; MÜLLER; GUIRADO, 2005; MEDINA FILHO et al., 2004).

No Brasil, as doenças ocasionadas por *Phytophthora* constituem as principais doenças da cultura (AMORIM, 1997; GRAHAM, 1990; SILVA et al., 2008), principalmente em plantios novos, tendo uma incidência e severidade muito elevadas. As espécies de *Phytophthora*, patogênicas a citros, são encontradas com freqüência nas inspeções a viveiros comerciais em São Paulo e a utilização de mudas produzidas em viveiros contaminados é a principal responsável pela elevada incidência de doenças incitadas por esses patógenos em cultivos comerciais (FEICHTENBERGER, 2001).

O gênero *Phytophthora* possui mais de 60 espécies descritas (ROSA et al., 2006), mas as espécies capazes de causar doenças em citros são *P. nicotianae* Breda de Haan (=*P. parasitica* Dastur), *P. citrophthora* (Smith & Smith) Leonian, *P. boehmeriae* Sawada, *P. cactorum* (Lebert & Cohn) J. Schröeter, *P. capsici* Leonian, *P. cinnamomi* Rands, *P. citricola* Sawada, *P. drechsleri* Tucker, *P. hibernalis* Carne, *P. megasperma* Drechsler, *P. palmivora* (E. J. Butler) E. J. Butler e *P. syringae* (Kleb.) Kleb. (FEICHTENBERGER, 2001; FEICHTENBERGER; MÜLLER; GUIRADO, 2005).

As principais espécies encontradas causando danos à cultura dos citros são *P. nicotianae* e *P. citrophthora* (AMORIM; MELO, 2002; BASSAN et al., 2010), sendo a primeira associada às perdas mais significativas, tanto em viveiros como em pomares comerciais, no Estado de São Paulo (AMORIM, 1997; FEICHTENBERGER, 2001; SIVIERO et al., 2002; SIVIERO et al., 2004; VIANA et al., 2004). A espécie *P. nicotianae* é comum nas regiões subtropicais (ROSA et al., 2006).

O micélio de *Phytophthora* é hialino e cenocítico. A temperatura ótima para o crescimento micelial de *P. nicotianae* é de 27 a 32°C, seus esporângios são papilados e de forma geralmente globosa, e se forma na extremidade de hifas diferenciadas denominadas esporangióforos. A produção de esporos assexuais (zoósporos) é mais freqüente nas estações quentes e chuvosas do ano assim como a germinação das estruturas de resistência que são os clamidósporos e oósporos, esporos sexuais formados no interior de oogônios (FEICHTENBERGER; MÜLLER; GUIRADO, 2005).

O crescimento micelial, bem como a morfologia das colônias de *Phytophthora* spp, variam conforme o meio de cultura utilizado, a temperatura e o isolado. As colônias podem apresentar crescimento circuncêntrico ou petalóide, com bordas difusas ou bem delimitadas circularmente, podem apresentar micélio denso e cotonoso, ou pouco micélio aéreo (ABDANUR; SANTOS; TRATCH, 2003).

As infecções de raízes, em geral, são iniciadas a partir de zoósporos de *Phytophthora* spp, os quais são produzidos e liberados quando há água livre no solo. Os zoósporos nadam para a zona de elongação das raízes ou são atraídos por substâncias produzidas após ferimentos nas mesmas (LUTZ; MENGE; FERRIN, 1991). Na superfície das raízes, ou de outros órgãos, germinam e produzem hifas que invadem os tecidos suscetíveis. Podem ainda encistar e, desta forma, permanecem viáveis no solo por longos períodos (LUTZ; MENGE, 1991).

Estudos demonstraram que os sintomas das doenças causadas por *Phytophthora* podem variar dependendo da espécie ou cultivar de citros, da idade da planta, dos órgãos onde

ocorre o ataque ou das condições ambientais prevalecentes (AZEVEDO, 2003). Segundo Bnejdi et al. (2010), alguns dos sintomas são seca (Figura 1A) e necrose (Figura 1B). Amorim e Melo (2002) apontam a podridão radicular (Figura 1C) como um outro sintoma da doença. As árvores infectadas em geral, apresentam falta de vigor e podem morrer prematuramente (QUEIROZ; MELO, 2006).

As podridões de raízes e radicelas ocorrem tanto em viveiros como em pomares sem que as plantas apresentem os sintomas reflexos, destruindo apenas os tecidos externos do córtex, enquanto que, a podridão do colo e tronco é a manifestação mais séria da gomose de *Phytophthora*, ocorrendo necrose de tecidos localizados abaixo da casca (FEICHTENBERGER, 2001).

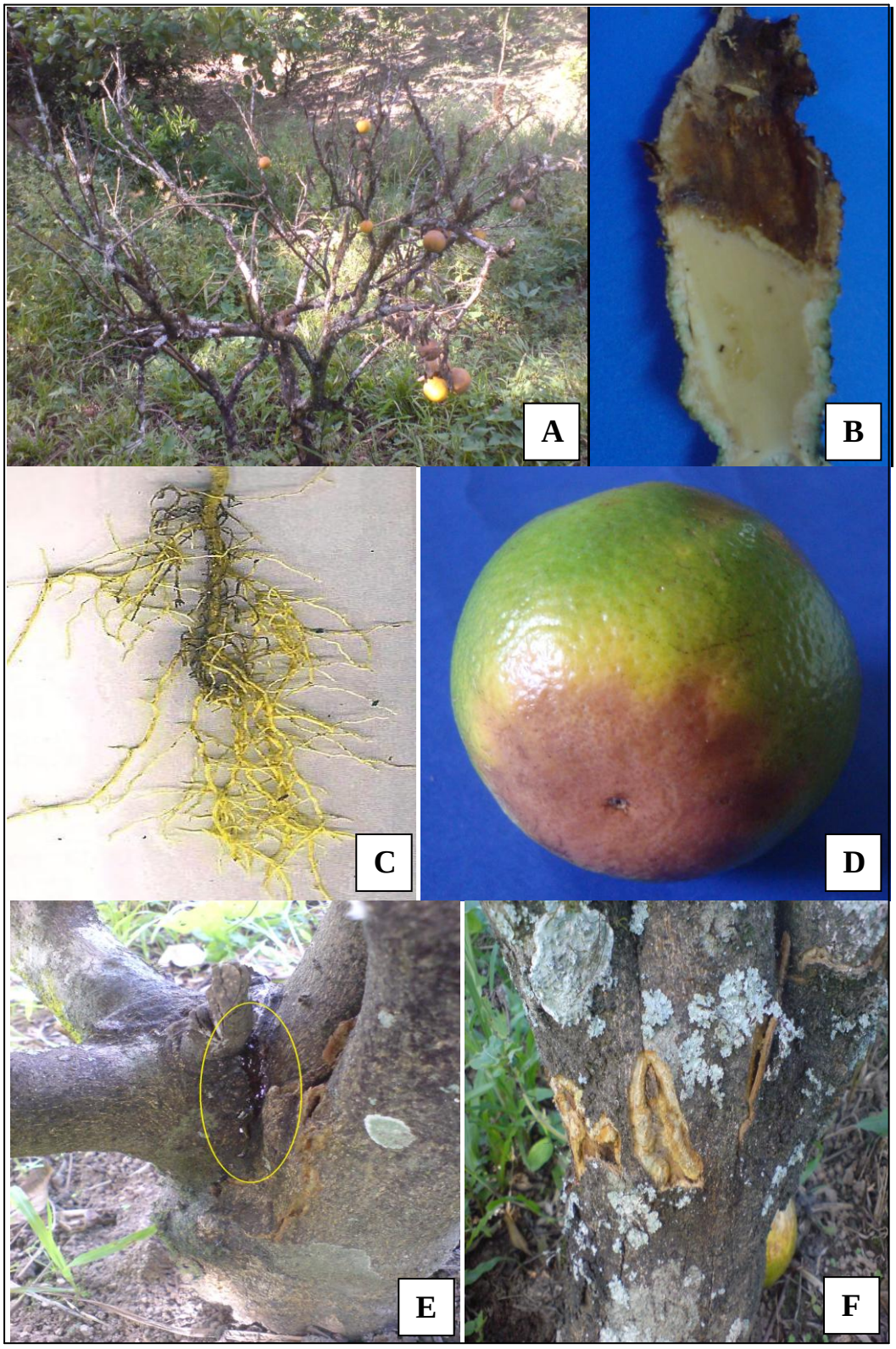
Phytophthora spp podem provocar clorose intensa das folhas correspondendo ao lado da região lesionada. Os frutos podem ser contaminados apresentando podridão seca de coloração marrom-parda (Figura 1D). Em viveiros, esse patógeno pode atacar os tecidos da região do colo das plântulas, com lesões de cor escura que podem provocar o tombamento, ocasionando a morte das mudas. Podem ainda infectar sementes e causar podridões antes mesmo da germinação (AZEVEDO, 2003).

A gomose, geralmente, se manifesta no colo da planta, provocando necrose dos tecidos e lesões com exsudação de goma (Figura 1E), principalmente, em porta-enxertos suscetíveis. Os tecidos infectados da casca se rompem mostrando rachaduras (Figura 1F) e fendilhamentos longitudinais (FEICHTENBERGER, 2001). As lesões podem se expandir para as raízes, principalmente até 20 ou 30 cm abaixo do solo e para cima do tronco. Quando as lesões se desenvolvem muito, circundando o tronco ou as raízes, a planta entra em rápido declínio, devido à destruição do floema, restringindo ou impedindo o fluxo de seiva elaborada da copa para o sistema radicular, o que provoca a morte da mesma (CALIXTO et al., 2004; FEICHTENBERGER, 2001; SILVA et al., 2008).

2.3 Controle da gomose de *Phytophthora*

A medida de controle mais importante sobre a gomose é o uso de porta-enxertos resistentes ou tolerantes, já existentes ou obtidos por programas de melhoramento genético (MEDINA FILHO et al., 2004), principalmente para o controle da podridão do colo e tronco, e as podridões de raízes e radicelas (ALVES; DEL PONTE, 2007).

Figura 1 – Sintomas causados por *Phytophthora* spp em citros. A) Laranjeira apresentando secamento. B) Necrose do tecido vegetal. C) Apodrecimento do sistema radicular. D) Podridão-parda em fruto de laranja. E) Lesão com exudação de goma. F) Rachaduras no tronco. Fonte: (SORIANO, 2011).



A laranja azeda (*Citrus aurantium* Linnaeus), resistente ao patógeno foi amplamente utilizada como porta-enxerto, mas, por ser suscetível ao vírus da tristeza (CTV), foi necessária a sua substituição pelo porta-enxerto de limão cravo (*Citrus limonia* Osbeck), sendo este menos tolerante à infecção de *Phytophthora* que a laranja azeda (MEDINA FILHO et al., 2003).

O controle químico através do uso de fungicidas específicos para oomicetos, tais como metalaxil e fosetil-Al, e o uso de fosfitos, é bastante eficiente no controle preventivo e curativo da doença. Nas lesões de troncos e ramos o fosetil-Al ou os fosfitos são eficientes, já no controle de podridões de raízes e radicelas os fosfitos e os dois fungicidas promovem resultados satisfatórios (FEICHTENBERGER, 2001).

No controle cultural são manipuladas as condições de pré-plantio e durante o desenvolvimento do hospedeiro em detrimento ao patógeno, objetivando a prevenção ou a intercepção da epidemia. Esses métodos preventivos de práticas culturais podem ser: seleção de áreas para plantio, evitando solos rasos e pouco permeáveis; adoção de práticas de conservação de solo em terrenos em declive, para evitar o arraste de propágulos do patógeno, o acúmulo de terra e detritos junto ao colo das plantas e o encharcamento do solo nas baixadas; utilização de adubos orgânicos no pomar para favorecer a microflora de solo antagônica a *Phytophthora*; plantio alto, de modo que as raízes principais fiquem no nível do solo; evitar ferimentos de tronco e raízes principais; não utilizar grades, sulcadores, subsoladores e outros equipamentos pesados no pomar adulto, em pomares irrigados por micro-aspersores, impedir que o jato d'água atinja a base do tronco das plantas (FEICHTENBERGER, 2001).

O controle físico visa interromper o ciclo da doença via manipulação de um dos componentes bióticos ou abióticos envolvidos na doença (população do patógeno, planta resistente e balanço microbiano), sendo a meta final a redução da doença de forma econômica e ambientalmente viável (GHINI; BETTIOL, 2005). A solarização é um método físico abiótico, muito utilizada na desinfestação do substrato utilizado na produção de mudas de citros (GHINI, 1991; GHINI; BETTIOL, 2005). A técnica de solarização induz a liberação de nutrientes no solo pela morte e degradação microbiana, propiciando melhores condições para os microrganismos introduzidos e para a planta (KATAN, 1980).

Alguns outros métodos alternativos no controle de patógenos vêm sendo testados com sucesso em diversos patossistemas, mas experimentos visando o controle da gomose de *Phytophthora* ainda são escassos na literatura.

O uso da termoterapia no controle de doenças de plantas tem por objetivo a obtenção de material de propagação vegetal livre de patógenos. Com tal propósito, a termoterapia é um método eficiente, que consegue eliminar os patógenos, tanto interna quanto externamente, dos tecidos do hospedeiro (FEICHTENBERGER; MÜLLER; GUIRADO, 2005).

Diferentes extratos vegetais vêm sendo testados no controle de fitopatógenos, entre eles o extrato de manipueira (extrato líquido das raízes de mandioca, *Manihot esculenta* Crantz), que se apresenta como pesticida agrícola natural com comprovada ação nematicida (FRANCO, 1986; FRANCO et al., 1990; SENA; PONTE, 1982), inseticida e fungicida (PONTE, 2000).

Produtos a base de biomassa cítrica, como o Ecolife®, que é um produto composto por bioflavonóides cítricos (vitamina P), ácido ascórbico (vitamina C) e fitoalexinas cítricas, têm sido testados no controle alternativo de doenças de plantas, sendo estudado os seus efeitos *in vitro* e *in vivo* no controle da mancha-de-phoma, causada por *Phoma costarricensis* Echandi no cafeeiro (BARGUIL et al., 2005) e sobre o crescimento micelial de *Colletotrichum* sp (VILAS-BÔAS et al., 2004), entre outros.

Entre os óleos essenciais merece destaque, o óleo de citronela, obtido a partir de folhas de *Cymbopogon nardus* Linnaeus (Poaceae) que é rico em geraniol e citronelal (TANU; ADHOLEYA, 2004), os óleos de eucalipto (*Eucalyptus citriodora* Hook., Myrtaceae), pimenta-de-macaco (*Piper aduncum* Linnaeus, Piperaceae) e nim (*Azadirachta indica* Adr. Juss., Meliaceae), que vêm sendo testados para o controle de patógenos. O controle de *Colletotrichum gloeosporioides* em *Tapeinochillus ananassae* (Hassk.) K. Schum. (Zingiberaceae) foi obtido utilizando óleos essenciais, incluindo óleo de citronela (FURTADO, 2006).

O nim tem sido muito recomendado no controle de patógenos veiculados pelo solo, no entanto, ainda há poucos trabalhos de pesquisa que elucidem a ação de subprodutos do nim sobre esses organismos (CONVENTRY; ALLAN, 2001; MARTINEZ, 2002). O crescimento de *Colletotrichum* spp, *in vitro*, foi controlado utilizando-se de diferentes concentraçãoes de nim (MIGUEL et al., 2006).

A utilização de microrganismos, como meio de controle biológico da doença, é de especialmente interessante e tecnicamente justificável (FREITAS; AGUILAR VILDOSO, 2004; MORANDI; BETTIOL, 2009; QUEIROZ; MELO, 2006; SILVA et al., 2008). A supressão de doenças mediadas por agentes de biocontrole é conseqüência das interações entre plantas, agentes patogênicos e a comunidade microbiana presente no ecossistema solo (BRITO, 2009).

O uso do controle biológico em substituição ao químico é dependente da disponibilidade e da efetividade dos agentes de controle, bem como dos produtos comerciais contendo estes microorganismos. Entretanto, até o momento, são poucos os produtos biológicos disponíveis no mercado para essa modalidade de controle (SILVA et al. 2008).

