

EDUARDO SANTOS DA SILVA

Avaliação de isolados bacterianos de citros no controle *in vitro* de *Colletotrichum* spp.

São Cristóvão – SE

Março - 2024



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE – UFS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS APLICADAS – CCAA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA AGRÔNOMICA – DEA

Avaliação de isolados bacterianos de citros no controle *in vitro* de *Colletotrichum* spp

Monografia apresentada ao Departamento de Engenharia Agrônômica – Universidade Federal de Sergipe, como requisito parcial para obtenção do título de Engenheiro Agrônomo.

APROVADO em:

Documento assinado digitalmente
gov.br PAULO ROBERTO GAGLIARDI
Data: 12/04/2024 17:37:04-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. Paulo Roberto Gagliardi

Documento assinado digitalmente
gov.br CRISLAINE COSTA CALAZANS
Data: 11/04/2024 22:17:32-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Documento assinado digitalmente
gov.br JOSE CARLOS FREITAS DE SA FILHO
Data: 12/04/2024 08:03:07-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. Crislaine Costa Calazans

MSc. José Carlos Freitas Sá Filho

Dedico esse trabalho a minha família que sempre me apoiou em todos os momentos.

Em especial a meu Pai e meu irmão, pelos conselhos e apoio nas minhas decisões e minha querida mãe que hoje não mais presente entre nós, continua me dando força e motivação para seguir buscando e lutando pelos objetivos que um dia sonhamos juntos...

*É necessário acreditar que o sonho é possível,
que o céu é o limite e você truta é imbatível (Racionais MC's).*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me abençoar nas buscar por meus objetivos e permite que tudo acontecesse da melhor forma.

Quero agradecer toda a minha família que estiveram comigo ao longo da minha jornada acadêmica e pessoal. Minha sincera gratidão a meu orientador Professor Paulo Roberto Gagliardi por todo o apoio e orientação que você me proporcionou ao longo deste período.

Quero expressar minha gratidão aos meus amigos Paulo Jr, Jocéan e Silveira Jr, que sempre estiveram ao meu lado em todos os momentos da minha vida. Agradeço também a Pedro Vinícius e Joyce por toda ajuda e resenha ao longo desse tempo.

E agradeço a todos os meus amigos que estão comigo no dia a dia, deixando os dias mais leves. Amo todos vocês.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	8
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	10
2.1 Aspectos botânicos da laranjeira.....	10
2.2 Aspectos econômicos.....	10
2.3 Principais doenças dos citros.....	11
2.4 O gênero <i>Colletotrichum</i>	12
2.5 Métodos de controle.....	12
2.6 Controle biológico.....	12
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1 Isolados.....	14
3.2 Preparo do material vegetal	14
3.3 Bioprospecção dos isolados bacterianos.....	15
3.4 <i>Colletotrichum</i>	15
3.5 Teste de antagonismo <i>in vitro</i>	16
4. RESULTADOS.....	17
5. DISCUSSÃO.....	23
6. CONCLUSÃO.....	25
REFERÊNCIAS.....	26

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1: Preparo do Material para o isolamento de bactérias: A) material vegetal fragmentado por partes; B) material em água destilada pg. 14

estéril.....

Figura 2: Isolados de fungo do gênero *Colletotrichum* P2aP, pg 15
respectivamente, em meio de cultura BDA com 7 dias após a
inoculação.....

Figura 3: Confronto em placas da bactéria com o fungo *Colletotrichum*... pg 17

Figura 4: Porcentagem de inibição bacteriana da flor da primeira pg 18
amostra....

Figura 5: Porcentagem de inibição bacteriana do pedúnculo da primeira pg 19
amostra.....

Figura 6: Porcentagem de inibição bacteriana da haste da primeira pg 20
amostra.

Figura 7: porcentagem de inibição bacteriana da flor da segunda amostra. pg 20

Figura 8: Porcentagem de inibição bacteriana do pedúnculo da segunda pg 21
amostra.....

Figura 9: Porcentagem de inibição bacteriana da haste da segunda pg 22
amostra.

RESUMO

O mercado de citros é crucial para a economia, com o Brasil liderando a produção e exportação de laranjas. Sergipe desempenha um papel significativo nesse cenário,

especialmente na exportação de suco de laranja, apesar dos desafios enfrentados. Este estudo propôs avaliar bactérias para o controle biológico de doenças fúngicas que afetam os citros, oferecendo uma alternativa sustentável aos fungicidas sintéticos. As doenças como Huanglongbing (HLB), clorose variegada dos citros (CVC) e antracnose causada pelo gênero *Colletotrichum* representam ameaças importantes à produção de citros, especialmente em ambientes úmidos e quentes. O estudo foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia e Bioinsumos da Universidade Federal de Sergipe, onde foram obtidos isolados bacterianos de materiais vegetais de citros, os quais foram testados para controle de fitopatógenos. Os resultados indicaram que as bactérias apresentaram potencial satisfatório de inibição do fungo *Colletotrichum*, especialmente quando inoculadas 24 horas antes do fungo. Houve variação na eficácia de inibição entre diferentes meios de cultura e tempos de incubação. Além disso, a segunda amostra apresentou resultados mais consistentes e com maior porcentagem de inibição, sugerindo que o tipo de material vegetal influencia na eficácia do controle biológico realizado pelas bactérias.

PALAVRAS-CHAVE: Biocontrole, antracnose, antagonistas, citricultura

1. INTRODUÇÃO

O mercado de citros é vasto, e desempenha um papel de grande relevância econômica. A China lidera como o maior exportador mundial de citros, com o Brasil no segundo lugar do ranking. Quando nos concentramos na cultura da laranja (*Citrus sinensis*).

A relevância dos citros na agricultura é inegável, dada sua significativa contribuição econômica. No entanto, os desafios surgem com as doenças causadas por fitopatógenos, tais como aqueles pertencentes ao gênero *Colletotrichum*, representando uma ameaça à produção e exigindo estratégias de manejo eficazes.

O mercado interno de produção de laranja no Brasil é dominado pela região Sudeste, com a região Nordeste seguindo como um dos principais produtores nacionais. Sergipe, embora seja reconhecido como um dos principais produtores do país, entre os anos de 2016 e 2020 enfrentou uma redução na sua produção, possivelmente devido ao aumento na produção de milho. O município de Lagarto se destaca devido à diversidade de sua produção agrícola, que abrange cultivos como amendoim, banana, fumo, laranja e maracujá. (Silva, 2019).

No ano de 2019, teve uma redução de produção de laranja no estado de Sergipe, já no ano seguinte houve um aumento gradativo na produção, que fez com que o estado se tornasse o principal exportador. Segundo Vidal (2020), Sergipe foi responsável por 98% do faturamento total do Nordeste, como exportador de suco de laranja, o que consolida o estado como um dos principais produtos..

Assim, é de extrema importância dedicar maior atenção à produção de laranjas, considerando sua significativa relevância econômica no estado. Uma ênfase especial deve ser colocada na gestão do manejo de pragas e doenças que impactam o cultivo da fruta, uma vez que podem dizimar pomares, causando danos que podem chegar a comprometer até 80% da produção.

