



SELEÇÃO DE ACTNOBACTÉRIAS PARA O BIOCONTROLE DE *Guignardia citricarpa* EM CITROS.

MARIA CAROLINA BUENO AYRES¹; KÁTIA CRISTINA KUPPER²

Nº 13124

RESUMO

Este estudo teve por objetivo selecionar e avaliar o potencial antagônico de isolados de actinomicetos obtidos de diferentes regiões do Estado de São Paulo. Foram obtidos 13 isolados, os quais foram submetidos à avaliação da atividade antagônica e a produção de metabólitos voláteis, termoestáveis e livres de células que pudessem interferir no desenvolvimento da colônia do fungo *Phyllosticta citricarpa*, agente causal da mancha preta dos citros. No pareamento, fungo e cada um dos isolados de actinomicetos foram cultivados simultaneamente, assim como para o teste de produção de compostos voláteis, porém, utilizando placas de Petri bipartidas. Para a produção de compostos termoestáveis e livres de células, uma alíquota de meio cultivado com a bactéria foi adicionada ao meio de cultura e submetido à autoclavagem. Outra alíquota foi filtrada em membrana millipore e adicionada ao meio fundente. Após vertidos e solidificados os meios, discos do patógeno foram transferidos para o centro das placas e, após incubação realizou-se a medição das colônias do fungo em dois sentidos perpendiculares. No pareamento, a maioria dos isolados de actinomicetos testados inibiu, significativamente, a colônia de *P. citricarpa*. Quanto à produção de metabólitos voláteis, termoestáveis e livres de células, com exceção do isolado ACT-14, os demais produziram compostos que favoreceram o desenvolvimento do fitopatógeno em meio de cultura. Portanto, conclui-se que o isolado ACT-14 apresenta-se como um forte candidato a um agente de controle biológico contra *P. citricarpa*.

Palavra-chave: *Phyllosticta citricarpa*, mancha preta dos citros, controle biológico.

¹ Bolsista CNPq: Graduação em Licenciatura em Ciências Biológicas, UFSCar-CCA, Araras-SP, buenoayris@hotmail.com.

² Orientadora: Pesquisadora, Centro Apta de Citros "Sylvio Moreira"/ IAC, Cordeirópolis-SP.



ABSTRACT

This study aimed to select and evaluate the potential antagonistic actinomycete isolates obtained from different regions of the state of São Paulo. 13 isolates were obtained, which were evaluated for their antagonistic activity and production of volatile metabolites, thermostable and free cells that could interfere with the development of the colony of *Phyllosticta citricarpa*, causal agent of citrus black spot. In the dual culture the fungus and each actinomycete isolates were grown simultaneously as well as to production of volatile compounds, however in this test was used Petri dishes bipartite. For the production of thermostable compounds, and free of cells, an aliquot of the cultured medium with the bacterium was added to the culture medium and it was autoclaved. Another aliquot was filtered through a millipore membrane and added to the medium. After the solidification, discs of pathogen were transferred to the center of Petri dishes and, after incubation the measurement of fungal colonies were made in two perpendicular directions. In dual culture, most isolates of actinomycetes tested inhibited significantly the colony of *P. citricarpa*. Regarding the production of volatile metabolites, thermostable and cell-free, with exception of isolated ACT-14, all isolates produced compounds that favored the development of the pathogen. Therefore, it is concluded that the isolated ACT-14 presents itself as a strong candidate for a biological control agent against *P. citricarpa*.

INTRODUÇÃO

Não obstante a importância que a atividade citrícola tem para a economia nacional, os pomares são acometidos por uma série de pragas e doenças que são responsáveis por reduções consideráveis na produtividade e na qualidade das frutas, tornando-se, em muitos casos, fatores limitantes ao processo de produção. Dentre as doenças, pode-se destacar a mancha preta dos citros (MPC), causada por *Phyllosticta citricarpa* Kiely, cuja forma perfeita (teleomorfa) corresponde a *Guignardia citricarpa*.