As bactérias possuem propriedades antagônicas e representam um importante grupo de microrganismos para o controle biológico de patógenos radiculares, podendo ser classificadas em bactérias endofíticas e epifíticas (MARIANO et al., 2004; MARIANO; SILVEIRA; GOMES, 2005). A atividade do controle biológico através de bactérias pode ser resultante da competição por nutrientes, competição por ferro com sideróforos e antibiose (PIETERSE et al., 2005). As bactérias podem ainda estar envolvidas no mecanismo de indução de resistência sistêmica no hospedeiro (FREITAS; AGUILAR VILDOSO, 2004).

Bactérias que colonizam raízes podem incitar um aumento no desenvolvimento e na produção do hospedeiro, sendo chamadas de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (MARIANO; SILVEIRA; GOMES, 2005). O crescimento resulta principalmente da repressão de patógenos presentes no solo, mas há também relatos do efeito direto no crescimento (PIETERSE et al., 2005). Esses efeitos diretos podem estar relacionados com a produção de hormônios vegetais, aumento da fixação de nitrogênio e disponibilidade de nitrato, solubilização de fósforo e oxidação de enxofre, bem como com o aumento da permeabilidade das raízes estimulando a absorção de nutrientes (MARIANO; SILVEIRA; GOMES, 2005).

A produtividade e a qualidade de pomares cítricos podem ser incrementadas pelo uso de rizobactérias, seja diretamente como promotoras de crescimento, seja como agentes de controle biológico de fitopatógenos, quando o efeito benéfico sobre o crescimento seria indireto (FREITAS; AGUILAR VILDOSO, 2004).

Bactérias antagonistas dos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas* têm sido avaliados como um meio de controlar podridões radiculares causadas por *Phytophthora* spp em eucalipto (MALAJCZUK; McCOMB; PARKER, 1977), soja (SNEH; HUMBLE; LOCKWOOD, 1977) e citros, pois, além de residirem no solo, rizoplano e filoplano, apresentam boas características para os estudos de controle biológico de doenças de plantas (AMORIM; MELO, 2002).

Bacillus spp produzem uma grande diversidade de metabólitos, entre eles destacam-se, bacteriocinas, antibióticos e enzimas extracelulares (tais como proteases e quitinases), elementos-chave no fenômeno de supressão de patógenos por agentes biológicos (MOJICA-MARÍN et al., 2009). Isolados de *Pseudomonas fluorescens* apresentaram antagonismo *in*

vitro contra *Pythium* spp, *Botrytis cinerea* (Fries.) Persoon, *P. nicotianae* e *Fusarium oxysporum* Schlecht (FREITAS; PIZZINATTO, 1991[4] apud SOTTERO et al., 2006)

Rizobactérias inibiram o crescimento micelial *in vitro* de *Alternaria solani* Sorauer, *R. solani*, *Sclerotium rolfsii* Sacc., *Fusarium moniliforme* Sheldon e *Exserohilum turcicum* (Pass.) Leonard & Suggs, sendo as bactérias endofíticas *Bacillus subtilis 0G* (Ehrenberg) Cohn e *B. lentimorbus* Dutky com maior potencial para o uso como agentes de biocontrole de fitopatógenos (SHIOMI; MELO; MINHONI, 2008; POZO et al., 2007).

As espécies de *Trichoderma* são fungos filamentosos não patogênicos ao homem e aos animais e após aplicação, podem persistir no solo ou nas plantas, podendo dispensar reaplicações (FARIA; ALBUQUERQUE; CASSETARI NETO, 2003; SPIEGEL; CHET, 1998). *Trichoderma* possui a capacidade de sobreviver em ambientes desfavoráveis, além de inibir populações de patógenos em condições de solo diferentes (VINALE et al., 2008).

Trichoderma spp possuem diferentes mecanismos de ação no controle de fungos fitopatogênicos, incluindo a concorrência por espaço e nutrientes, o parasitismo, a produção de compostos inibitórios, a inativação das enzimas do patógeno e indução de resistência. O parasitismo é um processo que limita o crescimento e a atividade do patógeno devido ao ataque do *Trichoderma* as hifas do hospedeiro, através de enrolamento das hifas, ganchos e apressórios, penetrando a parede celular pela ação de enzimas hidrolíticas. Essas enzimas são principalmente quitinases e glucanases que degradam parcialmente a parede celular de vários fungos (ZEILINGER; OMANN, 2007) e nematóides (SHARMA; PANDEY, 2009)

O gênero *Trichoderma* tem sido alvo de muitas pesquisas para reduzir a população de patógenos de plantas, como, por exemplo, *Phytophthora* spp. dos citros (MAY-DE-MIO; GHINI; KIMATI, 2001), sendo o mais estudado e utilizado no Brasil e em outros países da América Latina (BETTIOL et al., 2008[5] apud MORANDI; BETTIOL, 2009). A espécie *T. harzianum* Rifai, que apresenta grande potencial antagônico, é freqüentemente associada a solos supressivos a fitopatógenos (MELO, 1991; MELO, 1998).

A microbiolização das sementes, com agentes de biocontrole (bioprotetores), tem mostrado seu potencial como estratégia de controle de patógenos (FARIA; ALBUQUERQUE; CASSETARI NETO, 2003; LUDWIG et al., 2009), especialmente

[4] FREITAS, S. S.; PIZZINATTO M. A. Ação de rizobactérias sobre a incidência de *Colletotrichum gossypii* e promoção de crescimento em plântulas de algodoeiro (*Gossypium hirsutum*). **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 23, p. 36-41, 1997.

[5] BETTIOL, W. Conversão de sistemas de produção. In: POLTRONIERI, L. S.; ISHIDA A. K. N. (Eds.). **Métodos alternativos de controle de insetos-praga, doenças e plantas daninhas: panorama atual e perspectivas.** Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2008. p. 289-308.

daqueles que habitam o solo (LUZ, 1993). O tratamento de sementes com microrganismos tem sido usado para proteger as plantas contra fitopatógenos e promover um aumento nas taxas de crescimento da planta. A microbiolização das sementes, em geral, favorece o desenvolvimento das plantas, produz efeitos benéficos na germinação de sementes e na emergência de plântulas, além do desenvolvimento de grãos e produção de frutos (DINIZ et al., 2009).

3 METODOLOGIA

Os trabalhos foram conduzidos no laboratório de fitopatologia e em casa-de-vegetação do Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal de Alagoas (CECA-UFAL).

3.1 Obtenção do isolado de *Phytophthora* sp

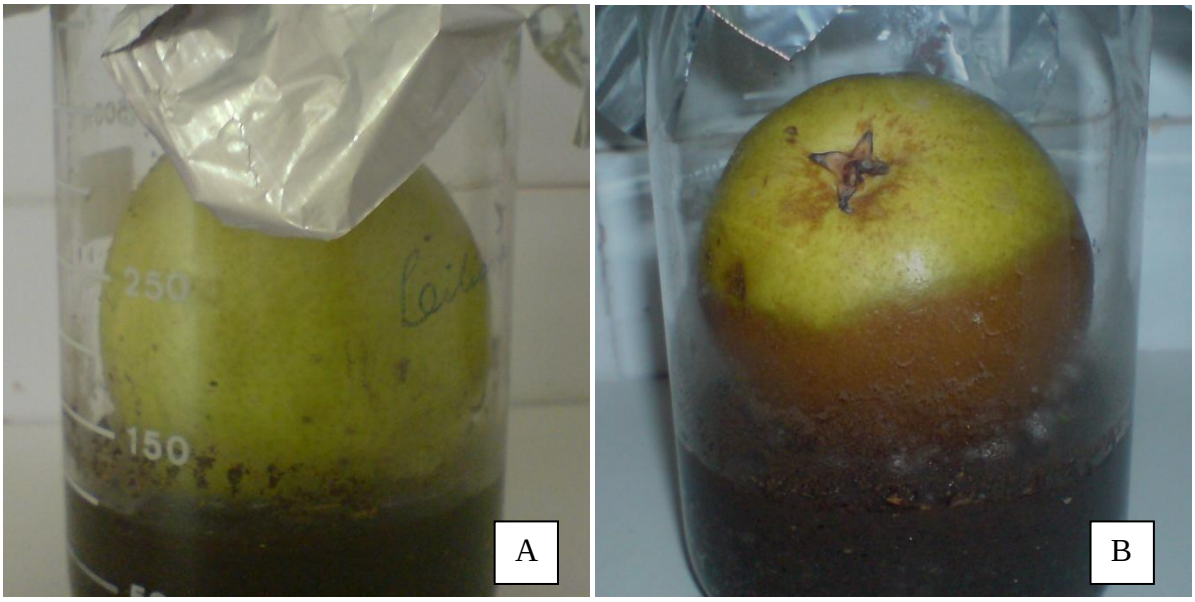
O isolamento de *Phytophthora* sp foi obtido a partir de amostras de solo coletadas de áreas cultivadas com plantas de citros apresentando sintomas de gomose, no Município de Santana do Mundaú. Cada amostra de solo foi peneirada e colocada em Becker de 500 mL, até atingir a marca correspondente a 100 mL, sendo, em seguida, umedecida com água destilada esterilizada (ADE).

A isca utilizada para o isolamento do patógeno constitui-se de um fruto de pêra, lavado com água e sabão, e posteriormente, lavado com ADE, no qual se efetuou perfurações na região do pedúnculo do fruto, com auxílio de estilete devidamente flambado. Colocou-se a pêra no Becker com a parte perfurada em contato com o solo, fazendo uma leve pressão, em seguida, cobriu-se a parte superior do Becker com papel alumínio, aguardou-se cerca de cinco dias, à temperatura ambiente (aproximadamente 28 °C), quando então apareceu o crescimento do microrganismo e necrose do tecido em torno das perfurações (Figura 2).

Micélio do microrganismo e fragmentos necrosados do fruto, desinfestados superficialmente em álcool 70% e hipoclorito de sódio 1%, foram transferidos para placa de Petri contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) adicionado de benomil, nistatina, PCNB, rifampicina e ampicilina. Após a formação das colônias transferiu-se discos de meio de cultura contendo crescimento do patógeno para outra placa com o meio BDA, sendo cultivado durante sete dias a uma temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 horas. O patógeno foi conservado a temperatura ambiente (aproximadamente 28 °C) pelo método Castellani.

A patogenicidade do isolado foi verificada em frutos de pêra, através da aplicação dos Postulados de Koch. Foram utilizados 12 frutos de pêra, desinfestados com hipoclorito de sódio e inoculados com discos de BDA contendo estruturas do patógeno na região equatorial dos frutos, sem a nescessidade de promover ferimentos nos frutos. Nos frutos que serviram como testemunhas foram utilizados discos de BDA. Todos os frutos permaneceram em câmara úmida por 48 horas.

Figura 2 – Isolamento de *Phytophthora* sp por meio de isca. A) Becker contendo solo de áreas com histórico de gomose e fruto de pêra; B) Pêra apresentando sinais e sintomas do patógeno após cinco dias. Fonte: (SORIANO, 2011).



Os frutos foram mantidos a temperatura ambiente (aproximadamente 28 °C) e foram realizadas observações diárias durante 10 dias. Os frutos que apresentaram sintomas típicos da doença foram coletados e utilizados para o re-isolamento do patógeno em placas de Petri contendo meio BDA e cenoura-ágar (CA).

O patógeno foi identificado tomando-se por base as características morfológicas apresentadas pelas culturas, facilmente observadas a olho nú, e através da visualização de estruturas do patógeno em lâminas temporárias e permanentes, com o auxílio de microscópio óptico.

3.2 Isolamento e seleção de rizobactérias para o controle de *Phytophthora* sp

O isolamento de bactérias da rizosfera de citros foi feito mediante diluição seriada e plaqueamento em meio de cultura Nutriente-Ágar (NA) de amostras de solo da rizosfera de plantas de citros que não apresentavam sintomas de doença causada por *Phytophthora* spp, coletadas no Município de Santana do Mundaú. Foram preparadas suspensões em tubos de ensaio, através da diluição de 1g de solo rizosférico de citros em 9 mL de ADE, agitados por 15 minutos, obtendo-se diluições seriadas até a diluição 10^{-6}. Para o isolamento das rizobactérias, 100 µl das três últimas diluições (10^{-4}, 10^{-5} e 10^{-6}) foram transferidos para o

meio de cultura NA e homogeneizado com alça de Drigalski esterilizada. Foram feitas três repetições para cada diluição, sendo as placas de Petri mantidas a 25 °C até o crescimento das colônias.

Para seleção de antagonistas, as placas com as colônias bacterianas foram pulverizadas com os esporos do patógeno e observadas, após alguns dias a formação de halos de inibição. As colônias das bactérias que formaram halo de inibição foram repicadas para meio de cultura NA e devidamente preservadas na coleção de microrganismo do Laboratório de Fitopatologia do CECA/UFAL.

3.3 Inibição do crescimento micelial de *Phytophthora sp in vitro*

3.3.1 Efeito de óleos essenciais, extratos vegetais e fungicida

Os extratos vegetais, óleos essenciais e fungicidas foram adicionados ao meio de cultura BDA fundente, que foi vertido em placas de Petri, sendo usadas quatro placas para cada concentração: 20%, 40% e 60% para manipueira; 0,5%, 1,0% e 1,5% para o óleo de citronela, óleo de eucalipto, óleo de pimenta-de-macaco, óleo de nim e Ecolife®; 2,5 g. L^{-1}, 3,5 g. L^{-1} e 4,5 g. L^{-1} do fungicida metalaxil + mancozeb. A testemunha foi constituída pela inoculação do disco de inoculo em placa com BDA. Todos os extratos e óleos foram esterilizados em luz UV por 30 minutos antes de serem adicionados ao meio autoclavado, segundo metodologia descrita por Barguil *et al.* (2005).

No centro de cada placa foi depositado um disco de meio BDA contendo micélio jovem retirado das bordas de colônias de *Phytophthora* sp. Após a incubação por cinco dias a temperatura ambiente (aproximadamente 28 °C) e sob luz constante, determinou-se o diâmetro médio das colônias tomado no reverso das placas de Petri, através da medição em dois sentidos diametralmente opostos, e por comparação com o crescimento das colônias nas placas testemunhas calculou-se a percentagem de inibição do crescimento micelial (P.I.C.) segundo Edginton, Knew e Barron (1971), que é expressa pela fórmula:

$$PIC = \frac{\text{cresc. test.} - \text{cresc. trat.}}{\text{cresc. test.}} \times 100$$

cresc. test. = média do diâmetro do crescimento micelial de *Phytophthora* sp nas placas testemunhas.

cresc. trat. = média do diâmetro do crescimento micelial de *Phytophthora* sp nas placas que receberam o tratamento.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, totalizando 22 tratamentos com quatro repetições, sendo a repetição constituída por uma placa de Petri. Os tratamentos constituíram-se da combinação de 07 extratos vegetais/ óleos essenciais/fungicida em três concentrações. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade.

Para verificar o modo de ação dos produtos testados, os discos de inóculo a partir dos quais não houve crescimento micelial, foram transferidos, após cinco dias, para placas de Petri contendo BDA, sem a presença do agente inibidor, incubadas a temperatura ambiente (aproximadamente 28 °C) e sob luz constante. Após 72 horas, foi avaliado quanto à presença ou não de crescimento do microrganismo.

3.3.2 Efeito da ação de rizobactérias

Doze isolados de rizobactérias (RC1 a RC12), obtidos a partir da diluição seriada feita de amostras de solo da rizosfera de plantas de citros que não apresentavam sintomas de doença causada por *Phytophthora* spp, juntamente com os isolados C25, C11, C21, C110 (da rizosfera de couve) e RAB7 (da rizosfera de rabanete), os quais foram cedidos pelo Laboratório de Bacteriologia/UFRPE, foram confrontados com o patógeno em meio de BDA. Foi colocado um disco de BDA com micélio do patógeno em um dos lados da placa de Petri, e do outro lado, distante 6 cm do disco de BDA, foi feita uma estria da bactéria. Os tratamentos foram incubados em escuro contínuo por cinco dias a 25 ºC. A leitura do crescimento radial do micélio do patógeno foi realizada diariamente, mensurando-se o raio das colônias para determinação da porcentagem de inibição do patógeno, conforme a equação adaptada de Edginton, Knew e Barron (1971):

$$IR\ (\%) = RC- RX/RC \times 100$$

IR= Inibição relativa

RC= raio da colônia de *Phytophthora* sp na testemunha

RX= raio da colônia pareada com a rizobactéria

Ao final do período de incubação foi retirada uma amostra do meio onde ocorreu a interação entre o patógeno e o antagonista, que foi colocada sobre uma lâmina e observada em microscópio óptico, para a visualização dos mecanismos de ação das rizobactérias.