Doenças fúngicas como huanglongbing (HLB), clorose variegada dos citros (CVC), mancha preta dos citros (MPC), cancro cítrico e podridão floral dos citros, quando não controladas causam danos severos a cultura e diminuem drasticamente a produção causando grandes prejuízos econômicos, principalmente nas épocas mais frias do ano, onde a umidade é alta e por ser uma região de temperaturas mais elevadas se tornam ambientes favoráveis aos ataques de doenças fúngicas.

As espécies de fungos pertencentes ao gênero *Colletotrichum* são causadoras de grandes danos as frutíferas, eles são altamente adaptáveis aos ambientes em que estão presentes. Isso faz com que fungos desse gênero tenham alta eficiência para causar danos e prejuízos econômicos em pomares de frutíferas (Araújo, 2015).

A antracnose é uma doença amplamente disseminada que atinge diversas culturas, incluindo hortaliças solanáceas, goiaba, mamão, manga, entre outras. Existe uma notável diversidade nas características morfo-culturais dos fungos pertencentes ao gênero *Colletotrichum*. Um exemplo é a podridão floral dos citros, provocada pelo *C. Acutatum*, uma espécie deste gênero que impacta os pomares durante o período de floração nos meses de inverno. Neste período, a umidade elevada cria um ambiente propício para o desenvolvimento da doença.

Entre as diversas espécies de *Colletotrichum*, existem formas saprofiticas e patogênicas, sendo estas últimas responsáveis por doenças economicamente relevantes, frequentemente designadas como antracnoses, que impactam uma extensa gama de hospedeiros. Considerando o potencial danoso do *Colletotrichum* e sua capacidade de causar prejuízos econômicos significativos, estratégias de controle são empregadas para mitigar os danos nos pomares durante o período de crescimento vegetativo e florescimento.

A aplicação de fungicidas benzimidazóis, folpet e piraclostrobina na fase inicial de floração, tem alcançado resultados positivos no controle da doença. Foram descobertos relatos de resistência dos patógenos associados a agentes químicos de controle e com isso, novas alternativas estão sendo testadas (Salgado, 2021; Goulin, 2017).

Com relatos de doenças cada vez mais resistentes aos fungicidas sintéticos, o controle biológico emerge como uma nova alternativa, reduzindo a exposição dos agricultores a produtos químicos e conseqüentemente, diminuindo o potencial de poluição ambiental.

O objetivo deste estudo foi avaliar *in vitro* os atributos e a capacidade de biocontrole de isolados bacterianos selecionados de materiais vegetais de citros contra fitopatógenos do gênero *Colletotrichum*.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aspectos botânicos da laranjeira

A laranjeira (*Citrus sinensis*), pertencente à família *Rutaceae*, é uma árvore de porte médio, com folhas perenes e verdes lanceoladas. Suas flores são hermafroditas de coloração branca, contendo cinco pétalas, que podem ser solitárias ou agrupadas em pequenas inflorescências. A laranjeira pode realizar a autopolinização e a polinização cruzada, pelo qual o pólen pode ser levado pelo vento ou feito através da interação de insetos, sendo eles especialmente abelhas (Nascimento *et al.*, 2011).

A tangerina 'Cravo' é reconhecida como a variedade comercial mais antiga, cuja origem não é definida. A árvore da tangerineira 'Cravo' exibe um vigor ligeiramente menor em comparação com outras tangerineiras, caracterizando-se como de porte médio. Esta variedade apresenta um padrão de produção alternante, com um ano de grande produção seguido por um ano de produção mais fraca, como é comum em todas as tangerineiras (Franzão, 2009).

2.2 Aspectos econômicos

A produção mundial de citros é dominada pela China, seguida pelo Brasil, ocupando as posições de maior e segundo maior produtor, respectivamente. Apesar disso, quando se trata da produção de laranja, o Brasil ocupa a primeira colocação com 32,8% da produção mundial, se destacando também com um volume global de aproximadamente 62% de suco de laranja (Vidal, 2021).

Na safra de 2016/2017 o Brasil produziu cerca de 441 milhões de caixas de 40,8 kg, representando um acréscimo de 95 milhões de caixas em comparação às épocas anteriores, se consolidando como o maior produtor mundial de laranja doce (IBGE 2017).

A região Nordeste ocupou a segunda posição na produção de laranja doce em nível nacional, contribuindo com cerca de 1.658.588 toneladas de frutas, representando aproximadamente 11,3% da produção total do país. É importante ressaltar que no cenário brasileiro a região Sudeste lidera no ranking de produção, com destaque para os estados de São Paulo e Minas Gerais como os líderes em termos de produção (IBGE 2017).

O estado de Sergipe apresentou uma queda na produtividade de laranja, entre 2016 e 2020. Sua produção no ano de 2016 foi de aproximadamente 489,156 toneladas, já em 2020 sua produtividade foi de 378,422 toneladas. Mesmo com esse decréscimo, o estado de Sergipe juntamente com o estado da Bahia abastece todo o Nordeste. (Vidal, 2021)

Em 2020, o estado de Sergipe desempenhou um papel fundamental no cenário das exportações de suco de laranja no Nordeste, contribuindo com notável 98% do faturamento total. Esse êxito consolida o suco de laranja como um dos principais produtos de exportação do estado, sendo responsável por aproximadamente 67% do montante global de receitas provenientes das exportações (Vidal, 2021).

2.3 Principais doenças dos citros

Algumas doenças afetam os citros e podem ser devastadoras quando comparado a produção. Algumas ganham destaque quanto a severidade como, *Huanglongbing* (HLB), clorose variegada dos citros (CVC), mancha preta dos citros (MPC), cancro cítrico e podridão floral dos citros.

O *Huanglongbing* é a doença mais significativa e devastadora na citricultura global. Ela é agravada sobretudo pela falta de soluções curativas e pela ausência de variedades de citros resistentes ao patógeno, essa doença apresenta sintomas distintivos nas plantas, incluindo o amarelecimento das folhas, áreas verdes que desenvolvem manchas irregulares e moteadas, além de anomalias no crescimento e a queda prematura de frutos (Docema, 2021).

A CVC é ocasionada pela bactéria *Xylella fastidiosa*, que se restringe ao xilema (Laranjeira, 1998). Os primeiros sintomas da CVC incluem clorose das folhas, deficiências nutricionais, clorose variegada nas folhas mais desenvolvidas, frutos menores e endurecidos, e galhos proeminentes na parte superior da copa em plantas gravemente afetadas (Rossetti, 2017).

A mancha preta dos citros, causada pelo fungo *Guignardia citricarpa*, que corresponde à forma imperfeita do *Phyllosticta citricarpa*, manifesta-se principalmente por meio de lesões em frutos, bem como em pecíolos, folhas, pedúnculos e ramos, causando danos indiretos (Silva-Pinhati, 2017).