Atualmente, o uso de produtos químicos é a principal medida de controle da doença. O controle baseia-se principalmente, na utilização de fungicidas protetores ou sistêmicos, isoladamente ou combinados, associados ou não a óleo mineral (Goes, 1998). Considerando-se as características biológicas do fitopatógeno, os custos financeiros, ambientais e de saúde pública das aplicações dos produtos químicos para o controle da MPC, faz-se necessário o estudo de novas alternativas para o controle da doença e, dentre essas, encontra-se o controle biológico. Trabalhos encontrados na literatura demonstram a potencialidade de actinomicetos para o biocontrole de

vários fitopatógenos (Bressan & Figueiredo, 2003; Minuto et al., 2006; Carrer Filho et al., 2008). Porém, poucos estudos utilizando esses antagonistas estão sendo realizados em citros.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi selecionar isolado de actinomicetos, de diferentes regiões do Estado de São Paulo, avaliando o potencial antagônico destes microrganismos pela técnica de cultivo pareado e pela produção de compostos anti-fúngicos no crescimento micelial de *Phyllosticta citricarpa*.

MATERIAL E MÉTODOS

Seleção, isolamento e preservação de actinomicetos.

Isolados de actinomicetos foram obtidos a partir de amostras de solo da rizosfera e do rizoplano de plantas cítricas de diferentes municípios do Estado de São Paulo. Os isolamentos foram efetuados através de plaqueamento de suspensões de solo ou de raízes diluídas em serie na razão de 1:10 (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4}), a partir de uma suspensão preparada, agitando-se manualmente 1 grama de solo ou de raiz em 9 ml de solução salina (0,85%). 0,2 ml das diluições 10^{-3} e 10^{-4} obtidas da rizosfera e do rizoplano foram plaqueadas em meio seletivo Agar-glicerina-asparaginato (AGS) para actinomicetos. Os isolados de actinomicetos obtidos foram purificados e conservados em tubos de ensaio contendo o mesmo meio.

Efeito dos isolados de actinomicetos no crescimento micelial de Phyllosticta citricarpa.

Para estudar o efeito antagônico dos isolados de *actinomicetos* no crescimento micelial de fitopatógeno, foi utilizada a técnica de cultivo pareado em placa de Petri, contendo BDA (Dennis & Webster, 1971). Testemunhas foram preparadas sem os antagonistas, apenas com o crescimento do fitopatógeno.

Produção de compostos voláteis pelos isolados de actinomicetos

Para este estudo placas de Petri com divisórias, contendo meio de cultura AGS (para cultivo de actinomicetos) e BDA (para cultivo de *P. citricarpa*), foram utilizadas para se verificar a produção de compostos voláteis pelos antagonistas. Discos (5 mm) de meio mais microrganismos retirados de colônias ativas de cada isolado de actinomicetos e de *P. citricarpa* foram repicados simultaneamente sobre os meios de



cultura. O tratamento testemunha correspondeu ao cultivo do fungo na placa sem o cultivo do isolado de actinomiceto.

Produção de compostos termoestáveis pelos isolados de actinomicetos

Para cada isolado de actinomiceto foi utilizado um Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio AGS. Três discos de meio com crescimento ativo de cada um dos isolados de actinomicetos foram adicionados aos frascos. Em seguida, as culturas foram incubadas em condições ambiente de laboratório por 72 horas, sob agitação constante, no escuro. Posteriormente, uma alíquota de 10 mL da suspensão foi transferida para frascos de Erlenmeyer contendo 90 mL de BDA, os quais foram submetidos à autoclavagem por 20 minutos, a 120°C e 1 atm de pressão. Os meios foram vertidos para placas de Petri e discos (5 mm de diâmetro), obtidos de colônias ativas de *P. citricarpa* (8 dias de idade) foram transferidos para os centros das mesmas. As testemunhas foram constituídas de placas contendo o fitopatógeno nos meios de cultura, sem a presença de metabólitos.

Produção de compostos livres de células pelos isolados de actinomicetos

Para cada isolado de actinomiceto, foi utilizado um Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio líquido à base de ágar-glicerina-asparaginato (AGS). Três discos de meio com crescimento de actinomicetos foram colocados em cada frasco e incubados em condições de laboratório por 72 horas, sob agitação constante, no escuro. Os caldos fermentados foram centrifugados e, em seguida, submetidos à filtração em membrana millipore (0,22 µm). Amostras de 10 mL de cada filtrado foram transferidas para frascos com 90 mL de BDA fundente. Os meios foram vertidos para placas de Petri e, após a solidificação, um disco (5 mm) do patógeno transferido para o centro das placas. As testemunhas foram constituídas do cultivo do patógeno nos meios de cultura, sem a presença dos metabólitos.