O delineamento foi inteiramente casualizado com 18 tratamentos e três repetições, sendo a repetição constituída por uma placa de Petri. Os dados originais do crescimento micelial de *Phytophthora* sp foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas através do teste de Tukey (5%)

3.3.3 Efeito da ação de *Trichoderma* spp

Os isolados de *Trichoderma*, T3 (*T. koningii* Rifai), T13 e T9 (*T. harzianum*), pertencentes à coleção de microrganismos do Laboratório de Fitopatologia (CECA/UFAL), foram confrontados com o patógeno, durante sete dias, em meio de BDA, pelo método de pareamento, onde um disco de BDA contendo estruturas do patógeno foi colocado em um dos lados da placa de Petri e no lado oposto foi colocado um disco de BDA com estruturas do isolado de *Trichoderma*.

Os graus de antagonismo foram avaliados através da escala de notas de Bell, Wells e Markham (1982), que atribuí notas de 1 a 5, a depender do desenvolvimento do crescimento micelial do isolado de *Trichoderma* sobre o crescimento micelial do patógeno. As notas foram dadas observando-se os seguintes critérios:

1 – O crescimento micelial do isolado de *Trichoderma* tomou 100% da placa de Petri;

2 – O crescimento micelial do isolado de *Trichoderma* tomou 2/3 da placa de Petri;

3 – O crescimento micelial do isolado de *Trichoderma* tomou 50% da placa de Petri;

4 – O crescimento micelial do isolado de *Trichoderma* tomou 1/3 da placa de Petri;

5 – O isolado de *Trichodermae* não conseguiu se desenvolver na placa de Petri.

Ao final do período de incubação, a temperatura ambiente (aproximadamente 28 °C) e sob luz contínua, foi retirada uma amostra do meio onde ocorreu a interação entre o patógeno e o antagonista, que foi colocada sobre uma lâmina e observada em microscópio óptico, para a visualização dos mecanismos de ação dos isolados de *Trichoderma*.

O delineamento foi inteiramente casualizado com quatro tratamentos e cinco repetições, sendo a repetição constituída por uma placa de Petri. Os dados originais do crescimento micelial de *Phytophthora* sp foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas através do teste de Tukey (5%)

3.4 Controle da podridão de *Phytophthora* em frutos de laranja pêra

3.4.1 Efeito de produtos naturais e de fungicida

Frutos de laranja "pêra" [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv. Pêra], com até 25% de sua superfície com coloração amarelada, foram pulverizados com os seguintes tratamentos: manipueira, Ecolife®, óleo de citronela, óleo de eucalipto, óleo de pimenta, óleo de nim e fungicida metalaxyl + mancozeb, nas concentrações que apresentaram os melhores resultados no tratamento *in vitro*. Para todas as soluções, ADE foi utilizada como solvente e foi adicionado espalhante adesivo Tween 20 (polioxyethylene sobitan mono-oleate, da marca Vetec), 0,1 ml para cada 100 ml de solução. A testemunha consistiu em frutos pulverizados apenas com ADE.

Dois dias após o tratamento com os produtos, os frutos foram inoculados sem ferimento com uma suspensão do patógeno (5 mL/fruto) na concentração de aproximadamente 20 esporângios/mL, preparada a partir da homogeneização em liquidificador, de uma suspensão contendo crescimento micelial do isolado de *Phytophthora* sp, previamente cultivado em uma placa de Petri em meio de cultura CA, durante sete dias, em câmara de crescimento com temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 horas. Para manter a umidade, os frutos foram colocados em sacos plásticos umedecidos por 48 horas, e incubados em condições ambiente.

O experimento foi avaliado quando 50% das testemunhas apresentaram sintomas da doença, através da determinação da porcentagem das áreas lesionadas, conforme escala diagramática proposta por Azevedo (1997).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com oito tratamentos e sete repetições, sendo uma repetição constituída por um fruto de laranja pêra. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

3.4.2 Efeito do tratamento térmico

Frutos de laranja pêra, com até 25% de sua superfície com coloração amarelada, foram inoculados artificialmente, através de aspersão de 5 mL de suspensão de *Phytophthora* sp na concentração de aproximadamente 20 esporângios/mL (suspensão do patógeno foi preparada conforme o item 3.4.1) e em seguida submetidos aos seguintes tratamentos: 1- Imersão em

água a 50°C por 3 minutos; 2- Imersão em água a 51°C por 3 minutos; 3- Imersão em água a 52°C por 3 minutos; 4- Imersão em água a 53°C por 3 minutos; 5- Imersão em água a 50°C por 5 minutos; 6- Imersão em água a 51°C por 5 minutos; 7- Imersão em água a 52°C por 5 minutos; 8- Imersão em água a 53°C por 5 minutos ; 9- Imersão dos frutos em fungicida (Metalaxil + mancozeb – 3,5 g. L^{-1}); 10- Testemunha.

A testemunha foi constituída pela inoculação dos frutos com a suspensão do patógeno e imersão dos frutos em água sem aquecimento. Após a aplicação dos tratamentos os frutos foram incubados a temperatura ambiente (aproximadamente 28 °C), com fotoperíodo de 12 horas e avaliados diariamente por até sete dias, observando-se o aparecimento de sintomas. A avaliação da severidade da doença foi feita através da porcentagem das áreas lesionadas, conforme escala diagramática proposta por Azevedo (1997).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 10 tratamentos e 5 repetições, sendo uma repetição constituída por um fruto de laranja pêra. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

3.5 Controle biológico de *Phytophthora* sp com rizobactérias e *Trichoderma* spp

Os isolados de rizobactérias selecionados (RC3, RC5, RC10, RC11, RC12, C11, C21, C25, C110 e RAB7) e de *Trichoderma* spp (T3, T9 e T13) foram testados quanto a sua capacidade de colonizar raízes de citros. Sementes de limão cravo (*C. limonia*), desinfestadas superficialmente em álcool 70% (por 2 minutos), hipoclorito de sódio 1% (por 10 minutos) e lavadas sucessivas vezes com ADE, foram imersas na suspensão bacteriana na concentração de 10^8 cél/mL (escala de McFarland) e na suspensão de *Trichoderma* (10^7conídios/mL) por 2 horas e colocadas para secar em papel de filtro esterilizado. Os inóculos bacterianos foram produzidos em meio NA, incubados a 25 °C por 48 horas e os de *Trichoderma* spp em meio BDA, incubados a 28 °C por 96 horas. Foram utilizadas como testemunhas, sementes imersas em solução salina esterilizada e sementes tratadas com fungicida (Metalaxil + mancozeb – 3,5g. L^{-1}). Este procedimento foi utilizado nos dois experimentos descritos a seguir.

Em um dos experimentos, as sementes de limão cravo foram microbiolizadas e semeadas em tubos de ensaio (2 sementes/tubo) contendo meio de cultura ágar-água (AA) na proporção 0,8% p/v, incubados a temperatura ambiente (aproximadamente 28 °C) sob luz constante. Os tubos foram cobertos com papel alumínio para controlar a luminosidade nas

raízes. Aos 30 dias de incubação, as sementes tratadas com as rizobactérias e os isolados de *Trichoderma* spp, foram observadas com relação à capacidade dos microrganismos em colonizar o sistema radicular, conforme Queiroz (2003).

No outro experimento, o substrato (1/3 de solo + 1/3 de torta de filtro de cana + 1/3 de fibra de coco) foi autoclavado, por duas horas a uma temperatura de 121ºC, e infestado com uma suspensão do patógeno na concentração aproximada de 20 esporângios/mL. As sementes microbiolizadas foram semeadas no substrato e incubadas por 40 dias em condições ambientais. Cada parcela foi constituída por um vaso (400 mL), onde foram semeadas quatro sementes de limão cravo.

Os experimentos foram avaliados ao final do período de incubação, determinando-se a podridão radicular e a promoção do crescimento da altura das mudas. A podridão radicular foi classificada pela escala de notas proposta por Queiroz (2003):

0 – ausência de podridão no sistema radicular;

1 – presença de 1-10% de podridão do sistema radicular;

2 – presença de 11-25% de podridão do sistema radicular;

3 – presença de 26-50% de podridão do sistema radicular;

4 – presença superior a 50% de podridão do sistema radicular.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 15 tratamentos e quatro repetições, em ambos os experimentos, sendo cada repetição contituída por um tubode ensaio ou vaso, e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey (5%).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Teste de patogenicidade

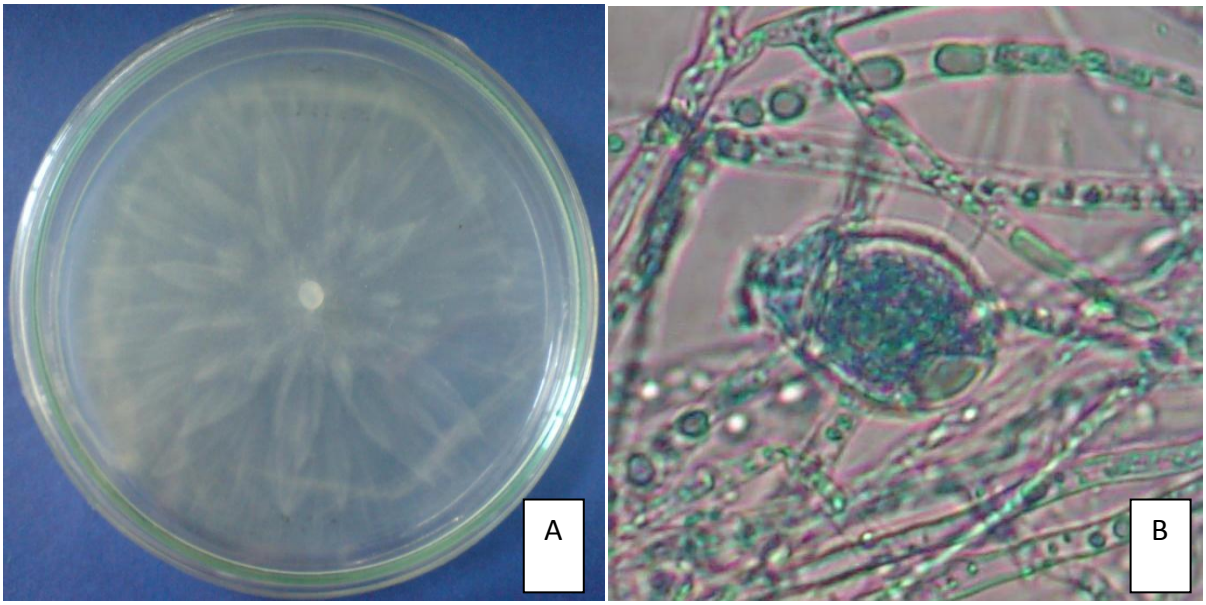
O isolado de *Phytophthora* sp mostrou-se patogênico aos frutos de pêra (Figura 3), previamente inoculados com discos de BDA contendo estruturas do patógeno. Os sintomas iniciais de podridão surgiram no segundo dia após a inoculação com aumento de intensidade aos cinco dias.

Figura 3 – Teste de patogenicidade, fruto de pêra apresentando sintomas característicos de podridão causada por *Phytophthora* sp. Fonte: (SORIANO, 2011).

4.2 Identificação do patógeno

O patógeno foi identificado como sendo uma espécie do gênero *Phytophthora* por apresentar micélio de aspecto cotonoso em meio de cultura BDA, com crescimento petalóide e bordas irregulares. Presença de hifas cenocíticas, e esporângio piriforme e papilado (Figura 4). Tais características são utilizadas em estudos realizados por Abdanur, Santos e Tratch (2003) e por Feichtenberger, Müller e Guirado (2005), para descrever a morfologia de isolados de *Phytophthora*.

Figura 4 – Placa de Petri contendo o crescimento micelial de *Phytophthora* sp (A). Hifas cenocíticas e esporângio de *Phytophthora* sp (B). Fonte: (SORIANO, 2011).



4.3 Efeito de óleos essenciais, extratos vegetais e fungicida sobre o crescimento micelial de *Phytophthora* sp *in virto*

Todos os tratamentos diferiram da testemunha. A manipueira e o fungicida, em todas as concentrações testadas, o óleo de eucalipto, o óleo de pimenta-de-macaco e o Ecolife®, nas concentrações 1,0% e 1,5% foram capazes de inibir em 100% o crescimento micelial de *Phytophthora* sp, não diferindo estatísticamente dos tratamentos com óleo de pimenta-de-macaco, na concentração 0,5% e óleo de citronela, na concentração de 1,5%, que proporcionaram uma inibição de 97,7% e 95,3%, respectivamente. Os óleos de eucalipto e Ecolife a 0,5% não apresentaram diferenças significativas entre si, proporcionando uma

inibição do crescimento micelial do patógeno de 80,0%. Os óleos de citronela, 0,5 e 1,0% e de nim a 1,5% também não apresentaram diferenças significativas, com inibições de 71,0%, 75,0% e 73,8%, respectivamente. O óleo de nim a 0,5% e 1,0% inibiu o crescimento micelial do patógeno em 55,0% e 62,5%, apresentando os menores percentuais de inibição em relação aos demais tratamentos (Tabela 1).

As menores concentrações e que apresentaram os melhores resultados foram selecionadas para o teste *in vivo*, com exceção da concentração do fungicida, onde foi selecionada a concentração 3,5 g. L^{-1}, dose recomendada pelo fabricante.

Tabela 1 – Efeito de óleos essenciais, extratos vegetais e fungicida sobre o crescimento micelial de *Phytophthora* sp

TRATAMENTOS	**INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL (%)**
Manipueira 20%	100
Manipueira 40%	100
Manipueira 60%	100
Óleo de citronela 0,5%	71,0
Óleo de citronela 1,0%	75,0
Óleo de citronela 1,5%	95,3
Óleo de eucalipto 0,5%	80,0
Óleo de eucalipto 1,0%	100
Óleo de eucalipto 1,5%	100
Óleo de pimenta-de-macaco 0,5%	97,7
Óleo de pimenta-de-macaco 1,0%	100
Óleo de pimenta-de-macaco 1,5%	100
Ecolife® 0,5%	80,0
Ecolife® 1,0%	100
Ecolife® 1,5%	100
Óleo de nim 0,5%	55,0
Óleo de nim 1,0%	62,5
Óleo de nim 1,5%	73,8
Fungicida 2,5 g. L^{-1}	100
Fungicida 3,5 g. L^{-1}	100
Fungicida 4,5 g. L^{-1}	100

Trabalhos relatando o efeito de óleos essenciais de plantas sobre a germinação de esporos de espécies do gênero *Phytophthora*, bem como as concentrações mínimas inibitórias ao microrganismo, são escassos na literatura. Algumas pesquisas recentes, sobre o efeito de diferentes concentrações de óleos essenciais em outros patossistemas foram realizadas e concordam ou discordam dos resultados obtidos neste experimento.

Medice et al. (2007) ao utilizaram óleos essenciais *de Corymbia citriodora* (Hook.) Hill e Jonhson (= *Eucalyptus citriodora*, eucalipto citriodora), *Cymbopogon nardus* (citronela) e *Azadirachta indica* (nim) nas concentrações de 1%, 0,5%, 1%, respectivamente para cada óleo, no controle da ferrugem asiática da soja, observaram uma interferência na germinação dos urediniósporos de *Phakopsora pachyrhizi* H. Sydow & P. Sydow e uma inibição de 100% *in vitro*.

Carnelossi et al. (2009), utilizando óleos essenciais no controle de *Colletotrichum gloeosporioides in vitro,* observaram que o óleo essencial de *E. citriodora*, na proporção de 25 µl por placa de Petri, foi capaz de inibir em 100% o crescimento micelial do patógeno. Salgado et al. (2003), testando o potencial fungitóxico de óleos essenciais de diferentes espécies de eucalipto, verificaram que o óleo essencial de *E. citriodora* foi capaz de inibir o crescimento micelial de *Fusarium oxysporum*, *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker e *Botrytis cinerea*, corroborando com os resultados desse experimento.