O cancro cítrico, ocasionado pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, prejudica todas as espécies e variedades de citros de relevância comercial. Os primeiros indícios do cancro cítrico geralmente se manifestam na parte inferior das folhas, aparecendo como pequenas protuberâncias de cor marrom clara. Conforme a doença avança, essas lesões crescem e escurecem, adquirindo uma aparência semelhante a verrugas. O cancro cítrico também pode afetar os frutos, formando lesões (Puric, 2018).

A preocupação com a podridão tem aumentado consistentemente ao longo do tempo. Desde os anos 1990, ela foi reconhecida como uma das principais doenças que afetam a produção de citros, graviola, pinha e outras frutas. A podridão é causada pelos fungos *Colletotrichum acutatum* e *Colletotrichum gloeosporioides*. Esta doença está

restrita ao continente americano e sua gravidade tende a aumentar significativamente em condições ambientais favoráveis, podendo resultar em perdas substanciais na produção. (Silva Junior, 2011; Kamei, 2014).

2.4 O gênero *Colletotrichum*

Os fungos do gênero *Colletotrichum* possuem uma importância econômica considerável, pois estão ligados a várias doenças que impactam diferentes culturas. Estudos revelaram que é comum encontrar esses fungos como endofíticos em uma variedade de cultivares. Com sua diversidade de espécies, o gênero *Colletotrichum* demonstra a habilidade de infectar mais de 30 gêneros de plantas, resultando em doenças que afetam as plantações antes e após a colheita. Essas doenças afetam uma ampla gama de culturas em diversos climas, incluindo os tropicais, subtropicais e temperados. (Pamphile, 2017; Carbon, 2018).

As espécies de fungos pertencentes ao gênero *Colletotrichum* são reconhecidas como alguns dos patógenos mais eficazes em plantas, ocasionando prejuízos econômicos significativos nas plantações das regiões tropicais, subtropicais e temperadas (Araújo, 2015).

2.5 Métodos de controle

Novas alternativas vêm sendo testadas para o gênero *Colletotrichum*, foram realizados testes com alguns extratos vegetais e óleos essenciais de diversas espécies para o controle da antracnose em culturas como morango. Um exemplo desses testes envolveu o uso do óleo essencial e do extrato bruto aquoso de Capim-Limão (Ribeiro, 1999; Domiciano 2019).

Os agricultores de citros da região sudoeste de São Paulo têm adotado medidas preventivas para controlar a doença através de pulverizações estrategicamente programadas durante o período de florescimento. Uma abordagem para melhorar a eficácia da aplicação de fungicidas é a utilização de sistemas de previsão e alerta de doenças vegetais. Esses sistemas têm como objetivo antecipar ocorrências de surtos ou aumento na severidade da doença, fundamentando-se em fatores tanto do passado quanto do futuro (Gama, 2017).

O manejo dessa enfermidade se fundamenta na aplicação de fungicidas que atuam ao interromper o processo respiratório das células do patógeno (Goulin, 2017).

2.6 Controle biológico

Os agentes de controle biológico (ACBs) são organismos designados para a realização do controle de doenças ou pragas. No campo da Fitopatologia, o controle biológico se concentra na utilização de micro-antagonistas, enquanto na Entomologia, a abordagem envolve insetos predadores ou parasitoides, além de microrganismos com a capacidade de afetar insetos-praga e vetores de doenças, alcançando assim o controle biológico (Mascaro, 2021).

O uso do controle biológico minimiza a exposição dos agricultores aos produtos químicos, reduzindo o potencial de poluição ambiental. Além disso, não causa impactos negativos na qualidade do solo, previne o surgimento de pragas resistentes, impede a contaminação dos alimentos, elimina a necessidade de pesticidas e promove o crescimento da agricultura orgânica (Barros *et al.* 2021).

Em seu estudo, Theodoro (2003) verificou os efeitos do controle biológico em ambientes laboratoriais. Através da introdução do agente causador da enfermidade e da aplicação de *Trichoderma* spp. sobre flores isoladas da lima ácida Tahiti, o autor observou-se que as cepas produziram compostos metabólitos termoestáveis que efetivamente suprimiram o crescimento de *Colletotrichum acutatum* em meios de cultura.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos e análises realizados nesta pesquisa foram conduzidos nas instalações do Laboratório de Fitopatologia e Bioinsumos (LAFiBIO), localizado no Departamento de Engenharia Agrônômica da Universidade Federal de Sergipe, campus São Cristóvão.

3.1 Isolados

Os isolados bacterianos foram obtidos pela bioprospecção de materiais vegetais de citros, mais especificamente flores, pedúnculos e hastes de laranjeiras provenientes de duas propriedades rurais localizadas no município de Lagarto, Sergipe. Variedades de laranja-pera (*Citrus sinensis*) e tangerina cravo (*Citrus reticulata*), com cerca de 4 e 5 anos de idade, foram utilizados no presente estudo.

3.2 Preparo do material vegetal

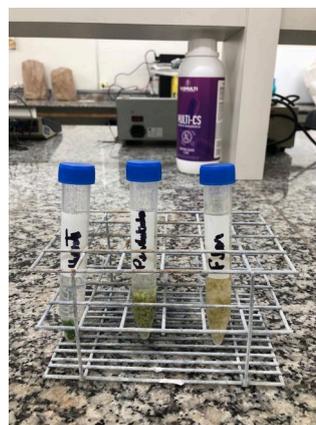
O material coletado, flores completas, pedúnculo floral e hastes, foi submetido a um procedimento de desinfestação superficial seguindo as etapas: imersão em álcool 70% por 2 minutos, seguida de tratamento com hipoclorito por 1 minuto, enxágue em água destilada estéril por 2 minutos e, por fim, nova imersão em água destilada estéril por mais 2 minutos. Essas medidas foram adotadas para garantir a eliminação de contaminantes externos e assegurar a integridade dos isolados bacterianos endofíticos.

Após a desinfestação do material vegetal, procedeu-se à fragmentação das três partes supracitadas utilizando um bisturi, transformando o material em partes menores. Em seguida, os fragmentos foram colocados em tubos de ensaio de vidro contendo água destilada estéril e armazenados na geladeira por um período de 24 horas. Após esse período, os tubos foram retirados do armazenamento e submetidos ao agitador Vortex para homogeneização e uma alíquota foi aplicada em placa de Petri sobre os diferentes meios de cultura (Figura 1).

Figura 1. Preparo do Material para o isolamento de bactérias: A) material vegetal fragmentado por partes; B) material em água destilada estéril.



A



B

Fonte: acervo do autor, 2024.

3.3 Bioprospecção dos isolados bacterianos

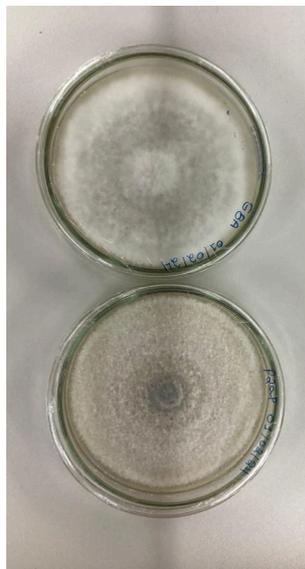
A bioprospecção das bactérias foi realizada utilizando quatro diferentes meios de cultura: Batata, Dextrose e Ágar (BDA), Ágar e Triptona de Soja (TSE), Spino (SP), Triptona + extrato de levedura + D-Glicose Monohidratada + Cloreto de Sódio (LB).