Para todos os ensaios, as culturas foram incubadas em estufa para B.O.D a 27°C durante 10 dias. As avaliações constaram de medições das colônias do fitopatógeno em dois sentidos perpendiculares e de delineamento inteiramente casualizado com 5 repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Seleção e isolamento de actinomicetos.

Ao todo foram obtidos 13 isolados de actinomicetos a partir de amostras de solo do rizoplane e da rizosfera de plantas cítricas de diferentes procedências do Estado de São Paulo (Tabela 1). A seleção de antagonistas baseia-se na evidência de que os microrganismos selecionados possam interferir de alguma forma no desenvolvimento do fitopatógeno. Segundo Rubini et al. (2005), tal interferência implica na destruição ou inibição da colônia do patógeno. Após o isolamento e seleção dos microrganismos candidatos o próximo caminho seria a utilização como agente de biocontrole por meio de pulverizações na parte aérea das plantas cítricas visando o biocontrole de *P. citricarpa*.

Efeito dos isolados de actinomicetos no crescimento micelial de Phyllosticta citricarpa

Os resultados obtidos indicaram que a maioria dos isolados de actinomicetos testados inibiu, significativamente, a colônia de *P. citricarpa*. Dentre os 04 isolados que apresentaram mais de 30% de inibição encontra-se o ACT-07 que causou a maior inibição (35%) da colônia do fungo (Tabela 2). Dados semelhantes foram obtidos por outros autores. Cepas de actinomicetos, do gênero *Streptomyces*, quando testadas *in vitro*, têm apresentado potencial para a produção de antibióticos que reduzem ou inibem o crescimento de fitopatógenos (Bressan & Figueiredo, 2003; Kumari et al., 2006).

3. Produção de compostos anti-fúngicos pelos isolados de actinobactérias

3.1. Produção de compostos voláteis

Todos os isolados de actinomicetos produziram metabólitos voláteis que favoreceram o desenvolvimento da colônia do fitopatógeno (Tabela 3).

3.2. Produção de compostos antifúngicos termoestáveis

Com relação à produção de compostos anti-fúngicos termoestáveis pelos isolados de actinomicetos verificou-se que, todos produziram substâncias que favoreceram o crescimento da colônia do fitopatógeno (Tabela 3).

Tabela 1: Número de isolados e procedência de isolados de actinomicetos obtidos de diferentes municípios do Estado de São Paulo.

Número do isolado	Município
ACT-01	Tambaú
ACT-02	Santa Rita do Passa Quatro
ACT-03	Santa Rita do Passa Quatro
ACT-04	Santa Rita do Passa Quatro
ACT-05	Santa Rita do Passa Quatro
ACT-06	Paranapanema
ACT-07	Catanduva
ACT-08	Cordeirópolis
ACT-10	Jaboticabal
ACT-11	Descalvado
ACT-14	Jaboticabal
ACT-15	Jaboticabal
ACT-16	Jaboticabal

Tabela 2. Porcentagem de inibição da colônia de *Phyllosticta citricarpa* após cultivo pareado com diferentes isolados de actinomicetos.

Tratamento	Média da colônia	% de inibição da colônia
Testemunha	6,68 a	-
ACT-01	6,31 abc	5,53
ACT-02	4,86 ef	27,24
ACT-03	4,54 ef	32,03
ACT-04	5,14 bcdef	23,05
ACT-05	6,12 abcd	8,38
ACT-06	5,08 cdef	23,95
ACT-07	4,32 f	35,32
ACT-08	4,61 ef	30,98
ACT-10	5,67 abcde	15,11
ACT-11	5,14 bcdef	23,05
ACT-14	6,34 ab	5,08
ACT-15	5,06 def	24,25
ACT-16	4,54 ef	32,03

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 3. Influência de metabólitos voláteis e termoestáveis produzidos pelos isolados de actinomicetos, no desenvolvimento na colônia de *Phyllosticta citricarpa*.