O óleo de *Piper aduncum* é rico em dilapiol, com comprovada ação inibitória contra um grande número de fitopatógenos, inclusive *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer, *P. palmivora* e *P. capsici* (BASTOS; SILVA, 2002[6] apud SILVA; BASTOS, 2007).

O efeito fungicida foi observado nos tratamentos com manipueira independente das concentrações testadas, e no tratamento com fungicida químico nas concentrações de 3,5 e 4,5 g. L^{-1}. Já os tratamentos com óleo de citronela, óleo de eucalipto, óleo de pimenta, Ecolife® e fungicida químico na concentração de 2,5 g. L^{-1}, apresentaram efeito fungistático sobre o crescimento micelial do isolado de *Phytophthora* sp (Tabela 2). Os princípios ativos presentes nos extratos e óleos testados podem apresentar efeito fungicida, quando ocorre inviabilidade do micélio e estruturas reprodutivas do patógeno, ou efeito fungistático, quando o crescimento micelial é apenas paralisado, podendo o patógeno voltar a se desenvolver caso o tratamento seja eliminado.

[6] BASTOS, C. N.; SILVA D. M. H. Inibição micelial de fungos fitopatógenos através de óleos essenciais de *Piper aduncum* e *P. marginatum*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 82, 2002. Suplemento.

O modo de ação do óleo de *Piper aduncum* sobre o isolado de *Phytophthora* sp diferiu do que foi observado por Bastos (1997), estudando o efeito de óleo de *Piper aduncum* sobre *Crinipellis perniciosa* e outros fungos fitopatogênicos, o qual observou a inviabilidade do micélio do patógeno em todos os discos de BDA contendo estruturas de *C. perniciosa* que não haviam apresentado crescimento nas placas contendo óleo, concluindo que o óleo *Piper aduncum*, em concentração de 5% ou superior, teve efeito fungicida sobre *C. perniciosa*.

Tabela 2 – Modo de ação dos produtos testados sobre o crescimento micelial de *Phytophthora* sp

TRATAMENTOS	**RESULTADOS ***
Manipueira 20%	-
Manipueira 40%	-
Manipueira 60%	-
Óleo de citronela 1,0%	+
Óleo de citronela 1,5%	+
Óleo de eucalipto 0,5%	+
Óleo de eucalipto 1,0%	+
Óleo de eucalipto 1,5%	+
Óleo de pimenta-de-macaco 0,5%	+
Óleo de pimenta-de-macaco 1,0%	+
Óleo de pimenta-de-macaco 1,5%	+
Ecolife® 1,0%	+
Ecolife® 1,5%	+
Fungicida 2,5 g. L^{-1}	+
Fungicida 3,5 g. L^{-1}	-
Fungicida 4,5 g. L^{-1}	-

* (+) = ação fungistática

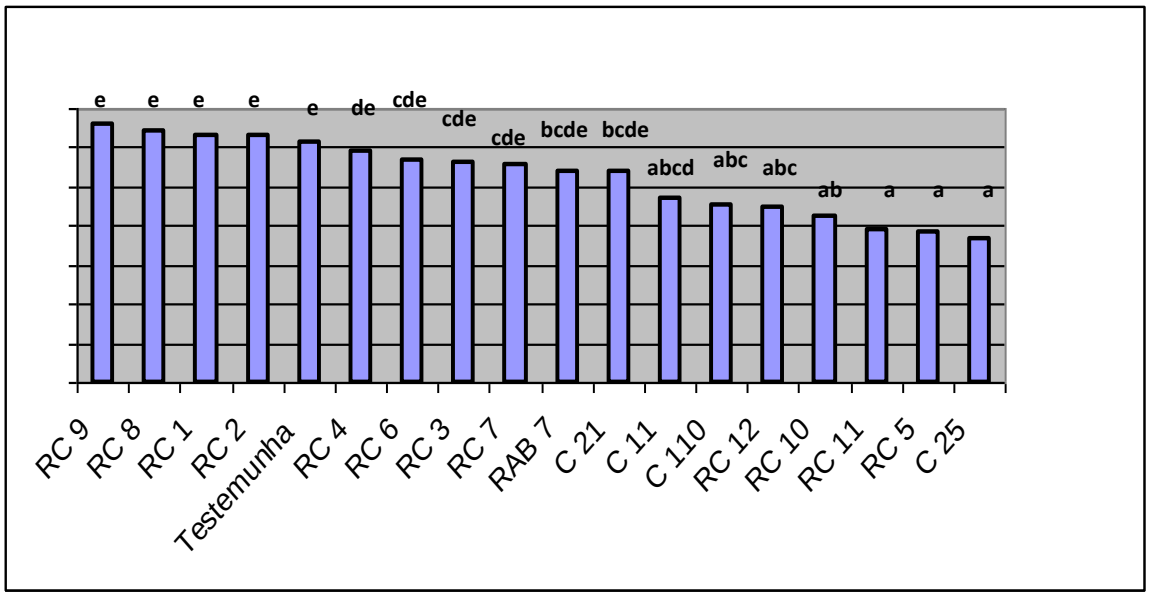
(-) = ação fungicida

4.4 Seleção e antagonismo de rizobactérias para o controle de *Phytophthora* sp

Dos dezessete isolados de rizobactérias confrontados com o isolado de *Phytophthora* sp, dez apresentaram potencial para inibir o desenvolvimento do patógeno *in vitro* (Figura 5). Os isolados C25, RC5 e RC11, apresentaram-se como os mais eficientes no controle do crescimento micelial do patógeno com porcentagem de inibição de 40,4%; 36,7 % e 35,9 %, respectivamente. Os isolados RC10, RC12, C110 e C11 foram, respectivamente, responsáveis por uma inibição do crescimento micelial de 31,0 %; 26,9 %; 26,9 % e 23,3 %. As rizobactérias C25, RC5, RC11, RC10 apresentaram um halo de inibição que pode ser atribuído ao mecanismo de antibiose. Os isolados C25, RC5, RC11, RC10, RC12, C110 e C11 diferiram estatisticamente da testemunha pelo teste de Tukey, sendo estes selecionados para a aplicação no teste de antagonismo *in vivo*.

Além destes, os isolados C21, RAB7 e RC3, cujos percentuais de inibição sobre o crescimento micelial do patógeno foram 12,2 %; 11,4% e 8,6 %, respectivamente, também foram selecionados. Embora estes isolados não tenham diferido estatisticamente da testemunha, apresentaram um crescimento bacteriano sobre as hifas do patógeno, o que também ocorreu com os isolados C11 e RC12, e através de observações microscópicas na região de interação com o patógeno, pode-se verificar o parasitismo, com a ocorrência de deformação das hifas, lise das hifas e dos esporângios, concordando com resultados obtidos por Queiroz (2003).

Figura 5 – Crescimento micelial de *Phytophthora* sp em presença de rizobactérias. Fonte: (SORIANO, 2011).



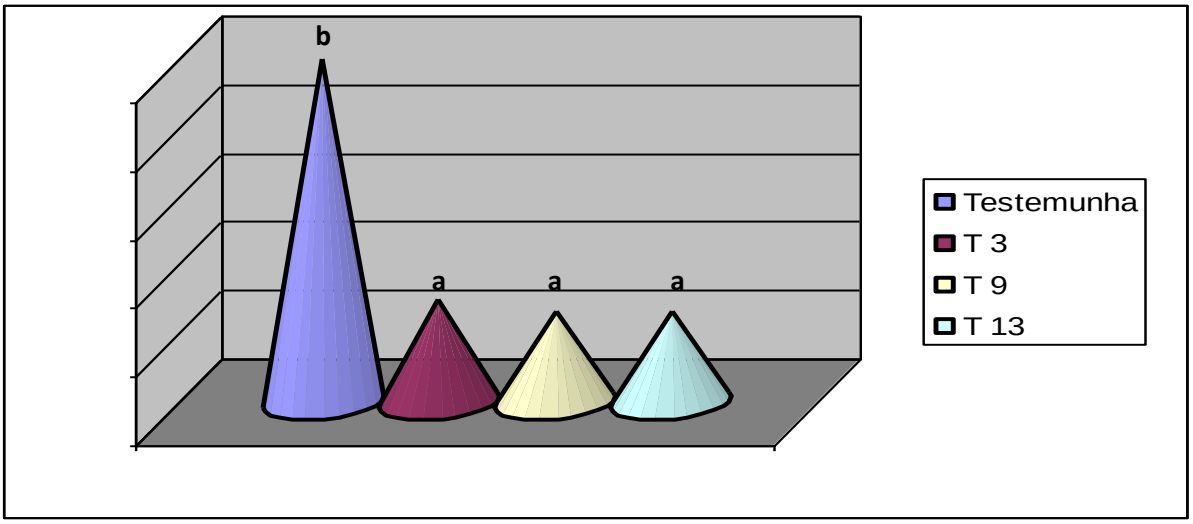
Erwin e Ribeiro (1996) ressalvaram que o parasitismo de estruturas vegetativas e de reprodução do patógeno, é importante quando se almeja eliminar as estruturas de resistência, como clamidósporos e oósporos, com sobrevivência em condições limitantes de 6 a 13 anos, respectivamente.

4.5 Efeito de *Trichoderma* spp sobre o crescimento micelial de *Phytophthora* sp *in vitro*

Os três isolados de *Trichoderma* spp, T3 (*T. koningii*), T9 e T13 (*T. harzianum*), foram eficientes em inibir o desenvolvimento micelial do patógeno *in vitro* (Figura 6), produzindo antibióticos em BDA e hiperparasitando o crescimento micelial de *Phytophthora* sp. Através de microscopia foi possível observar que o isolado T3 foi eficiente no controle do crescimento micelial do *Phytophthora* sp, as hifas do antagonista se apresentaram intumescidas e com maior diâmetro em relação as hifas do patógeno, não havendo produção de esporos do patógeno, sendo produzidos apenas esporos do isolado T3.

Os isolados T9 e T13 foram tão eficientes quanto o isolado T3, não diferindo estatisticamente entre si, quanto ao percentual de inibição do crescimento micelial do isolado de *Phytophthora* sp. Diante da ação antagonista dos isolados T9 e T13, o patógeno apresentou pouca produção de hifas, sendo estas estreitas/finas e sem esporulação, também promoveram o enrolamento e estrangulamento de hifas do patógeno, e um número grande de esporos dos antagonistas mostraram-se agregados as hifas do patógeno.

Figura 6 – Inibição *in vitro* do crescimento micelial de *Phytophthora* sp. Fonte: (SORIANO, 2011).



De acordo com Denis e Webster (1971) *Trichoderma* spp produzem, vários antibióticos, alguns dos quais são capazes de inibir o crescimento micelial de muitos fungos fitopatogênicos. O hiperparasitismo de *Trichoderma* spp foi observado sobre hifas de *R. solani* (CHET; ELAD, 1983), de *P. parasitica* (MAY-DE-MIO, 1994), de *P. citrophthora* (AMORIM, 1997) e de *P. palmivora* (DIANESE, 2006).

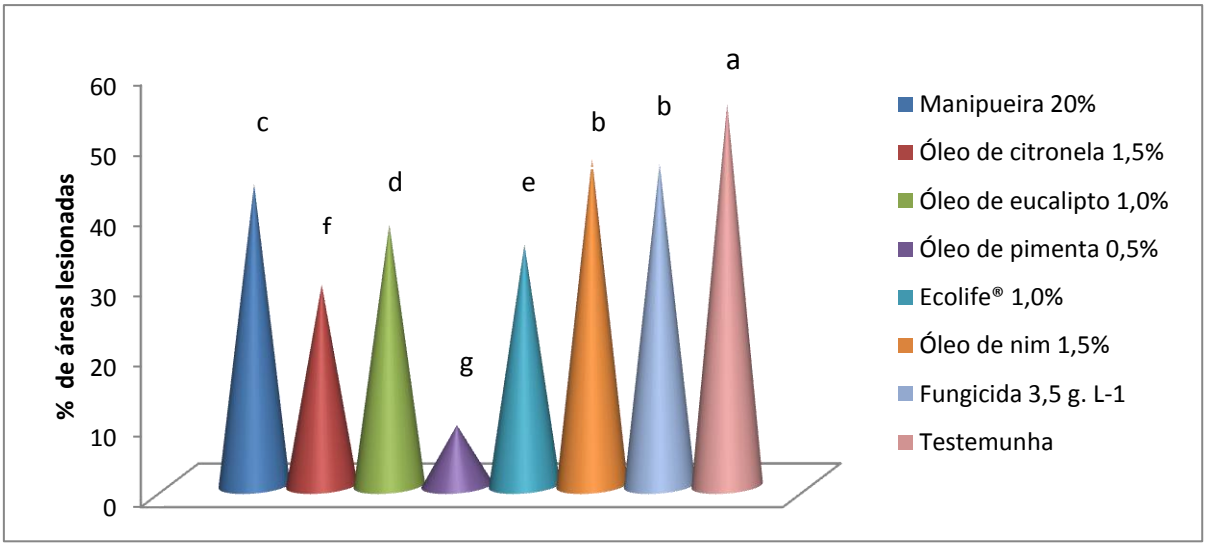
4.6 Efeito dos óleos essenciais, extratos vegetais e fungicida no controle da podridão de *Phytophthora* em frutos de laranja pêra

O tratamento com óleo de pimenta-de-macaco 0,5% foi o que apresentou as menores áreas lesionadas em frutos de laranja pêra, com média de 8,57%. Já os tratamentos com: óleo de citronela 1,5%, Ecolife® 1,0%, óleo de eucalipto 1,0%, manipueira 20%, fungicida 3,5 g. L^{-1} e óleo de nim 1,5% apresentaram 28,57%, 34,28%, 37,14%, 42,86%, 45,71% e 46,43%, respectivamente, de áreas lesionadas. Enquanto que a testemunha apresentou 54,28% de áreas lesionadas nos frutos de laranja pêra (Figura 7).

Nos tratamentos com óleo de citronela 1,5%, óleo de eucalipto 1,0%, óleo de pimenta 0,5% foi observado fitotoxidez em alguns dos frutos das parcelas de tratamento.

Barguil et al. (2005) estudando o efeito do Ecolife®, nas concentrações 0,5% e 1%, no controle de *Phoma costarricencis* em plantas de café, observaram que esse produto na menor concentração proporcionou a diminuição da área lesionada na folha. Esse resultado se mostrou contrario ao esperado, mas apontou para uma provável indução de resistência.

Figura 7 – Efeito de produtos naturais e de fungicida no controle da podridão de *Phytophthora* em frutos de laranja pêra. Fonte: (SORIANO, 2011).



Furtado (2010) utilizou o Ecolife® para controlar a antracnose em diferentes variedades de banana (maçã, prata, pacovan e cacau), em todas as variedades o produto se mostrou eficiente no controle das lesões e apresentou resultados semelhantes ao controle obtido pelo uso do fungicida químico. Em média, a redução na área das lesões foi de 73%.

Diversas substâncias com efeito antifúngico têm sido isoladas de *E. citriodora*, destacando-se principalmente o citronelol (aproximadamente 85%), além de geraniol, isopulegol, cineol, estragol, α e β pineno, β cimeno, entre outras (COSTA, 1986[7] apud DIAS-ARIEIRA et al., 2010). Apesar de o citronelol ter sido citado como o principal responsável pelo controle da podridão provocada por *Botrytis cinerea* Pers. em maçãs, não foi eficiente em controlar *C. gloeosporioides* nestes frutos (LEE et al., 2007). Cruz et al. (2010) testaram o uso de óleo essencial de *E. citriodora* no controle da antracnose em frutos de manga "Tommy Atkins", os resultados obtidos demonstraram que esse tratamento não foi efetivo no controle da doença.

No entanto, Carnelossi et al. (2009) trataram frutos de mamão com óleo essencial de *E. citriodora* e Ecolife®, para o controle de *C. gloeosporioides* e observaram que os tratamentos foram capazes de controlar os sintomas da doença, apresentando resultados que diferiram estatisticamente dos resultados apresentados pela testemunha, quando a inoculação do patógeno foi efetuada logo após a aplicação dos tratamentos. Resultados semelhantes foram encontrados neste trabalho.

Medice et al. (2007) verificaram que os óleos essenciais *de E. citriodora*, *C. nardus* e *A. indica* foram capazes de reduzir o percentual da doença causada pela ferrugem, em plantas de soja, variando em média de 34,59 a 62,29%, a depender do óleo essencial empregado e da cultivar estudada.