Após a aplicação de 100µl do conteúdo dos tubos em placas contendo os meios de cultura citados, aguardou-se um período de sete dias para o desenvolvimento microbiano. Colônias típicas de bactérias foram transferidas para outra placa utilizando os mesmos meios de cultura, com o objetivo de se obter isolados puros para posterior confronto com o isolado de *Colletotrichum*, a fim de avaliar seu potencial de inibição do desenvolvimento do fungo causador da podridão floral nos citros

3.4 *Colletotrichum*

Isolados de fungos do gênero *Colletotrichum*, foram adquiridos da coleção de fungos do Laboratório de Fitopatologia e Virologia da Universidade Federal de Alagoas, campus de Rio Largo-AL. Os fungos identificados como *C. theobromicola* (G8A) e *C. fruticola* (P2aP), foram repicados e reativados para sua utilização ao longo do experimento (Figura 2). Uma amostra foi armazenada em temperatura ambiente e mantida em conservação na coleção do LAFiBIO para trabalhos futuros.

Figura 2- Isolados de fungo do gênero *Colletotrichum* P2aP, respectivamente, em meio de cultura BDA com 7 dias após a inoculação.



Fonte: acervo do autor, 2024.

3.5 Teste de antagonismo *in vitro*

Os confrontos (bactérias X fungo) foram realizados com a inoculação de uma amostra do fungo do gênero *Colletotrichum*, P2aP juntamente com as bactérias da amostra, em placas de Petri contendo diferentes meios de cultura. Para as duas amostras coletadas, denominadas M1 e M2, foram realizadas repetições para as mesmas (Figura 3).

Foram utilizadas placas de Petri contendo meio de cultura LB, TSA e Spino, cultivadas ao longo de dois dias designados como 0 horas, 24 horas e 48 horas. Essa diferenciação temporal foi empregada para realizar o confronto entre o fungo e a bactéria em diferentes momentos. No momento 0 horas, ambos foram confrontados simultaneamente. No momento 24 horas, a bactéria foi introduzida primeiro e, após 24 horas, o fungo foi adicionado para o confronto. No momento 48 horas, a bactéria foi introduzida primeiro, após 48 horas, os fungos foram adicionados para o confronto.

Para cada ponto de avaliação temporal (0 horas, 24 horas e 48 horas), foram conduzidas três repetições para cada origem das bactérias (flor completa, haste e pedúnculo floral).

As placas de teste foram então incubadas a 28 °C por um período de sete dias, onde foram feitas observações sobre a inibição do crescimento dos patógenos. Após a incubação, o crescimento do microrganismo alvo foi medido com paquímetro, e a porcentagem de inibição do patógeno foi calculada com base na seguinte fórmula:

$$\% \text{Inibição} = (C - T/C) \times 100$$

Onde C representa o crescimento no grupo de controle e T representa o crescimento no grupo de tratamento.

Figura 3- Confronto em placas da bactéria com o fungo *Colletotrichum*..



Fonte: acervo do autor, 2024.

4. RESULTADOS

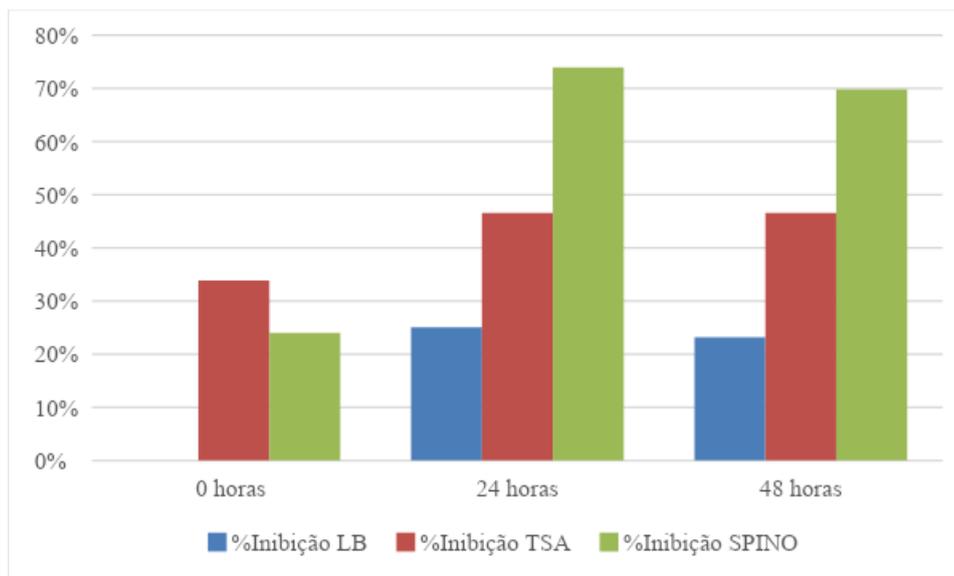
Durante a análise do experimento, notou-se que a bactéria apresentou dificuldade em se desenvolver no meio de cultura BDA. Essa observação levou à decisão de descartar o meio ao longo do experimento. De acordo com Cattelan (1999), estudos anteriores destacaram que o BDA favorece mais o crescimento dos fungos em comparação com as bactérias.

Das bactérias obtidas através da flor cultivada em meio de cultura LB, observou-se que a porcentagem de inibição sobre o fungo no início do experimento, no intervalo de 0 horas, foi nula (0%), indicando ausência de efeito inibitório sobre o fungo. Com o decorrer do tempo, após o intervalo de 24 horas, houve um aumento para 25,1% na porcentagem de inibição, demonstrando uma eficácia moderada. Após 48 horas, a porcentagem de inibição diminuiu para 23,2% (figura 4).

Para as bactérias obtidas da flor cultivada em meio de cultura TSA, foram favoráveis quanto a inibição. No início do experimento, no intervalo de 0 horas, a porcentagem de inibição foi de 33,9%, evidenciando uma eficácia moderada na supressão do crescimento fúngico. Após 24 horas, essa porcentagem aumentou para 46,6%, mantendo-se estável também após 48 horas (figura 4).

Já as bactérias obtidas da flor cultivada em meio de cultura Spino, constatou-se uma porcentagem de inibição de 24% no início do experimento, no intervalo de 0 horas. Após 24 horas, houve um aumento significativo para 74%, indicando uma eficácia considerável na inibição do fungo. Após 48 horas, a porcentagem de inibição permaneceu alta, em 70%, embora ligeiramente menor que a observada anteriormente (figura 4).

Figura 4- Porcentagem de inibição bacteriana da flor da primeira amostra.