Tratamento	metabólitos voláteis	metabólitos termoestáveis
	Diâmetro médio da colônia de <i>P. citricarpa</i>	Diâmetro médio da colônia de <i>P. citricarpa</i>
Testemunha	5,18 c	3,01 c
ACT-01	5,28 bc	3,65 ab
ACT-02	5,24 bc	3,89 ab
ACT-03	5,32 bc	3,68 ab
ACT-04	5,56 ab	3,72 ab
ACT-05	5,40 abc	3,57 b
ACT-06	5,48 abc	3,68 ab
ACT-07	5,38 abc	3,82 ab
ACT-08	5,56 ab	3,60 b
ACT-10	5,44 abc	3,85 ab
ACT-11	5,55 ab	3,62 ab
ACT-14	5,70 a	4,02 a
ACT-15	5,49 abc	3,61 ab
ACT-16	5,33 bc	3,77 ab

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3.3. Produção de compostos antifúngicos livres de células do antagonista

De acordo com os dados apresentados na Tabela 4, observou-se que o isolado ACT-14 foi o único que apresentou produção de compostos anti-fúngicos livres de células e, em quantidades suficientes para afetar o crescimento de *P. citricarpa*, com porcentagem de inibição da colônia do patógeno em torno de 21%.

A produção de substância anti-fúngica pelo isolado ACT-14 a coloca como uma forte candidata como um agente de controle biológico para o controle de *P. citricarpa* e para a produção de um bioproduto para controle da doença.

Tabela 4. Influência de metabólitos livres de células, produzidos pelos isolados de actinomicetos, no desenvolvimento na colônia de *Phyllosticta citricarpa*.

Tratamento	Média da colônia
Testemunha	4,41 cd
ACT-01	7,00 a
ACT-02	6,16 abc
ACT-03	6,67 ab
ACT-04	5,89 abc
ACT-05	6,23 abc



Continua...

ACT-06	6,23 abc
ACT-07	5,54 abc
ACT-08	6,25 abc
ACT-10	6,77 ab
ACT-11	5,36 abcd
ACT-14	3,48 d
ACT-15	4,84 bcd
ACT-16	5,14 abcd

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

CONCLUSÃO

Através dos resultados obtidos neste estudo foi possível concluir que o isolado ACT-14 apresenta-se como um forte candidato a um agente de controle biológico contra *P. citricarpa*.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq – PIBIC, pela bolsa concedida.

Ao Instituto Agronômico de Campinas – Centro Apta de Citros “Sylvio Moreira”/IAC, pela oportunidade de estágio.

REFERÊNCIAS

- Bressan, W.; Figueiredo, J.E.F. Controle de *Fusarium moniliforme* em sementes de milho por actinomicetos, Sete Lagoas: Comunicado Técnico EMBRAPA, 2003. 4 p.
- Carrer Filho, R.; Romeiro, R.S.; Garcia, F.A.O. Biocontrole de doenças de parte aérea do tomateiro por *Nocardioides thermophilacinus*. Tropical Plant Pathology vol. 33, p.457-460, 2008.
- Dennis, C., & Webster, J. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* III. Hyphal interactions. Trans. Br. Mycol. Soc., v. 57, p.359-363, 1971.
- Goes, A. Controle da mancha preta dos frutos cítricos. Laranja, Cordeirópolis, v. 19, 305-320, 1998.
- Kumari, K.K.; Ponmurugan, P.; Kannan, N. Isolation and characterization of *Streptomyces* sp. from soil samples for secondary metabolite production. Biotechnology, v. 5, p.478-480, 2006.
- Minuto, A.; Spadaro, D.; Garibaldi, A.; Gullino, M.L. Control of soilborne pathogens of tomato using a commercial formulation of *Streptomyces griseoviridis* and solarization. Crop Protection p.468–475, 2006.
- Rubini, M.R.; Silva-Ribeiro, R.T.; Pomella, A.W.V.; Maki, C.S.; Araújo, W.L.; Santos, D.R.; Azevedo, J.L. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicioso*, causal agent of Witches' Broom Disease. International Journal Biology Science, v.1, p.24-33, 2005.