O potencial do óleo de nim em controlar doenças, mesmo quando aplicado em baixas concentrações foi evidenciada em diversos trabalhos e seu modo de ação vem sendo investigado por inúmeros pesquisadores. Alguns creditam o seu efeito devido a presença de azadiractina, limonóides e terpenóides (CONVENTRY; ALLAN, 2001), outros por este produto conter vários compostos naturais eficientes em inibir microrganismos. Apesar de já terem sido caracterizados cerca de 300 compostos limonóides (KUMAR; KUMAR, 1980), há poucas informações sobre sua atividade sobre oomicetos.

[7] COSTA, A. F. **Farmacognosia**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1986. 1032 p.

Govindachari et al. (1998)[8] citado por Dias-Arieira et al. (2010) observaram que a azadiractina, quando usada pura, não apresentou atividade antifúngica expressiva, porém, seu efeito foi acentuado quando se adicionou terpenóides, indicando o efeito sinergístico destas substâncias. Desse modo, é bastante provável que efeitos inibitórios comprovados neste trabalho devam-se à ação semelhante de compostos orgânicos distintos.

No controle de *Pyricularia oryzae* Cav. em arroz, o óleo e extratos de nim também promoveram reduções semelhantes ao fungicida carbendazin 0,1%, comprovando o potencial para o controle da doença no campo (AMADIOHA, 2000). Resultados semelhantes foram obtidos por Paul e Sharma (2002)[9] citado por Dias-Arieira et al. (2010), no controle de *Dreschlera graminea* (Rabenh. ex. Schlech.) Shoemaker em cevada e de *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary em tomateiro (DINIZ et al., 2006).

Carneiro et al. (2007) observaram que o óleo de nim foi eficiente no controle do oídio em feijoeiro, principalmente quando aplicado seis horas antes da inoculação, reduzindo em até 65% o número de lesões nas folhas. Também relataram que o óleo de nim foi eficiente em controlar oídio do tomateiro, quando aplicado nas concentrações de 0,25 ou 0,5%. O controle da cercosporiose em amendoim foi obtido com o uso do óleo nas concentrações de 0,5 e 1,0% (SRINIVAS et al., 2000). Redução significativa do progresso da requeima da batata (*P. infestans*) ocorreu quando se utilizou 0,5% do óleo de nim (CONVENTRY; ALLAN, 2001).

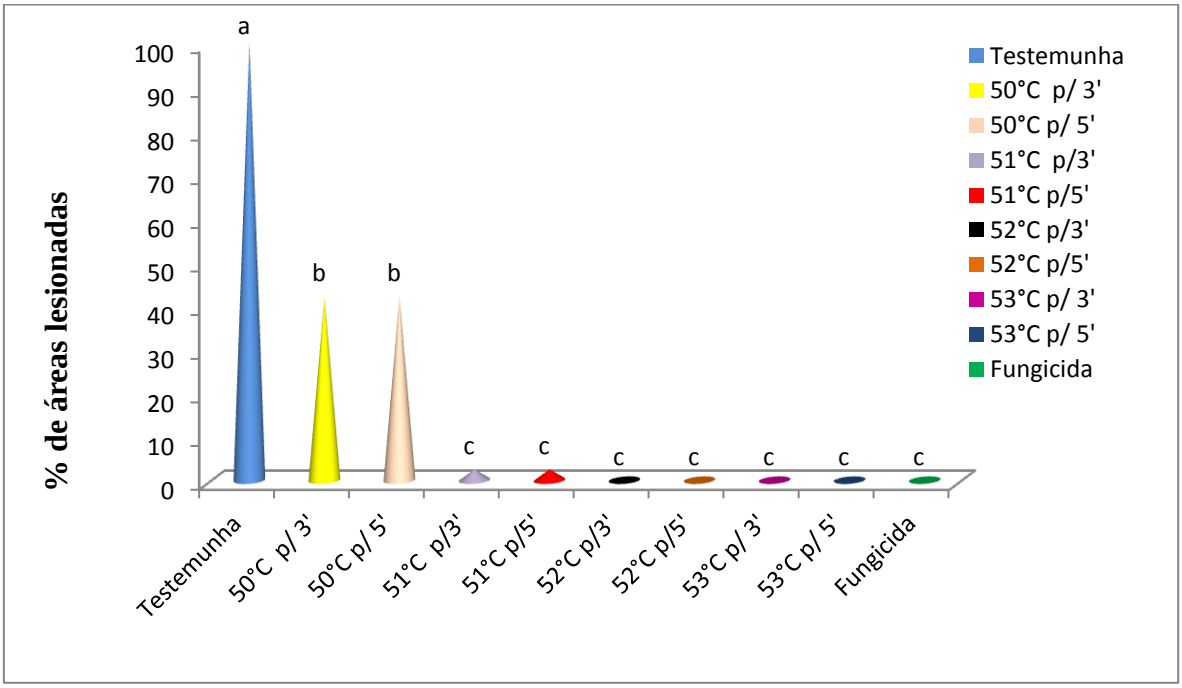
4.7 Efeito do tratamento térmico no controle da podridão de *Phytophthora* em frutos de laranja pêra

Neste experimento todos os tratamentos obtiveram redução da porcentagem de áreas lesionadas dos frutos de laranja pêra, destacando-se os tratamentos a 51 ºC, 52 ºC e 53 ºC por três e cinco minutos, por não diferiram estatisticamente do tratamento com o fungicida (Figura 8). Os sintomas só foram observados no quarto dia após a inoculação, na testemunha e nos tratamentos com 50 °C por três e cinco minutos, que apresentaram cerca de 42% de infecção.

[8] GOVINDACHARI, T. R. et al. Identification of antifungical compounds from de seed oil of *Azadirachta indica*. **Phytoparasitica**, Bet Dagan, v. 26, n. 2, p. 1-8, 1998.

[9] PAUL, P. K.; SHARMA, P. D. *Azadirachta indica* leaf extract induces resistance in barley against leaf stripe disease. **Physiological and Molecular Plant Patholology**, London, v. 61, n. 1, p. 3-13, 2002.

Figura 8 – Efeito do tratamento térmico no controle da podridão de *Phytophthora* sp em frutos de laranja pêra. Fonte: (SORIANO, 2011).

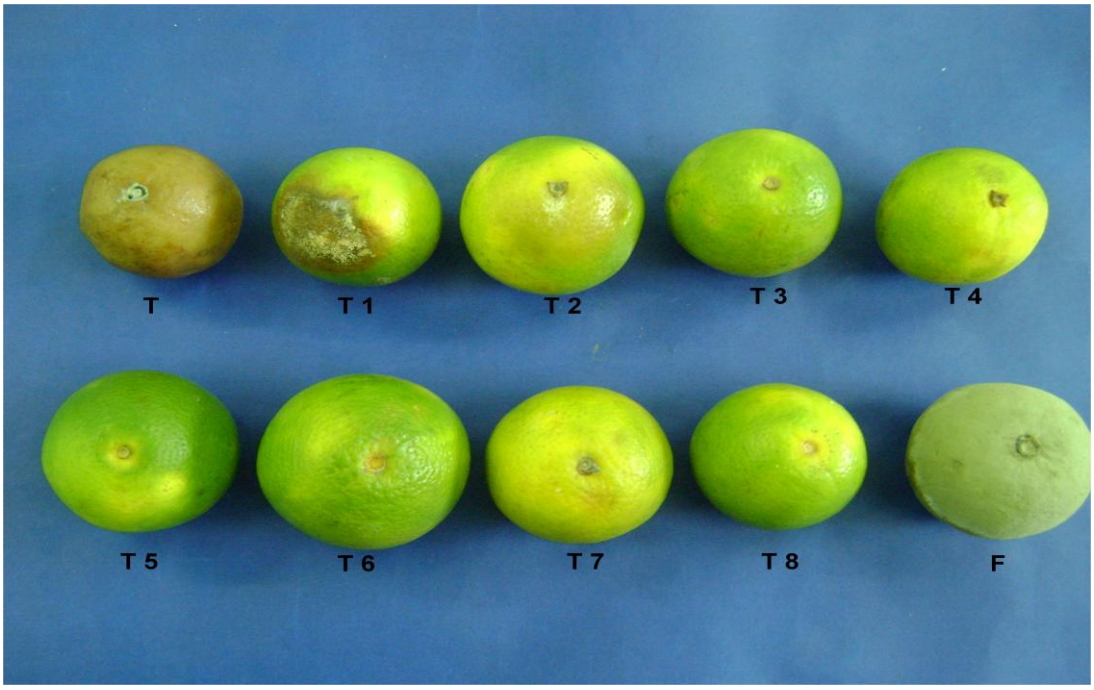


Os tratamentos testados independentes da temperatura e do tempo não apresentaram mudança na consistência de seus frutos nem danos aparentes na qualidade dos mesmos (Figura 9). Apenas o tratamento com fungicida apresentou contaminação com fungos do gênero *Penicilium* em alguns dos seus frutos. Fato este perfeitamente justificável, tendo em vista trata-se de um fungicida especifico para oomicetos.

Existem vários relatos na literatura que evidenciam a eficiência do tratamento térmico em frutas, pós-colheita. Cabrera e Domínguez (1998) relataram que o efeito do tratamento térmico é principalmente devido à diminuição da viabilidade dos esporos fúngicos.

Bartnicki et al. (2010) testaram o uso da termoterapia no controle de C*ryptosporiopsis perennans* (Zeller & Childs) Wollenweber em frutos de maçã, e nos frutos tratados com água aquecida a uma temperatura de 45ºC por 15 segundos o controle foi de 57,8%, a elevação no tempo de exposição para 30 segundos reduziu a sobrevivência dos conídios, gerando um controle de 81,8%. Para as temperaturas de 50 ºC e 55 ºC, independentemente do tempo de exposição, a sobrevivência foi ainda mais reduzida, com o controle de 100%, sendo que nestas temperaturas e em uma exposição por 30 segundos, não foram encontradas nos frutos unidades formadoras de colônias.

Figura 9 – Frutos de laranja pêra tratadas com hidrotermoterapia: T = testemunha, T 1 = 50 ºC/3'; T 2 = 51 ºC/3'; T 3 = 52 ºC/3'; T 4 = 53 ºC/3'; T 5 = 50 ºC/5'; T 6 = 51 ºC/ 5'; T 7 = 52 ºC/5'; T 8 = 53ºC/5'; F = fungicida. Fonte: (SORIANO, 2011).



Lima et al. (2007) testaram o uso da termoterapia associada ou não ao uso de embalagem de filme de PVC e a armazenagem refrigerada, no controle da antracnose em mangas, *Mangifera indica* Linnaeus cv. Haden. Os frutos tratados com água aquecida a 55 ºC, por um período de 5 minutos, apresentaram um controle de 60% das áreas lesionadas, quando a termoterapia foi associada ao uso de embalagem e refrigeração, o controle das áreas lesionadas nos frutos foi superior a 91%.

Montero et al. (2010) observaram que o calor aplicado na termoterapia atua derretendo parcial ou totalmente cristalóides da camada cerosa da cutícula de alguns frutos, alterando seu formato e causando aglomeramento dos mesmos. O derretimento forma um padrão de recobrimento mais homogêneo na superfície dos frutos, gerando a oclusão de rachaduras da cutícula. Desta forma, este recobrimento pode estar atuando como uma barreira física para evitar a entrada de patógenos nos frutos.

Sponholz et al. (2004) obtiveram a redução da antracnose em frutos de banana prata de 63% para menos de 3% de áreas lesionadas nos frutos, o que evidência a eficiência do tratamento hidrotérmico em frutos de banana prata.

4.8 Colonização de raízes de citros por rizobactérias e *Trichoderma in vitro*

Entre as rizobactérias avaliadas todas colonizaram o sistema radicular. Na microbiolização das sementes, os isolados RC3, RC10, RC12, C110 e RAB7 colonizaram de forma abundante, enquanto que RC5, RC11, C21 e C25 apresentaram colonização intermediária em partes da raiz. A bactéria C11 apresentou pouca colonização nas raízes. Os isolados de *Trichoderma* não foram capazes de colonizar as raízes de citros (Tabela 3).

Isolados que apresentam uma boa capacidade de colonização *in vitro* podem atuar como barreira mecânica, impedindo a ação de fitopatógenos residentes no solo (DAZZO et al., 1984). De acordo com Romeiro et al. (1999), o meio AA usualmente não suporta crescimento bacteriano a não ser se exsudarem substâncias das raízes que exerçam tactismo e/ou forneçam os nutrientes necessários aquela rizobactéria específica. A colonização da rizosfera ocorre em várias fases, sendo a manutenção e persistência da bactéria, a fase crucial, pois os exsudatos das raízes são utilizados para a multiplicação e sobrevivência dos isolados nesse ambiente.

Tabela 3 – Avaliação da colonização do sistema radicular nos tratamentos com *Trichoderma* spp, rizobactérias e fungicida, após 30 dias de incubação (*in vitro*)

ISOLADOS	ÁGAR-ÁGUA
TESTEMUNHA	-
FUNGICIDA	-
T13	-
T9	-
T3	-
RC3	+++
RC5	++
RC10	+++
RC11	++
RC12	+++
C11	+
C21	++
C25	++
C110	+++
RAB7	+++

(-) sem colonização; (+) pouca colonização; (++) colonização intermediária em partes da raiz; (+++) colonização abundante ao longo da raiz. (conforme QUEIROZ, 2003).

Lucon, Akamatsu e Harakava (2008) observarm que 21 isolados de rizobactérias colonizaram vigorosamente o sistema radicular de plântulas de pepino, o que foi evidenciado pela presença de uma área túrbida e leitosa próxima à raiz, o que indica a capacidade desses isolados em utilizar apenas os exsudados liberados pelas raízes, como fonte de nutrientes, uma vez que o substrato de crescimento foi o meio AA.

Amorim e Melo (2002) selecionaram sete isolados de rizobactérias [*Pseudomonas* spp, *Flavobacterium* sp e *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn] de ação antagônica a *P. nicotianae* e *P. citrophthora*. Verificou-se que as bactérias isoladas da rizosfera de outras culturas mostraram atividade antagônica igual ou superior a bactérias isoladas da rizosfera de citros. Estes resultados indicam que as rizobactérias não apresentam especificidade de ação, o que permite a sua utilização para diferentes sistemas planta-hospedeiro (MELO; VALARINI, 1995)

Na microbiolização, o número de UFC presentes na suspensão, onde as sementes foram imersas foi de 10^8/ml. Nessa concentração as células bacterianas reduzem o seu crescimento, dando início à fase estacionária. A produção de alguns metabólitos secundários com caráter antimicrobiano, sob condições *in vitro*, inicia-se no final da fase logarítmica e princípio da fase estacionária. Acredita-se que a síntese de metabólitos com atividade antagônica comece tão logo o processo de colonização do tecido vegetal se inicia, facilitando o estabelecimento das rizobactérias no ambiente (BERNARDES et al., 2010).

Sottero et al. (2006) observaram que as bactérias testadas apresentaram capacidades de colonização diferentes, onde algumas colonizaram o sistema radicular, outras o colo ou, ainda, os dois. É possível que essa característica, a colonização de uma ou outra região, varie entre os isolados.

Foi observado que os isolados RC10, RC12, C21 E C110 promoveram um aumento no crescimento das plântulas, além disso, os isolados RC3 e RC11 somados aos citados acima estimularam a germinação das sementes de limão cravo. Nenhum dos isolados promoveu efeitos deletérios sobre as plântulas. Os efeitos no tamanho das plântulas e na germinação vêm sendo relatados para bactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCP) e de emergência de plântulas (RPE) (BULL; WELLER; THOMASHO, 1991; DELANY et al., 2001).