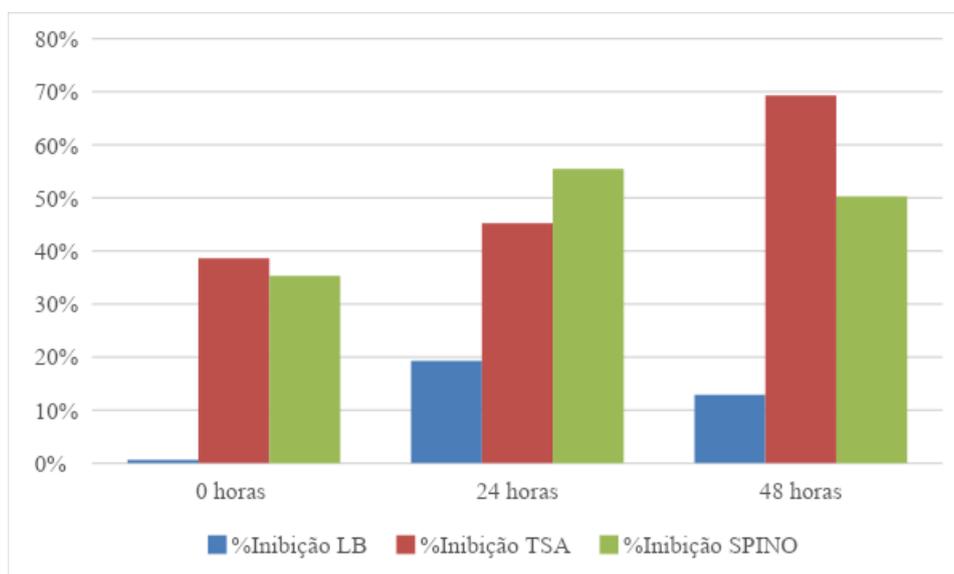
Nas bactérias provenientes do pedúnculo, constatou-se que a inibição do fungo no meio LB, durante o intervalo de 0 horas, apresentou uma eficácia inicial de 0,6%. Entretanto, ao longo do tempo, essa porcentagem aumentou para 19,3% após 24 horas da inoculação da bactéria. Posteriormente, ocorreu uma redução na inibição do fungo, caindo para 12,9% após 48 horas (Figura 5).

No meio TSA, demonstrou resultados mais expressivos desde o início, com uma porcentagem de inibição de 33,9% no intervalo de 0 horas. Ao longo das 24 horas subsequentes, essa porcentagem aumentou para 45,2%, indicando uma eficácia contínua na inibição do crescimento bacteriano. Após 48 horas, a eficácia aumentou ainda mais, alcançando 69,3%, sugerindo uma melhora progressiva ao longo do tempo (Figura 5).

Quanto ao meio de cultura da Spino, observou-se uma porcentagem de inibição inicialmente alta de 35,3% no período de inoculação de 0 horas. Ao longo das 24 horas seguintes, assim como nas demais análises, a porcentagem de inibição também aumentou,

atingindo 55,5%. No entanto, ao longo das 48 horas, houve uma leve redução na eficácia, alcançando 50,3% (Figura 5).

Figura 5 - Porcentagem de inibição bacteriana do pedúnculo da primeira amostra.

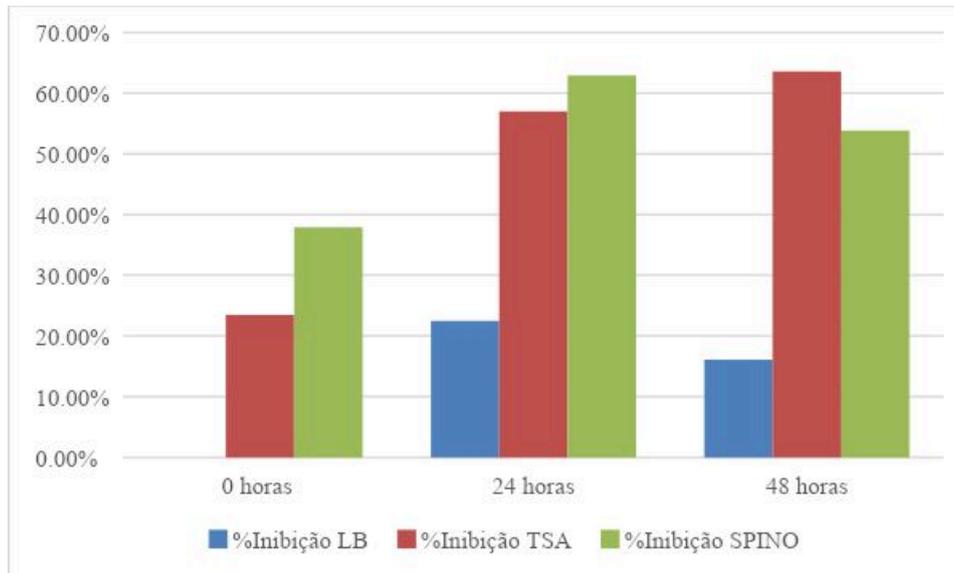


As bactérias do meio de cultura LB, obtidas através da haste, revelaram uma ausência inicial de efeito inibitório sobre o crescimento fúngico, com uma porcentagem de inibição de 0% no intervalo de 0 horas. Entretanto, após 24 horas, observou-se um aumento significativo para 22,5%. Após 48 horas, houve uma diminuição ligeira, atingindo 16,1% (Figura 6).

No meio de cultura TSA, apresentou uma porcentagem inicial de inibição de 23,5% no intervalo de 0 horas. Após 24 horas, essa porcentagem aumentou consideravelmente para 57%, indicando uma eficácia moderada na inibição do crescimento fúngico. No intervalo de 48 horas, essa eficácia aumentou ainda mais, alcançando 63,6%, o que sugere uma melhoria progressiva ao longo do tempo do experimento (Figura 6).

Em relação ao meio de cultura Spino, foi constatada uma porcentagem inicial de inibição de 37,9% no intervalo de 0 horas. Após 24 horas, essa porcentagem aumentou significativamente para 62,9%, indicando uma eficácia crescente na inibição do crescimento do fungo. No entanto, no intervalo de 48 horas, ocorreu uma redução na eficácia da inibição, atingindo 53,8% (Figura 6).

Figura 6 - Porcentagem de inibição bacteriana da haste da primeira amostra.

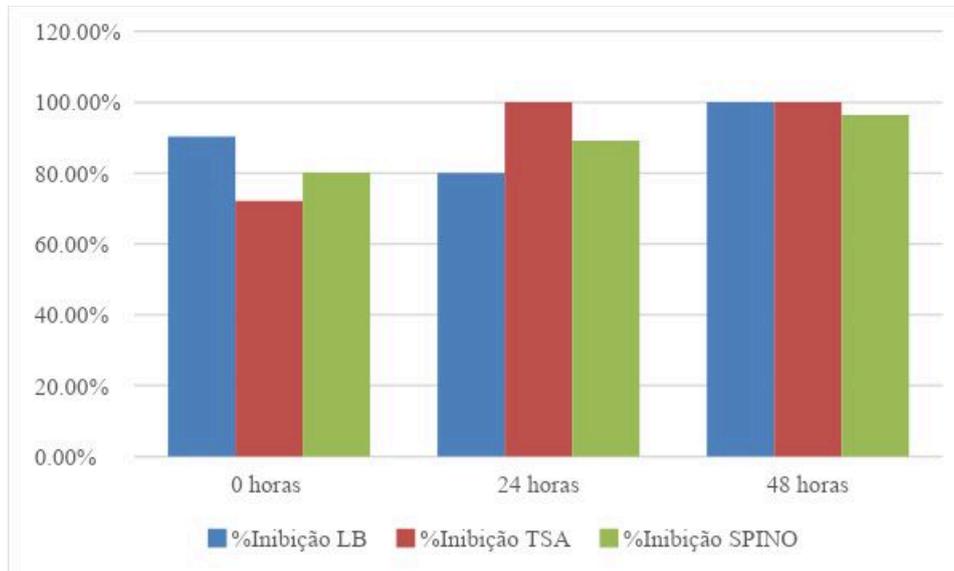


Na segunda amostra, as bactérias obtidas através da flor em meio LB, apresentaram uma alta porcentagem de inibição desde o início do experimento, com 90,3% de inibição às 0 horas, no intervalo de 24 horas teve uma redução na sua eficácia para 80% e no intervalo de 48 horas teve um aumento para 100% de inibição (Figura 7).

Em meio TSA da segunda amostra, a bactéria apresentou uma menor porcentagem de inibição inicial, com 72,10% às 0 horas, mas alcançou 100% de inibição tanto no intervalo de 24 horas quanto às 48 horas (Figura 7).

Em relação ao meio Spino da segunda amostra, a porcentagem de inibição sobre o fungo foi bastante consistente ao longo do tempo, começando com 80,1% às 0 horas e aumentando para 89,2% no intervalo de 24 horas e continuou aumentando a porcentagem de inibição 96,4% no intervalo de 48 horas (Figura 7).

Figura 7 - porcentagem de inibição bacteriana da flor da segunda amostra.

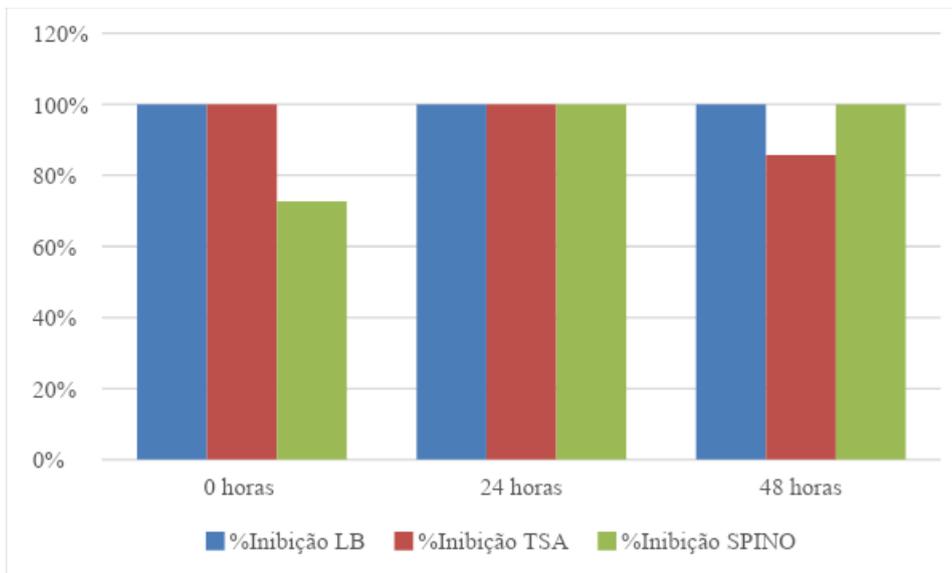


Com relação ao meio LB da segunda amostra, a bactéria demonstrou uma taxa de inibição de 100% em todos os períodos testados, indicando uma inibição completa desde o início do experimento até o final (Figura 8).

Quanto ao meio TSA, a bactéria também apresentou uma alta taxa de inibição desde o início, com 100% de inibição no intervalo de 0 horas e 24 horas. No entanto, houve uma redução na taxa de inibição para 85,7% no intervalo de 48 horas (Figura 8).

No meio Spino da segunda amostra, a bactéria exibiu uma porcentagem de inibição menor no intervalo de 0 horas, com 73%. No entanto, essa taxa aumentou para 100% tanto no intervalo de 24 horas quanto às 48 horas, indicando uma inibição completa após um período de exposição mais longo (Figura 8).

Figura 8 - Porcentagem de inibição bacteriana do pedúnculo da segunda amostra.

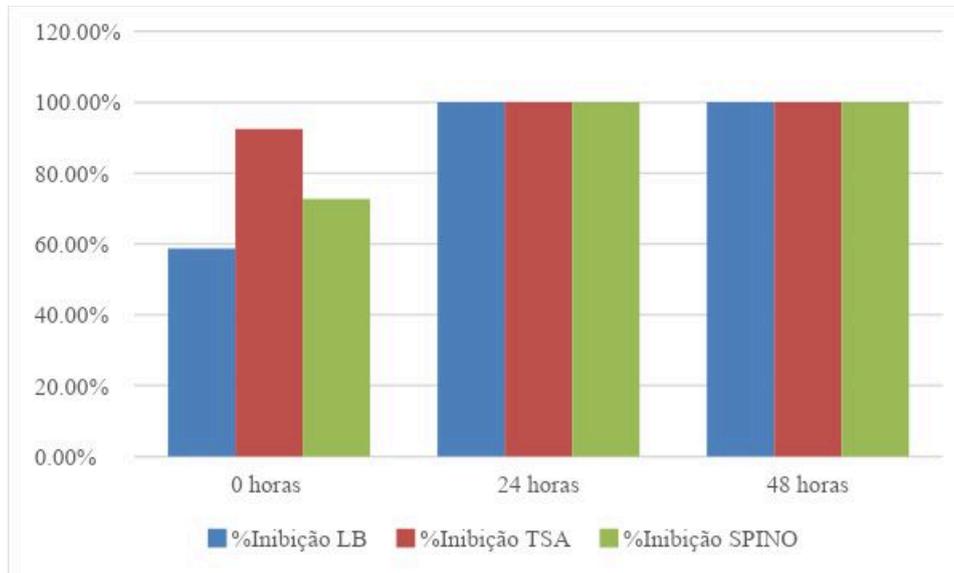


Em referência ao meio LB, na segunda amostra, as bactérias adquiridas na haste indicaram um valor inicial de inibição de 58,7% no intervalo de 0 horas, a qual aumentou para 100% no intervalo de 24 horas e permaneceu em 100% no intervalo de 48 horas (Figura 9).

Sobre o meio TSA, as bactérias obtidas da haste na segunda amostra, apresentaram uma taxa de inibição elevada desde o início do experimento, com 92,40% de inibição no intervalo de 0 horas, atingindo 100% tanto no intervalo de 24 horas quanto o de 48 horas (Figura 9).