Mafia et al. (2009) ao testarem *in vitro* a capacidade de 50 isolados de rizobactérias em colonizar as raízes de diferentes espécies de eucalipto, observaram que 30 destes isolados apresentaram a capacidade de colonizar as raízes, sendo que a colonização foi confirmada visualmente em 16 isolados. Porém, alguns destes isolados produziram efeitos deletérios

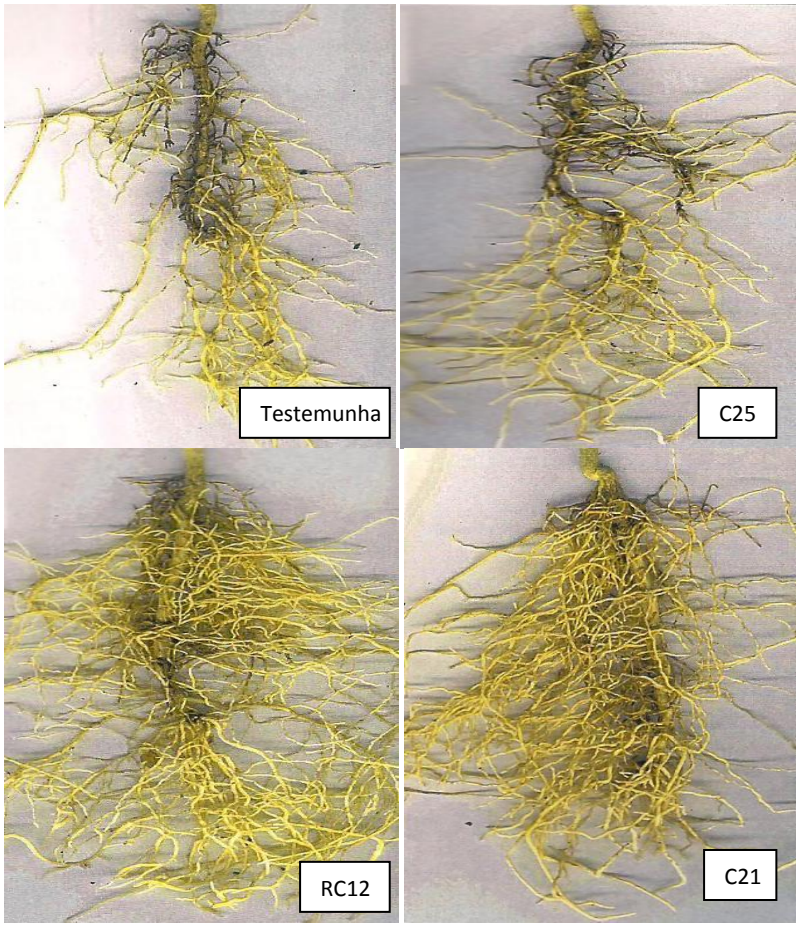
sobre as plântulas de eucalipto, enquanto outros influenciaram no incremento do sistema radicular e no incremento da parte aérea.

Neste ensaio pode-se verificar que isolados de rizobactérias de outros hospedeiros podem colonizar espécies de hospedeiros diferentes, como observado também por Silveira et al. (2004) trabalhando com pepino e obtendo resultados positivos utilizando bactérias isoladas da couve.

4.9 Controle biológico de *Phytophthora* sp com rizobactérias e *Trichoderma* spp em condições controladas

As diferenças na intensidade da doença variaram entre alguns dos isolados testados. Observou-se que algumas plântulas tiveram a parte mediana praticamente sem radicelas e com coloração típica do apodrecimento da raiz principal, em outros casos, os sintomas ainda permaneciam nas extemidades das radicelas (Figura 10).

Figura 10 – Raízes de limoeiro cravo tratadas com os isolados bacterianos em substrato infestado com *Phytophthora* sp. Fonte: (SORIANO, 2011).



As aplicações de rizobactérias e de *Trichoderma* nas sementes de limão cravo demonstraram um efeito positivo sobre o controle da podridão radicular causada por *Phytophthora* sp, diminuindo significativamente a severidade da doença (Figura 11).

Os isolados C110, RC3, RAB7, RC10, RC5 e T13 não diferiram do tratamento químico e obtiveram os menores níveis de severidade da doença, confirmando a inibição do crescimento micelial observada no confrontamento *in vitro*. No entanto, não foram detectadas diferenças estatísticas quanto à altura da parte aérea (Figura 12). As sementes tratadas com os isolados C11, C25 e RC12 foram os menos eficientes em promover a diminuição da severidade da doença.

Figura 11 – Controle de *Phytophthora* sp através da microbiolização de sementes de limão cravo com rizobactérias e *Trichoderma*, após 40 dias de inoculação. Fonte: (SORIANO, 2011).

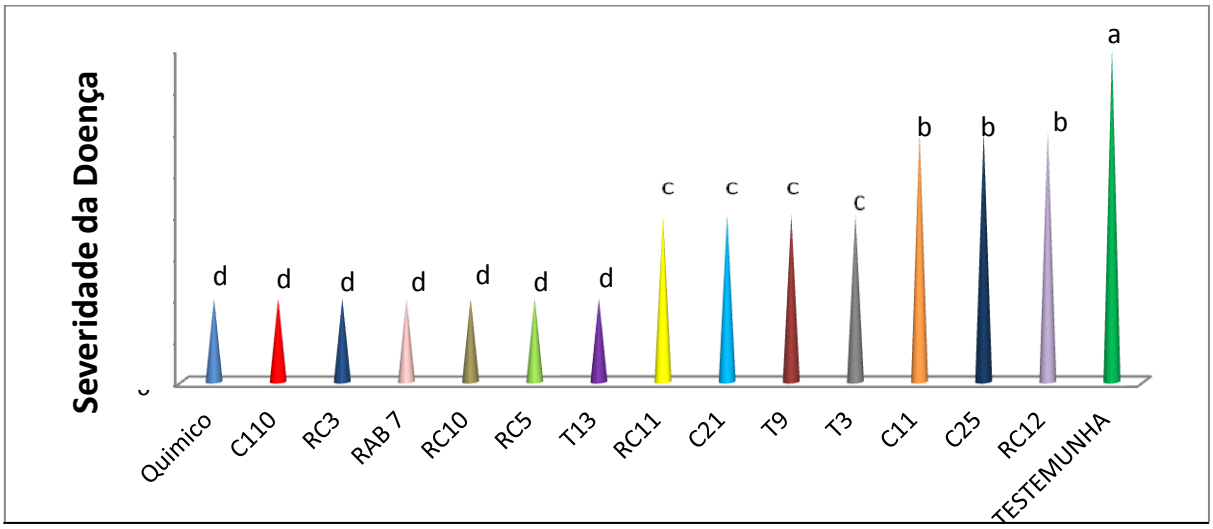
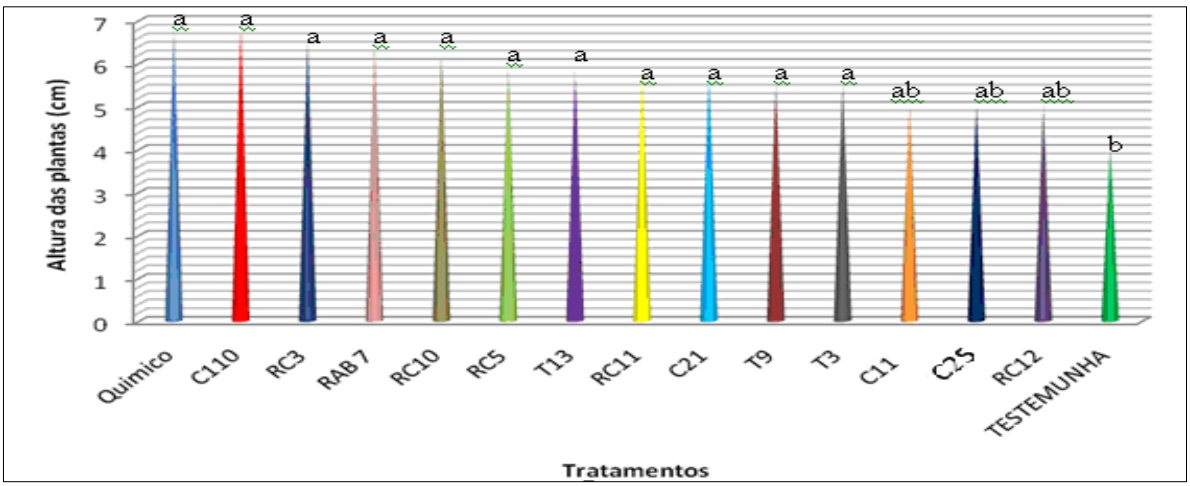


Figura 12 – Altura da parte aérea de mudas de citros, obtidas de sementes microbiolizadas com rizobactérias e *Trichoderma* spp, em substrato infestado com *Phytophthora* sp. Fonte: (SORIANO, 2011).



A ineficiência de muitos isolados no controle biológico de patógenos residentes no solo pode ter como causa diferentes fatores, tais como: falha do agente de biocontrole em se estabelecer na semente ou rizosfera, competição por espaço e nutriente, ineficiência na colonização, instabilidade na manutenção da densidade inicial, inabilidade de competir com os microrganismos nativos ou até perda da eficiência, devido a sucessivas repicagens ou durante armazenamento, e o estágio de desenvolvimento da planta (LUZ, 1993). Provavelmente, alguns desses fatores podem ser a causa da incapacidade de alguns dos isolados em suprimir o patógeno neste experimento.

Bernardes et al. (2010) observaram que rizobactérias isoladas da rizosfera de várias espécies vegetais (alface, algodão, café, tomate, soja) foram capazes de controlar os sintomas da doença causada por *Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitzp. em alface e promoveram o desenvolvimento do sistema radicular.

Várias hipóteses têm sido levantadas no sentido de explicar a capacidade que as rizobactérias possuem de promover o crescimento das plantas. A maioria dos trabalhos relaciona essa capacidade à inibição e alteração da microbiota normal da rizosfera, fazendo com que a planta cresça com um sistema radicular sadio, seja por antibiose (BRISBANE; ROVIRA, 1988), seja ou pela competição por nutrientes, destacando-se entre esses o ferro (GEELS; SCHIPPERS, 1983) e o carbono (ELAD; CHET, 1987).

Melo e Valarini (1995) testaram *in vivo* o potencial de controle de isolados bacterianos sobre *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., todos os isolados testados diminuíram a incidência de plantas mortas, mas apenas os isolados de *Pseudomonas putida* (Trevisan) Migula e *B. subtilis* conseguiram um controle mais efetivo da doença, este último com 100% de controle.

Bernardo e Bettiol (2010) utilizaram *T. harzianum* e *B. subtilis* no controle da pinta preta causada por *Guignardia citricarpa* Kiely em frutos cítricos. Como testemunha foi utilizado biofertilizante, que apresentou a carga microbiana composta principalmente por bactérias (3×10^6 ufc/ml), sendo na sua maioria *Bacillus* spp ($3{,}2 \times 10^5$ ufc/ml), *Pseudomonas* spp ($1{,}5 \times 10^4$ ufc/ml) e, em menor escala, actinobactérias ($1{,}1 \times 10^2$ ufc/ml). O tratamento com o *Trichoderma* apresentou maior índice de doença, quando comparado com a testemunha, mas o tratamento com *Bacillus* (na concentração 10^8) apresentou uma diminuição no índice da doença.

5 CONCLUSÃO

Os produtos naturais óleo de pimenta-de-macaco 0,5%, óleo de citronela 1,5%, Ecolife® 1,0% e eucalipto 1% reduziram a porcentagem de áreas lesionadas em frutos de laranja pêra. Apresentando resultados promissores, quanto à utilização na redução da incidência da podridão-parda, na pós-colheita.

O tratamento hidrotérmico foi eficiente no controle de *Phytophthora* sp em frutos de laranja pêra a 51 ºC, 52 ºC e 53ºC por três e cinco minutos.

Os isolados de rizobactérias (RC3, RC5, RC10, RC11, RC12, C11, C21, C25, C110 e RAB7), obtidos de citros (RC), couve (C), rabanete (RAB) possuem a capacidade de inibir o crescimento micelial de *Phythophthra* sp, colonizar as raízes de limão cravo e controlar a podridão radicular de limão cravo.

Os isolados de *Trichoderma* (T3 - *T. koningii*, T9 e T13 - *T. harzianum*) são capazes de inibir o desenvolvimento micelial do patógeno e controlar a podridão radicular em plântulas de limão cravo.

REFERÊNCIAS

ABDANUR, A.; SANTOS, A. F.; TRATCH, R. Crescimento micelial e esporulação de isolados de Phytophthora sp. patogênicos à Acácia-negra. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, v. 47, n. 2, p. 33-42, 2003.

ALVES, R. C; DEL PONTE, E. M. Requeima da batata. Fitopatologia.net: herbário virtual. Departamento de Fitossanidade. Agronomia, UFRGS. 2007. Disponível em: **<http://www.ufrgs.br/agronomia/fitossan/herbariovirtual/ficha.php?id=101>**. Acesso em: 02 de set. 2010.

AMADIOHA, A. C. Controlling rice blast in vitro and in vivo with extracts of *Azadirachta indica*. **Crop Protection**, Leiden, v. 19, n. 5, p. 287-290, 2000.

AMARO, A. A.; BAPTISTELLA, C. S. L. Viveiros de citros: uma visão econômica. 2009. Disponível em: <**http://www.fundecitrus.com.br**>. Acesso em: 26 de abril de 2011.

AMORIM, E. P. R. **Controle biológico de *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* Dastur e *Phytophthora citrophthora* (Smith & Smith) Leonian em plântulas de citros**. 111 p. 1997. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

AMORIM, E. P. R.; MELO, I. S. Ação antagônica de rizobactérias contra *Phytophthora parasitica* e *Phytophthora citrophthora* e seu efeito no desenvolvimento de plântulas de citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 2, p. 565-568, 2002.

AZEVEDO, L. A. S. **Manual de Quantificação de Doenças de Plantas**. Luiz Antônio Siqueira de Azevedo: São Paulo, 1997. 114 p.

AZEVEDO, C. L. L. Sistema de produção de citros para o Nordeste: Doenças. Embrapa Mandioca e Fruticultura. 2003. Disponível em: <**http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Citros/CitrosNordeste/doencas.htm**>. Acesso em: 12 set. 2010.

BARGUIL, B. M. et al. Effect of extracts from citric biomass, rusted coffee leaves and coffee berry husks on *Phoma costarricencis* of coffee plants. **Fitopatologia Brasileira,** Brasília, v. 30, n. 5, p. 535-537, 2005.

BARTNICKI, V. A. et al. Água aquecida e radiação UV-C no controle pós-colheita de *Cryptosporiopsis perennans* em maçãs. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 45, n. 2, p. 124-131, 2010.

BASSAN, M. M. et al. Reação de híbridos somáticos de citros à infecção por *Phytophthora nicotianae*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 32, n. 2, p. 429-435, 2010.

BASTOS, C. N. Efeito do óleo de *Piper aduncum* sobre *Crinipellis perniciosa* e outros fungos fitopatogênicos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 3, p. 441-443, 1997.

BATISTA, D. C. P.; AZEVEDO, E. C. G.; BERNHARD, T. Viabilidade da produção ecológica de citrus**. Caderno de Pesquisa Série Biologia**, Santa Cruz do Sul, v. 14, n. 2, p. 07-15, 2002.

BELL, O. K.; WELLS, H. D.; MARKHAM, C. R. *In vitro* antagonistic *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. **Phytophatology**, St. Paul, v. 72, n. 4, p. 379-382, 1982.

BERNARDES, F. S. et al. Indução de resistência sistêmica por rizobactérias em cultivos hidropônicos. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 36, n. 2, p. 115-121, 2010.

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**, Lavras, v. 35, n. 1, p. 37-42, 2010.

BNEJDI, F. et al. Relationship between epistasis and aggressiveness in resistance of pepper (*Capsicum annuum* L.) to *Phytophthora nicotianae*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 33, n. 2, p. 279-284, 2010.

BORGES, A. C. G.; COSTA, V. M. H. M. Evolução do agronegócio citrícola paulista e o perfil da intervenção do Estado. **Revista Uniara**, Araraquara, v. 17/18, p. 101-124, 2006.

BOTEON, M. Cadeia agroindustrial de citros. Disponível em: <**http://cepea.esalq.usp.br**>. Acesso em: 21 de abril de 2011.

BRISBANE, P. G.; ROVIRA, A. D. Mechanism of inhibition of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* by fluorescent pseudomonads. **Plant Pathology**, Palo Alto, v. 37, p. 104 -111, 1988.