No que se refere ao meio Spino, a bactéria obtida da haste, expôs uma porcentagem inicial de inibição de 72,7% no intervalo de 0 horas, a qual aumentou para 100% no intervalo de 24 horas e permaneceu em 100% no intervalo de 48 horas (Figura 9).

Figura 9 - Porcentagem de inibição bacteriana da haste da segunda amostra.



Durante as avaliações das amostras do experimento, notou-se que a bactéria apresentou dificuldade em se desenvolver no meio de cultura BDA. Essa observação levou à decisão de descartar o meio ao longo do experimento. De acordo com Cattelan (1999), estudos anteriores destacaram que o BDA favorece mais o crescimento dos fungos em comparação com as bactérias.

5. DISCUSSÃO

Os resultados mostram que as bactérias obtidas das amostras da flor completa, pedúnculo floral e haste, os dois materiais avaliados (amostra de laranjeiras e amostra de tangerineiras) obtiveram potencialidade na inibição de crescimento do fungo, tendo uma maior eficiência quando colocado o *Colletotrichum* após 24 horas a inoculação da bactéria na placa de Petri com em todos os meio de cultura avaliados. Isso mostra que possivelmente a colônia de bactérias produziu toxinas que inibiram o fungo com maior eficiência. Silva *et al.* (2021) também avaliou bactérias inibitórias sobre crescimento de *Fusarium decemcellulare* e *Colletotrichum gloeosporioides in vitro*. Das bactérias testadas, duas mostraram-se mais eficazes, com potencial para inibir ambos os patógenos. Suryanto *et al.* (2014) ao aplicar bactérias quitinolíticas nas folhas de cacau como medida preventiva contra o *Colletotrichum gloeosporioides*, observou diminuição na gravidade da doença. Isso se deve ao antagonismo das bactérias quitinolíticas com os fungos, proporcionando uma redução eficaz da incidência da doença.

Os tratamentos de 0 horas apresentaram menor eficácia, podendo supor que ao inocular a bactéria no mesmo momento que o fungo, a bactéria não tem tempo suficiente para produzir toxinas que consigam ter porcentagem de inibição maiores como a de 24 horas. Quando comparado os resultados da primeira amostra (laranja pera) com a segunda amostra (tangerina cravo) a segunda amostra mostrou melhores resultados de inibição. Silva *et al.* (2006), em experimento realizado com filtrados de bactérias obteve atividade antifúngica, inibindo o crescimento micelial da maioria dos isolados de *Colletotrichum* testados, mas nenhum conseguiu inibir completamente o patógeno. A presença de substâncias ativas nos filtrados foi indicada pela inibição do crescimento micelial de *Colletotrichum* spp. Além disso, Fularani *et al.* (2007) ao utilizar isolados bacterianos de *Bacillus* spp. demonstrou que os isolados têm a capacidade de inibir o crescimento de *Colletotrichum acutatum*. sendo que não houve diferença significativa no crescimento do fungo na presença dos diferentes isolados.

No intervalo de 48 horas foi observado um resultado satisfatório de inibição, porém quando comparado com o de intervalo de 24 horas notou-se que a eficiência da bactéria tem uma leve diminuição de inibição, isso fica mais explícito na primeira amostra (laranja pera). Já na segunda amostra (tangerina cravo) ocorre a diminuição apenas em dois casos sendo eles a flor no meio de cultura Spino, e o pedúnculo no meio de cultura TSA.

Ao comparar os resultados da primeira amostra (laranja pera) e da segunda amostra (tangerina cravo) podemos perceber que ambos tiveram eficácia na inibição da bactéria sobre o *Colletotrichum*, mas tiveram resultados diferente quando comparados. Uma vez que a segunda amostra teve resultados melhores com maiores porcentagens de inibição que a primeira amostra, portanto, os resultados indicam que as bactérias obtidas do segundo material vegetal possuem um potencial maior para o controle do crescimento fúngico em comparação com as bactérias do primeiro material vegetal, evidenciando a importância do tipo de material vegetal na eficácia do controle biológico realizado pelas bactérias.

6. CONCLUSÃO

Diante do exposto, de forma geral, as maiores inibições foram detectadas quando as bactérias foram inoculadas 24 horas antes do fungo. Essa eficácia pode ser atribuída à produção de toxinas pelas bactérias, que demonstraram uma atividade antifúngica significativa. O isolado de bactérias da amostra de tangerineira, proporcionou maior porcentagem de inibição em comparação com o isolado de bactérias de laranjeira, isso sugere que o tipo de material vegetal utilizado influencia na eficácia do controle biológico realizado pelas bactérias.

REFERÊNCIAS

ARAÚJO, C.S. *Et al.* **Caracterização fitoquímica dos extratos das folhas de *Annona muricata* L. (graviola) e avaliação fungicida frente ao fitopatógeno *Colletotrichum gossypii***, 2015. 65 p. Monografia (Curso de Ciências Naturais, Química) - Unifesspa, Marabá, 2015.

PHAMPHILE *et al.* **Aplicação biotecnológicas de metabólitos secundários extraídos de fungos endofíticos: O caso do *Colletotrichum sp.***, 2017. 113-119 p. Disponível em: <file:///C:/Users/irlan/Downloads/admin,+Gerente+da+revista,+2.pdf>. Acesso em: 24 dez. 2023.

CARBONI R. C. D. **Complexos de espécies de *Colletotrichum* associados aos citros e a outras frutíferas no Brasil**, 2018. 107 f. Tese (Doutorado) Faculdade de Agronomia, Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2018. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/server/api/core/bitstreams/fe9c4389-93ee-4dee-b557-ac064b7e50b1/content>. Acesso em: 27 dez. 2023.

CATTELAN, A. J. **Métodos Qualitativos para Determinação de Características Bioquímicas e Fisiológicas Associadas com Bactérias Promotoras do Crescimento Vegetal**. Londrina: Embrapa, 36 p. 1999.

ROSSETTI, V. **Clorose variegada dos citros – Revisão**. Sao Paulo, 2017. Disponível em: <https://www.citrusrt.ccsm.br/article/5964e24e0e88254231082b3a/pdf/citrusrt-32-1-61.pdf>. Acesso em: 16 fev. 2024.

DOCEMA, M. L. **Desafio de laranjeiras doces geneticamente modificadas à infecção por *Candidatus Liberibacter asiaticus* e *Xanthomonas citri* subsp. *citri***. 2021. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2021. doi:10.11606/T.11.2021.tde-27052021-180148. Acesso em: 2024-03-22.

DOMICIANO, M. F. L. **Controle alternativo da antracnose na pimenta (*Capsicum spp.*) causada por fungo do gênero *Colletotrichum gloeosporioides***. 2019. 29 p. Monografia (Curso de Agronomia), Campus Monte Carmelo, da Universidade Federal de Uberlândia, Monte Carmelo, 2019. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/29041/3/ControleAlternativoAntracnose.pdf>. Acesso em: 23 dez. 2023.

FERREIRA A. F. *et al.* Atividade de células, filtrado e autoclavado de *Bacillus* spp. como bioagentes de controle de *Colletotrichum acutatum* **Científica**, Dracena, SP, v. 35, n. 2, p. 196–200, 2009. Disponível em: <https://cientifica.dracena.unesp.br/index.php/cientifica/article/view/199>. Acesso em: 22 mar. 2024.

GAMA, A. B. **Podridão floral dos citros: definição do limiar de ação para controle químico e monitoramento da sensibilidade de isolados a tebuconazol e trifloxistrobina**. 2017. 100 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2017.

CORRÊA, F. E. **Viabilidade prática de *Bacillus subtilis* para controle biológico de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos**. 2010. 57 p. Dissertação (Mestrado) - Curso de Agroecologia, Universidade Federal de São Carlos, Araras, 2010. <https://repositorio.ufscar.br/bitstream/handle/ufscar/90/3083.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 18 fev. 2024.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Levantamento sistematico da Produção Agrícola: pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil – LSPA**. Rio de Janeiro, v.30, n.1, p.1-81. 2017.

KAMEI, S. H. *et al.* Identificação e caracterização de espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose de anonáceas no estado de Alagoas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, [S.L.], v. 36, n. 1, p. 209-216, 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-29452014000500025>.

LARANJEIRA, F. F. *et al.* Dinâmica espacial da clorose variegada dos citros em três regiões do Estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, [S.L.], v. 29, n. 1, p. 56-65, fev. 2004. <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-41582004000100009>.

ANA, C. O. S. *et al.* Mancha preta dos citros: Epidemiologia e manejo. **Citrus Research & Technology**, v. 30, n. 1-2, p. 45-64, 2017. <http://www.citrusrt.periodikos.com.br/article/59a41df20e88257b6279dc99/pdf/citrusrt-30-1-2-45.pdf>. Acesso em: 16 fev. 2024.

MASCARO, F. A. **Avaliação de produtos comerciais à base de *Bacillus* spp. para o controle da podridão floral dos citros**. 2021. 33 p. Dissertação (Mestrado) - Curso de Fitossanidade dos Citros, Fundo de Defesa da Citricultura, Araraquara, 2021.

NASCIMENTO, E. T. *et al.* Diversidade de abelhas visitantes das flores de Citrus em pomares de laranjeira e tangerineira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 1, p. 111-117, 6 maio 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-29452011005000048>.

PURIĆ, J. **Fungos de sedimentos marinhos da Antártica: Produção de metabólitos secundários e avaliação da atividade contra espécies de Xanthomonas**. 2018. 63 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) - Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Instituto de Biociências, Unesp, Rio Claro, 2018. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/153548>.

RODRIGUEZ, G. M. **Pulverização eletrostática de mistura fungicida para o controle da podridão floral dos citros**. 2016. 42 p. Dissertação (Mestrado) - Curso de Controle de Doenças e Pragas dos Citros, Fundo de Defesa da Citricultura, Araraquara, 2016.

RIBEIRO, L. F. *et al.* Efeito inibitório de extratos vegetais sobre *Colletotrichum gloeosporioides* - agente causal da podridão de frutos de mamoeiro. **Scientia Agricola**, v. 56, n. 4, p. 1267-1271, 1999. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-90161999000500031>.

SALGADO, G. H. S. S. **SENSIBILIDADE in vitro DE *Colletotrichum* spp. ASSOCIADOS A *Citrus sinensis* A FUNGICIDAS TRIAZOIS (DMI) E SUAS COMBINAÇÕES ÀS ESTROBILURINAS**. 2021. 57 p. Dissertação (Mestrado) - Curso de Genética e Melhoramento de Plantas, Unesp, Jaboticabal, 2021.

SANTOS, A. B. P. *et al.* **CONTROLE BIOLÓGICO DE PRAGAS NA LARANJA**. 2021. 38 p. TCC (Graduação) - Curso de Técnico Agropecuário, Etec Frei Arnaldo Maria de Itaporanga, Votuporanga, 2021. Disponível em: <https://ric.cps.sp.gov.br/bitstream/123456789/7789/3/Controle%20biol%C3%B3gico%20de%20pragas%20na%20laranja.pdf>. Acesso em: 20 dez. 2023.

SILVA, A. S. Inibição do crescimento micelial de *Colletotrichum* spp. Causado por filtrados de bactérias com potencial biocontrolador. I In: **XV CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA. VIII Encontro de Pós-Graduação**. 2006. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Moura-Andrea/publication/267236017_INIBICAO_D_O_CRESCIMENTO_MICELIAL_DE_Colletotrichum_spp_CAUSADO_POR_FILTRADOS_DE_BACTERIAS_COM_POTENCIAL_BIOCONTROLADOR/links/

551d5f2e0cf252bc3a87a752/INIBICAO-DO-CRESCIMENTO-MICELIAL-DE-Colletotrichum-spp-CAUSADO-POR-FILTRADOS-DE-BACTERIAS-COM-POTENCIAL-BIOCONTROLADOR.

SILVA, D. S. *et al.* Avaliação do efeito espacial na produção do milho no sertão sergipano/Spatial Effect Assessment on Maize Production in the Sergipe's Backwoods. **Brazilian Journal of Development**, Sergipe, v. 5, n. 10, p. 20677–20701, 2019. Disponível em: <https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BRJD/article/view/3963>.

SILVA JUNIOR, G. J. **Podridão floral dos citros: dinâmicas temporal e espacial, sensibilidade de *Colletotrichum acutatum* a fungicidas e controle da doença**. 2011. 133 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Curso de Fitopatologia, Esalq, Piracicaba, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.11606/T.11.2011.tde-13092011-095157>.

SILVA, M. C. S. **Bioprospecção e caracterização de microrganismos endofíticos de isolados de sementes de guaranazeiro e o controle da antracnose (*Colletotrichum spp.*)**. 2015. 78 p. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biologia na Agricultura e no Ambiente, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015. Disponível em: https://teses.usp.br/teses/disponiveis/64/64133/tde-05052015-095919/publico/MariaCarolinadosSantoseSilva_Original.

TAROCO, H. A. *et al.* Utilização de bactérias nom controle de fungos fitopatogênicos de importância econômica. **BIOLOGIA: ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO-UMA ABORDAGEM DO CONHECIMENTO CIENTÍFICO NAS DIFERENTES ESFERAS DO SABER**, v. 1, n. 1, p. 199-205, 2021.

THEODORO, G. F. A podridão floral dos citros na região Oeste do Estado de Santa Catarina. 16. ed. Santa Catarina: **Epagri**. Santa Catarina, 3 p. 2003. Disponível em: <https://publicacoes.epagri.sc.gov.br/rac/article/view/1079>.

TORESAN, L. *et al.* Indicadores de desempenho da agropecuária e do agronegócio de Santa Catarina: 2021 e 2022. **Epagri**. Florianópolis, n. 213, 38 p. 2023.

VIDAL, M. F. Produção de laranja na área de atuação do BNB. **Banco do Nordeste do Brasil**, Sergipe, n. 198. 2021. Disponível em: <s1dsp01.dmz.bnb:8443/s482-dspace/handle/123456789/1041.com>. Acesso em: 16 fev. 2024.