BRITO, F. S. **Detecção e avaliação in vitro do crescimento de *Trichoderma* spp. isolados de composto frente à fitopatógenos**. 2009. 80 p. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

BULL, C. T.; WELLER, D. M.; THOMASHOW, L. S. Relationship between root colonization and suppression of *Gaumannomyces graminis* var. *tritici* by *Pseudomonas fluorescens* stain 2-79. **Phytopathology**, St. Paul, v. 81, p. 954-959, 1991.

CABRERA, J. J. L.; DOMÍNGUEZ, A. M. Use of hot water dips to control the incidence of banana crown rot. **Acta Horticulturae**, v. 490, p. 563-569, 1998.

CALIXTO M. C. et al. Somatic hybridization between *Citrus sinensis* (L.) Osbeck and *C. grandis* (L.) Osbeck. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 7, p. 721-724, 2004.

CAMPOS, J. S. **Cultura dos citros: diagnóstico da situação e medidas de controle**. Boletim técnico. Campinas: CATI. 1976. 100p.

CARNEIRO, S. M. T. P. G. et al. Eficácia de extratos de nim para o controle do oídio do feijoeiro. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, n. 1, p. 34-39, 2007.

CARNELOSSI, P. R. et al. Óleos essenciais no controle pós-colheita de *Colletotrichum gloeosporioides* em mamão. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 11, n. 4, p. 399-406, 2009.

CASTRO, L. M. **Isolamento, cultura de protoplastos e regeneração de plantas de laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck)**. 2009. 87 p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ), Piracicaba.

CHET, I.; ELAD, Y. Mechanism of mycoparasitism. In: Les antagonismes microbiens. Mode d'action et application à la lutte biologique controle les maladies des plantes. **Colloques de L'I.N.R.A.**, v. 18, p. 35-40, 1983.

COELHO, Y. S. Citricultura em Alagoas**:** Referência Nacional na Produção de Laranja 'Lima'**.** Citros em Foco. **Embrapa**, Cruz das Almas,v. 25, p. 2, 2004.

CONVENTRY, E.; ALLAN, E. J. Microbiological and chemical analysis of neem (*Azadirachta indica*) extracts: new data on antimicrobial activity. **Phytoparasitica**, v. 29, p. 01-10, 2001.

CORAZZA-NUNES M. J. et al. Aurantioideae: uma revisão da taxonomia e filogenia, com as contribuições da sistemática molecular. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 26, n. 2, p. 359-374, 2005.

CRISTOFANI-YALY, M. et al. Differential expression of genes identified from Poncirus trifoliata tissue inoculated with CTV through EST analysis and *in silico* hybridization. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, n. 3, p. 972-979, 2007. Suplemento.

CRUZ, M. J. S. et al. Efeito dos compostos naturais bioativos na conservação pós-colheita de frutos de mangueira cv. Tommy Atkins. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 34, n. 2, p. 428-433, 2010.

DAVIS, R. M. Control of *Phytophthora* root and foot rot of *Citrus* with systemic fungicides Metalaxyl and Phosethyl Aluminum. **Plant Disease**, v. 86, n. 3, p. 218-220, 1982.

DAZZO, F. B. et al. Specific phases of root hair attchment in the *Rhizobium trifolli* cloves symbiosis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 48, n. 6, p. 1140-1150, 1984.

DELANY, I. R. et al. Enchancing biocontrol efficacy of Pseudomonas fluorescens F113 by altering the regulation and production of 2,4-diacetylphloroglucinol. **Plant and Soil**, v. 232, p. 195-205, 2001.

DENIS, C. R.; WEBSTER, J. Antagonistc properties of species-group os *Trichoderma*. I. Production of non-volatile antibiotics. **Transactions of the *British* Mycological *Society***, v. 57, p. 25-39, 1971.

DIANESE, A. C. **Variabilidade e controle de *Phytophthora palmivora* (podridão-do-pé) e controle da varíola (*Asperisporium caricae*) do mamoeiro (*Carica papaya*).** 2006. 123 p. Tese (Doutorado) – UNEB, Brasília.

DIAS-ARIEIRA, C. R. et al. Atividade do óleo de *Eucalyptus citriodora* e *Azadirachta indica* no controle de *Colletotrichum acutatum* em morangueiro. ***Summa Phytopathologica,*** v.36, n.3, p. 228-232, 2010.

DINIZ, K. A. et al. Sweet pepper seed responses to inoculation with microorganisms and coating with micronutrients, aminoacids and plant growth regulators. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 66, n. 3, p. 293-297, 2009.

DINIZ, L. P. et al. Avaliação de produtos alternativos para controle da requeima do tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.31 n.2, p. 171-179, 2006.

DORNELAS, M. C.; MAZZAFERA, P. A genomic approach to characterization of the Citrus terpene synthase gene family. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, n. 3, p. 832-840, 2007. Suplemento.

EDGINTON, L. V.; KNEW, K. L.; BARRON, G. L. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. **Phytopathology**, St. Paul, v. 62, p. 42-44, 1971.

ELAD, Y.; CHET, I. Possible role of competition for nutrients in biocontrol of *Pythium* damping-off by bacteria. **Phytopathology**, St. Paul, v. 77, p. 190-195, 1987.

ERWIN, D. C.; RIBEIRO, O. K. **Phytophthora Diseases Worldwide**. St. Paul: APS Press. 1996. 562 p.

ESTADO DE ALAGOAS. Gabinete Civil do Governo de Estado de Alagoas. 2008. Disponível em <**http://www.gabinetecivil.al.gov.br**>. Acesso em: 19 de abril de 2011.

FAO. FAOSTAT. 2011. Disponível em: <**http://faostat.fao. org**>. Acesso em: 26 de abril de 2011.

FARIA, A. Y. K.; ALBUQUERQUE, M. C. F.; CASSETARI NETO, D. Qualidade fisiológica de sementes de algodoeiro submetidas a tratamentos químico e biológico. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 25, n. 1, p. 121-127, 2003.

FEICHTENBERGER, E. Doenças incitadas por *Phytophthora* em citros. In: LUZ, E. D. M. N. et al. (Eds.). **Doenças causadas por *Phytophthora* no Brasil**. Campinas: Editora rural. 2001. 283-332 p.

FEICHTENBERGER, E.; MÜLLER, G.W.; GUIRADO, M. Doenças dos citros. In: KIMATI, M. et al. (Eds.). **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4 ed., v. 2. São Paulo: Ceres. 2005. 261-296 p.

FLORES, D. I. V.; IZAQUIRRE, G. G. Incidencia de *Phytophthora nicotianae* y *Phytophthora infestans* en Cuba. **Agricultura Técnica en México**, v. 35, n. 2, p. 219-223, 2009.

FRANCO, A. **Subsídios à utilização da manipueira como nematicida**. 1986. 53 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Céara, Fortaleza.

FRANCO, A. Dosagem de manipueira para tratamento de solo infestado por *Meloidogyne*: II. Segundo experimento. **Nematologia Brasileira**, v. 14, p. 25-32, 1990.

FREITAS-ASTÚA, J. et al. Differentially expressed stress-related genes in the compatible citrus-Citrus leprosis virus interaction. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, n. 3, p. 980-990, 2007. Suplemento.

FREITAS, S. S.; AGUILAR VILDOSO, C. I. Rizobactérias e promoção do crescimento de plantas cítricas. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 28, p. 987-994, 2004.

FURTADO, D. C. **Controle alternativo de *Fusarium semitectum, Colletortrichum gloeosporioides, Curvularia lunata e C. eragrostides* em inflorescências de *Tapeinochillus anannaceae*.** 2006. 89 p. Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo.

FURTADO, L. M. Utilização de Ecolife® e Acibenzolar–s–metil (ASM) no controle da antracnose da banana em pós-colheita. **Summa Phytopathologica,** Botucatu, v. 36, n. 3, p. 237-239, 2010.

GEELS, F. P.; SCHIPPERS, B. Selection of antagonistic fluorescent *Pseudomonas* spp. and their root colonization and persistence following treatment of seed potatoes. **Phytopathology**, St. Paul, v. 73, p. 193-206, 1983.

GHINI, R. Integração do controle biológico com outros métodos de controle de doenças de plantas In: Bettiol, W. (ed.). **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: CNPDA/Embrapa, 1991. p. 201-217.

GHINI, R.; BETTIOL, W. Controle físico de doenças radiculares. In: MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E. G. T.; MENEZES, M. (Ed.) **Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais**.Recife: UFRPE, 2005. p. 323-344.

GRAHAM, J. H. Evaluation of tolerance of citus rootstocks to *Phytophthora* root rot in chlamydospore-infested soil. **Plant Disease**, v. 74, p. 743-746, 1990.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). Sistema IBGE de recuperação automática, Rio de Janeiro. 2011. Disponível em: <**http://www.sidra.ibge.gov.br** > Acesso em: 19 de abril de 2011.

IGLESIAS, D. J. et al. Physiology of citrus fruiting. **Brazilian Journal Plant Physiology**, v. 19, n. 4, p. 333-362, 2007.

KATAN, J. Solar pasteurization of soils for disease control: status and prospects. **Plant Disease**, St. Paul, v. 64, n. 5, p. 450-454, 1980.

KUMAR, R.; KUMAR, S. Effect of homoeopathic medicines on fungal growth and conidial germination. **Indian Phytopathology**, v. 33, p. 620-621, 1980.

LEE, S. O. et al. Antifungal Activity of Five Plant Essential Oils as Fumigant Against Postharvest and Soilborne Plant Pathogenic Fungi. **Plant Pathololgy Journal**, Daejeon, v. 23, n. 2, p. 97-102, 2007.

LEONI, C.; GHINI, R. Efeito do Lodo de Esgoto na Indução de Supressividade *in vitro* a *Phytophthora nicotianae*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 1, p. 67-75, 2003.

LIMA, L.C. et al. Controle da antracnose e qualidade de mangas (*Mangifera indica* L.) cv. Haden, após tratamento hidrotérmico e armazenamento refrigerado em atmosfera modificada. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 31, n. 2, p. 298-304, 2007.

LUCON, C. M. M.; AKAMATSU, M. A.; HARAKAVA, R. Promoção de crescimento e controle de tombamento de plântulas de pepino por rizobactérias. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 6, p. 691-697, 2008.

LUDWIG, J. et al. Microbiolização de sementes para o controle da mancha-parda e da escaldadura em arroz irrigado. **Tropical Plant Pathology**, Lavras, v. 34, n. 5, p. 322-328, 2009.

LUTZ, A. L.; MENGE, J. A. Population fluctuations and the numbers and types of propagules of *Phytophthora parasitica* that occur in irrigated citrus groves. **Plant Disease**, v. 75, p. 173-179, 1991.

LUTZ, A. L.; MENGE, J. A.; FERRIN, D. M. Increased germination of propagules of *Phytophthora parasitica* by heating citrus soil sampled during winter. **Phytopathology**, St. Paul, v. 81, n. 8, p. 865-872, 1991.

LUZ, W. C. Microbiolização de sementes para o controle de doenças de plantas. In: FERNANDES, J. M.; PRESTES, A. M.; PICININI, E. C. (Ed.). v. 1. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. Passo Fundo, 1993. p. 33-77.

MAFIA, R. G. et al. Root colonization and interaction among growth promoting rhizobacteria isolates and eucalypts species. **Revista da Árvore**, Viçosa, v. 33, n. 1, p. 1-9, 2009.

MALAJCZUK, N.; McCOMB, A. J.; PARKER, C. A. Infection by *Phytophthora cinnamomi* Rands of roots of *Eucalyptus calophylla* R. Br. and *Eucalyptus marginata* Donn. **Australia Journal Botanic**, Collingwood, v. 25, p. 483-500, 1997.

MALAVOLTA, E. et al. Seja o Doutor do seu Citros. **Arquivo do Agrônomo Informações Agronômicas**, Piracicaba, v. 65, n. 3, p. 01-22, 1994.

MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B.; GOMES, A. M. A. Controle biológico de doenças radiculares. In: MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E. G. T.; MENEZES, M. (Ed.) **Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais**. Recife: UFRPE, 2005. p. 303-322.

MARIANO, R. L. R. et al. **Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável**. v. 1. Recife: Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica, 2004. p. 89-111.

MARTINEZ, S. S. **O Nim**: Azadirachta indica –natureza, usos múltiplos, produção. Londrina: IAPAR, 2002. 142 p.

MAY-DE-MIO, L. L. **Controle biologico, físico e químico de *Phytophthora parasítica* Dastur em plântulas de citros**. 1994. 89 p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ), Piracicaba.

MAY-DE-MIO, L. L.; GHINI, R.; KIMATI, H. Solarização e T*richoderma* para controle de P*hytophthora parasitica* em mudas de citros. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 22, n. 2, p. 395-409, 2001.

MAY-DE-MIO, L. L.; GHINI, R.; KIMATI, H. Solarização para controle de P*hytophthora parasitica* em mudas de citros. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 3, p. 254-258, 2002.

MEDICE, R. et al. Óleos Essenciais no Controle da Ferrugem Asiática da Soja *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd. **Ciências Agrotécnica**, Lavras, v. 31, n. 1, p. 83-90, 2007.

MEDINA-FILHO, H. P.; BORDIGNON, R.; BALLVÉ, R. M. L. Sunkifolias and Buxisunkis: Sexually obtained reciprocal hybrids of *Citrus sunki* x *Severinia buxifolia*. **Genetics and Molecular Biology,** v. 21, n. 1, 1998. ISSN 1415-4757.

MEDINA FILHO, H. P. et al. Resistência de Clones e Híbridos de Porta-Enxertos de Citros à Gomose de Tronco Causada por *Phytophthora parasitica*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 5, p. 534-540, 2003.

MEDINA FILHO, H. P. et al. Tolerância de híbridos e de clones de porta-enxertos de citros à infecção de raízes por *Phytophthora nicotianae*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 2, p. 169-178, 2004.

MEHTA, A. et al. Signaling pathways in a Citrus EST database. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, n. 3, p. 734-751, 2007. Suplemento.

MELO, I. S. Potencialidades da utilização de *Trichoderma* spp. no controle biológico de doenças de plantas. In: BETTIOL, W. (Ed.). **Controle biológico de doenças de plantas.** Jaguariúna: CNPDA/EMBRAPA, 1991. p. 135-156.

MELO, I. S. Agentes microbianos no controle de fungos fitopatogênicos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Controle biológico**. Jaguariúna: EMBRAPA, 1998. p. 17-67.

MELO, I. S.; VALARINI, P. J. Potencial de rizobactérias no controle de *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. em pepino *(Cucumis sativum* L.). **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 52, n. 2, p. 326-330, 1995.

MENDES NETO, J. et al. Consumo, digestibilidade, desempenho, desenvolvimento ponderal e economicidade de dietas com polpa cítrica em substituição ao feno de capim-tifton 85 para novilhas leiteiras. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 3, p. 626-634, 2007.

MIGUEL, E. G. et al. Atividade de extratos de nim (Azadirachta indica) sobre o crescimento de Colletotrichum spp... In: XXIX Congresso Paulista de Fitopatologia, Botucatu - SP. **Summa Phytopathologica**, v. 32, p. 18-18, 2006.

MOJICA-MARIN, V. et al. Control biológico de la marchitez del chile (*Capsicum annuum* L.) por *Bacillus thuringiensis*. **ΦYTON**, v. 78, p. 105-110, 2009.

MONTERO, C. R. S. et al. Alterações na cutícula de maçãs 'Fuji' e 'Gala' em função do tratamento térmico e da armazenagem refrigerada. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 32, n. 3, p. 441-447, 2010.

MORANDI, M. A. B.; BETTIOL, W. Controle biológico de doenças de plantas no Brasil. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. p. 7-14.

MUNIZ, M. F. S.; QUEIROZ, F. M.; MENEZES, M. Caracterização de isolados de *Phytophthora* patogênicos a *Citrus sinensis* no Estado de Alagoas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 2, p. 201-204, 2004.

NEVES, M. F. et al. **O retrato da citricultura brasileira**. São Paulo: Centro de Pesquisas e Projetos em Marketing e Estratégia (Markestrat), 2011. 137 p.

PIETERSE, C. M. J. et al. Indução de resistência sistêmica por rizobactérias e comunicação na rota de sinalização para uma defesa refinada. **Revisão Anual de Patologia de Planta**, v. 13, p. 277-295, 2005.

PONTE, R. A., Use of the *manipueira* as agricultural input: defensive and fertilizer, In: CEREDA, M. P. (Ed.). Uso, manuseio e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca. v. 4. São Paulo: Cargill Foundation, 2000. p. 80-95. Disponível em: <**http://www.raizes-ong.org.br**>. Acesso em: 14 de novembro de 2010.

POZO, Y. R. et al. Selección de cepas de *Bacillus* y otros géneros relacionados para el control biológico de hongos fitopatógenos. **Fitosanidade**, v. 11, p. 35-39, 2007.

PRIMAVESI, A. **Agroecologia**: Ecosfera, tecnosfera e agricultura. São Paulo: Nobel, 1997. 199 p.

QUEIROZ, B. P. V. **Isolamento e seleção de rizobactérias para promoção de crescimento e controle de *Phytophthora parasitica* em citros.** 2003. 120 p. Tese (Doutorado) – UNESP, Rio Claro.

QUEIROZ, B. P. V.; MELO, I. S. Antagonismo of *Serratia marcescens* towards *Phytophthora parasitica* and its effects in promoting the growth of citrus. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 448-450, 2006.

RODRIGUES, P. H. M. et al. Efeito da Adição de Níveis Crescentes de Polpa Cítrica sobre a Qualidade Fermentativa e o Valor Nutritivo da Silagem de Capim-Elefante. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 4, p. 1138-1145, 2005.

RODRIGUES, P. H. M. et al. Efeito da inclusão de polpa cítrica peletizada na confecção de silagem de capim-elefante (*Pennisetum purpureum*, Schum.). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 6, p. 1751-1760, 2007.

ROMEIRO, R. S. et al. Uma método simples para seleção de rizobactérias com capacidade de promover colonização de raízes e suas implicações na indução de resistências sistêmicas a enfermidades e na promoção do crescimento de plantas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 24, p. 24-24, 1999.

ROSA, D. D. et al. Diversidade de *Phytophthora parasitica* isolados de Citrus usando seqüências de nucleotídeos da região ITS-5.8S rDNA. **Summa Phytopathologica**, v. 32, n. 2, p. 190-193, 2006.

SALGADO, A. P. S. P. et al. Avaliação da atividade fungitóxica de óleos essenciais de folhas de *Eucalyptus* sobre *Fusarium oxysporum, Botrytis cinerea* e *Bipolaris sorokiniana*. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 27, n. 2, p. 249-254, 2003.

SASSERON, G. R. **Desenvolvimento e validação de diagnóstico molecular de fungos patogênicos a citros**. 2008. 82 p. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical- Área de Concentração em Genética, Melhoramento Vegetal e Biotecnologia) - Instituto Agronômico, Campinas.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F; STANGARLIN, J. R.; CRUZ, M. E. S. Uso de extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos. **Revista Floresta**, Curitiba, v. 30, n. 1/2, p. 129-137, 2000.

SENA, E. S.; PONTE, J. J. A manipueira no controle da Meloidoginose da cenoura. **Publicação da Sociedade Brasileira de Nematologia,** Piracicaba, v. 06, p. 95 -98, 1982.

SHARMA, P.; PANDEY, R. Biological control of root-knot nematode; *Meloidogyne incognita* in the medicinal plant; *Withania somnifera* and the effect of biocontrol agents on plant growth. **African Journal of Agricultural Research**, v. 4, n. 6, p. 564-567, 2009.

SHIOMI, H. F.; MELO, I. S.; MINHONI, M. T. A. Seleção de bactérias endofíticas com ação antagônica a fitopatógenos. **Scientia Agrária**, v. 9, n. 4, p. 535-538, 2008.

SILVA, D. M. H.; BASTOS, C. N. Atividade antifúngica de óleos essenciais de espécies de *Piper* sobre *Crinipellis perniciosa*, *Phytophthora palmivora* e *Phytophthora capsici*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 2, p. 143-145, 2007.

SILVA, K. S. et al. Atividade antagônica *in vitro* de isolados de *Trichoderma* spp. ao fungo *Phytophthora citrophthora*. **Semina: Ciências Agrárias,** Londrina, v. 29, n. 4, p. 749-754, 2008.

SILVEIRA, E. B. et al. Bacterização de sementes e desenvolvimento de mudas de pepino. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 2, p. 217-221, 2004.

SIVIERO, A. et al. Avaliação de métodos de inoculação de *Phytophthora parasitica* em plântulas e plantas jovens de citros. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 6, p. 574-580, 2002.

SIVIERO, A. et al. Avaliação *in vitro* de genótipos de citros a *Phytophthora parasitica.* **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 3, p. 300-302, 2004.

SNEH, B.; HUMBLE, S. J.; LOCKWOOD, J. L. Parasitism of oospores of *Phytophthora megaspermae* var. *sojae, P. cactorum, Pythium* and *Aphanomyces euteiches* in soil by oomycetes, chytridiomycetes hyphomycetes, actinomycetes and bacteria. **Phytopathology,** St Paul, v. 67, p. 622-628, 1977.

SOTTERO, A. N. et al. Rizobactérias e alface: colonização rizosférica, promoção de crescimento e controle biológico. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, Viçosa, v. 30, p. 225-234, 2006.

SOUZA, A. A. et al. Comparative analysis of differentially expressed sequence tags of sweet orange and mandarin infected with *Xylella fastidiosa*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, n. 3, p. 965-971, 2007a. Suplemento.

SOUZA, A. A. et al. Analysis of expressed sequence tags from Citrus sinensis L. Osbeck infected with *Xylella fastidiosa*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, n. 3, p. 957-964, 2007b. Suplemento.

SOUZA, F. V. D. et al. Citros ornamentais: beleza a ser explorada. Nordeste Rural Negócios do campo, 2007. Disponível em: <**http://www.nordesterural.com.br/nordesterural/matLer.asp?newsId=4369 embrapa**>. Acesso em: 04 de agosto de 2010.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática, guia ilustrado para identificação das famílias das angiospermas da flora brasileira, baseada em APGII.** Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. 640 p.

SPIEGEL, Y.; CHET, I. Evolution of *Trichoderma* spp. as a biocontrol agent against soilborne fungi and plant parasitic nematodes in Israel. **Integrated Pest Management Review**, v. 03, p. 167-175, 1998.

SPONHOLZ, C. et al. Efeito do Tratamento Hidrotérmico e Químico de Frutos de Banana 'Prata' no Controle da Antracnose em Pós-Colheita. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 5, p. 480-485, 2004.

SRINIVAS, T. et al. Comparative effects of plant extracts and chemicals of the management of leaf spot of groundnut (*Arachis hypogaea* L.). **Tropical Agriculture**, London, v. 77, p. 58-60, 2000.

TAKITA, M. A. et al. Terpene production in the peel of sweet orange fruits. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, n. 3, p. 841-847, 2007. Suplemento.

TANU, A. P.; ADHOLEYA, A. Effect of different organic manures/composts on the herbage and essential oil yield of Cymbopogon winterianus and their influence on the native AM population in a marginal alfisol. **Bioresource Technology**, v. 92, n. 3, p. 311-319, 2004.

TOKARNIA, C. H.; PEIXOTO, P. V.; CUNHA, B. R. M. Experimentos com a polpa cítrica em ovinos e coelhos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 4, p. 172-176, 2001.

VERZIGNASSI, J. R. et al. Efeito dos microrganismos eficazes no controle da mancha púrpura do alho (*Alternaria porri*). **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 29, n. 4, p. 301-308, 2003.

VIANA, F. M. P. et al. Influência da Variedade da Copa na Incidência da Gomose-de-Phytophthora em Porta-Enxerto de Limoeiro 'Cravo' no Estado do Piauí. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 1, p. 103-103, 2004.

VILAS-BOAS, C. H. et al. Efeito do Ecolife® no crescimento micelial de *Colletotrichum* sp. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, p. 158-158, 2004. Suplemento.

VINALE, F. et al. *Trichoderma*–plant–pathogen interactions. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 40, p. 1-10, 2008.
WATANABE, P. H. et al. Effect of Inclusion of Citrus Pulp in the Diet of Finishing Swines. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 3, p. 709-718, 2010.

WEILER, R. L. et al. Caracterização molecular de uma progênie de tangerineira 'Clementina Fina' e 'Montenegrina'. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 7, p. 1523-1529, 2010.

ZEILINGER, S; OMANN, M. *Trichoderma* Biocontrol: Signal Transduction Pathways Involved in Host Sensing and Mycoparasitism. **Gene Regulation and Systems Biology**, v. 01, p. 227-234, 2007.

APÊNDICES

Apêdice A – Tabela das principais pragas dos citros (MALAVOLTA et al., 1994)

Nome comum	**Agente causal**	**Órgãos afetados e sintomas**
Ácaro branco	*Polyphagotarsonemus latus* Banks	As folhas ficam com os bordos curvados para dentro e a face inferior fica com cor de ferrugem. Os frutos têm a casca deformada ficando com coloração esbranquiçada.
Ácaro da falsa ferrugem	*Phyllocoptruta oleivora* Ashm.	Escurece folhas e frutos com a queima do óleo que extravasa de suas picadas. As folhas caem, os frutos perdem tamanho e qualidade. Quando "emplaca", a perda é praticamente total.
Ácaro da leprose	*Brevipalpus phoenicis* Geijskes	Nas folhas, lesões rasas, não salientes, visíveis nas duas faces; halo claro circundando a lesão. Nos frutos, lesões escuras, pouco deprimidas, não salientes; halo claro ao redor das lesões (nos frutos verdes). Nos galhos, lesões salientes, corticosas, de coloração palha ou pardacenta. As folhas caem precocemente e os frutos perdem o valor comercial.
Bicho furão	*Ecdytolopha aurantiana* Lima	As larvas se desenvolvem dentro dos frutos, deteriorando-os e provocando sua queda precoce; quando não caem, perdem o valor comercial.
Brocas	Diversos	As larvas se desenvolvem em ramos e troncos destruindo o tecido. Causa seca de ramos e até mesmo a morte da planta.
Cochonilha	*Unaspis citri* Comstock	Recobre troncos e galhos com grossa camada impedindo a respiração, asfixiando a planta.
Cochonilha escama farinha	*Pinnaspis aspidistrae* Signoret	Recobre tronco e galhos, sugando a seiva e impedindo a respiração do tecido vegetal, podendo, em caso de ataque severo, levar a planta à morte.
Cochonilha ortézia	*Orthezia praelonga* Douglas	Recobre troncos, galhos e folhas, impedindo a respiração.
Cochonilha pardinha	*Selenaspidus articulatus* Morgan	Recobre principalmente galhos e folhas, impedindo a respiração e sugando a seiva.
Cochonilha verde	*Coccus viridis* Green	Desenvolve-se principalmente em tecido de ramos novos sugando a seiva e impedindo a respiração.
Larva minadora	*Phyllocnistis citrella* Stainton	Abre galeria entre as páginas superior e inferior da folha. As folhas ficam retorcidas e caem prematuramente.
Mosca das frutas	*Ceratitis capitata* Wied.	As larvas se desenvolvem no interior dos frutos. Nos frutos verdolengos causa a "mancha parda" e nos maduros a podridão que leva à queda prematura ou perda do valor econômico.
Pulgão preto	*Toxoptera citricidus* Kirkaldy	Suga a seiva dos ramos novos, depauperando a planta, deformando as folhas e pode transmitir doenças viróticas.
Nematóides	Diversos	Sugam a seiva das raízes, deformando-as e impedindo a circulação da seiva.

Apêndice B – Tabela das principais doenças que acometem os citros (MALAVOLTA et al., 1994)

Nome comum	**Agente causal**	**Órgãos afetados e sintomas**
Damping off	*Pythium* spp *Phytophthora* spp *Rhizoctonia solani* Kühn	Pré-emergência: sementes apodrecem, não nascem. Pós-emergência: lesões na região do colo interrompendo a passagem da seiva. A plantinha tomba e morre.
Gomose de *Phytophthora*	*Phytophthora* spp	Lesões na casca do tronco e de ramos; exsudação de goma na área afetada; seca e fendilhamento longitudinal da casca; clorose foliar, murcha progressiva, seca de galhos e morte total da planta.
Gomose de *Phomopsis*	*Phomopsis citri* H.S. Fawc.	Lesões nos troncos e ramos com exsudação de goma.
Gomose de *Diplodia*	*Diplodia* sp	Podridão escura em tecidos da casca e do lenho no tronco, raízes e ramos; exsudação de goma na zona afetada.
Melanose	*Diaporthe citri* (Fawc.) Wolf	Observada em ramos, folhas e frutos. Nas frutas aparecem lesões salientes, muito numerosas ("manchas de lágrima") que os depreciam para o comércio "in natura".
Podridão peduncular	*Diaporthe medusaea* Nitschke	No pedúnculo, aparece lesão pardo-clara que pode avançar para o fruto tornando o tecido flácido.
Podridão de raízes	*Phytophthora* spp *Rosellinia* spp	Escurecimento do câmbio; amarelamento, murcha e queda de folhas; queda de frutos; definhamento progressivo; morte das plantas.
Verrugose	*Elsinoe* spp	Aparecem lesões corticosas, salientes, cor de palha em frutos, folhas e ramos.
Mancha graxa	*Mycosphaerella horii* Hara	Lesões foliares salientes, necróticas, impregnadas de goma, dando aspecto de mancha de graxa.
Fumagina	*Capnodium citri* Berk. & Desm.	Revestimento preto sobre folhas (principalmente), ramos e frutos que impede a respiração.
Mancha preta	*Guignardia citricarpa* Kiely	Principalmente nos frutos aparecem lesões pretas, pequenas e pouco definidas, de 2 a 6 mm de diâmetro, que depreciam o produto, fazendo com que caiam antes da colheita normal.
Rubelose	*Corticium salmonicolor* Berk. & Br.	Aparece inicialmente na bifurcação de ramos; observam-se filamentos esbranquiçados e frutificações do fungo de cor salmon. Na fase final provoca morte dos ramos com soltura da casca (descascamento).

Tabela das principais doenças dos citros (MALAVOLTA et al., 1994; Continuação)

Nome comum	**Agente causal**	**Órgãos afetados e sintomas**
Feltro ou camurça	*Septobasidium* spp	Observa-se um revestimento espesso de cor branca, parda ou cinza, principalmente sobre os ramos, podendo se estender para as folhas e frutos, o que não é comum.
Antracnose	*Colletotrichum gloeosporioides* (Penzig) Penzig & Saccardo	Presença de manchas necróticas em folhas; seca de ramos ponteiros; lesões deprimidas em frutos; que da prematura de frutinhos.
Antracnose do limão galego	*Gloeosporium limetticolum* Clausen	Lesões corticosas, salientes, em pequeno número por fruto (menos de duas); manchas foliares com centro necrótico provocando deformação no limbo foliar; pequenos orifícios no centro das lesões.
Albinismo em canteiros	*Aspergillus flavus* (Gray) Link	As mudinhas vêm com folhas e hastes esbranquiçadas. As plantas morrem devido à falta de clorofila.
Podridão de Aspergillus	*Aspergillus Níger* Tiegh	Os frutos mostram podridão mole; no final do ciclo o fruto fica recoberto por uma massa escura de esporos.
Cancro cítrico	*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* **(**Hasse**)** Vauterin *et al*.	Nas folhas: lesões salientes, corticosas, visíveis e correspondentes nas duas faces; halo claro circundando as lesões. Nos frutos: lesões salientes, corticosas; halo claro circundando as lesões (frutos verdes). Nos galhos: lesões salientes, corticosas, de cor palha ou parda.
Clorose variegada dos citros	*Xylella fastidiosa* Wells *et al*.	Frutos de tamanho reduzido; amadurecimento precoce de frutos, que ficam pequenos, duros e sem suco; planta com desenvolvimento retardado; folhas amareladas e pequenas.
Tristeza	*Citrus tristeza virus*	Observa-se caneluras no lenho; clorose de nervuras; podridão de raízes e definhamento geral da planta.
Sorose	*Citrus psorosis virus*	Lesões no tronco e ramos com descascamento; clorose internerval em folhas novas.
Exocorte	*Citrus exocortis viroid*	Rachaduras e descascamento de galhos.
Xiloporose	*Hop stunt viroid*	Reentrância no lenho; com ou sem presença de goma; definhamento da planta.
Declínio	?	Paralisação do crescimento; murchamento de folhas; folhas miúdas; frutos pequenos, com redução da produção.