



UNIVERSIDADE DO NORTE DO PARANÁ
CAMPUS LUIZ MENEGHEL
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

PEDRO FRANCISCO DA SILVEIRA REIS

CONTROLE DO CANCRO CÍTRICO PELO USO DE
BIOFERTILIZANTE

BANDEIRANTES, PR
2018

PEDRO FRANCISCO DA SILVEIRA REIS

**CONTROLE DO CANCRO CÍTRICO PELO USO DE
BIOFERTILIZANTE**

Dissertação apresentada ao
Programa de Mestrado em Agronomia, da
Universidade Estadual do Norte do Paraná,
Campus Luiz Meneghel.

Orientadora: Prof^a. Dra. Aline
Vanessa Sauer

BANDEIRANTES, PR, BRASIL
2018

Ficha catalográfica elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UENP

Reis, Pedro Francisco da Silveira
CONTROLE DO CANCRO CÍTRICO PELO USO DE

BIOFERTILIZANTE / Pedro Francisco da
Silveira Reis; orientador Aline Vanessa Sauer -
Bandeirantes, 2018. 56 p.

Agronomia - Universidade Estadual do Norte do
Paraná, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós
Graduação em Agronomia, 2018.

PEDRO FRANCISCO DA SILVEIRA REIS

**CONTROLE DO CANCRO CÍTRICO PELO USO DE
BIOFERTILIZANTE**

Dissertação apresentada ao
Programa de Mestrado em Agronomia, da
Universidade Estadual do Norte do Paraná,
Campus Luiz Meneghel.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Aline Vanessa Sauer UNOPAR/UENP

Prof. Dr. Leopoldo Sussumu Matsumoto UENP

Prof. Dr. Helio Hiroshi Suguimoto UNOPAR

Prof^ª. Dr^ª. Mayra Costa da Cruz Gallo de Carvalho (Suplente) UENP

Prof^ª. Dr^ª. Karina Aline Alves (Suplente) UNOPAR

Aprovado em: 18/07/2018

Prof^ª. Dr^ª. Aline Vanessa Sauer

Orientadora

Universidade Estadual do Norte do Paraná,

Campus Luiz Meneghel

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado a vida e com ela me permitir sonhar, caminhar, lutar e acreditar de que sou capaz de conquistar meus sonhos e objetivos.

Aos meus pais e professores e doutores Luiz Carlos Reis e Teresinha Esteves da Silveira Reis, por minha formação social e educacional, por sempre acreditarem no meu potencial como Engenheiro Agrônomo. Por todo investimento em meus estudos, por serem meu espelho, por serem a minha fonte de inspiração por essa profissão... dedico este título de mestre a vocês.

Aos meus irmãos João Luis Silveira Reis e Amanda da Silveira Reis, que além de irmãos, são meus grandes amigos, por sempre estarem do meu lado com conselhos e amor verdadeiro.

A minha vó Flausina Gonçalves dos Reis (*in memorian*), na qual presto homenagem todos os dias da minha vida mesmo não estando mais presente, por ter sido uma pessoa fundamental na minha formação como homem.

A professora Dr^a. Aline Vanessa Sauer, que tive o privilégio de ter sido orientado, agradeço pela sua orientação, paciência, amizade e por todo seu conhecimento passado, com certeza levarei comigo todo esse aprendizado.

Ao professor Dr. Leopoldo Sussumu Matsumoto, por realizar parte do meu projeto de mestrado em seu laboratório de Microbiologia do Solo na Universidade Estadual do Norte do Paraná – UENP, pelas nossas conversas e por todo aprendizado adquirido.

Ao professor Dr. Willian Nunes e seus orientados da Universidade Estadual de Maringá, por todo auxílio no isolamento dos patógenos estudados.

Ao professor Dr. Rui Pereira Leite do Instituto Agrônomo do Paraná – IAPAR, por ter cedido os isolados estudados.

Ao professor Dr. Helio Hiroshi Suguimoto, da Universidade Pitágoras Unopar – UNOPAR, por ter realizado a microfiltração do biofertilizante estudado.

A Universidade Pitágoras Unopar – UNOPAR Bandeirantes, por ter cedido o laboratório de microbiologia para a condução do meu experimento, todos os funcionários e estagiários que me ajudaram nesse projeto.

A empresa Kórin pela concessão do biofertilizante para realização deste trabalho e pela parceria.

A prof. Dra. Karina Aline Alves pelo auxílio nas análises estatísticas.

A minha namorada Nara Rezende Fonseca, pela paciência e companheiros em todos esses anos.

Aos meus amigos de Bandeirantes-PR, presentes em diversos momentos da minha vida.

A Universidade Estadual do Norte do Paraná e todo seus professores, por todo aprendizado e pela minha formação como mestre.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior – CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

A todos que de alguma forma contribuíram para minha formação de mestre, meu muito obrigado.

CONTROLE DO CANCRO CÍTRICO PELO USO DE BIOFERTILIZANTE

RESUMO

O cancro cítrico causado pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, interfere diretamente na produção e qualidade dos frutos. Esta bactéria é capaz de infectar tecidos jovens, folhas, frutos e ramos, podendo causar necrose, desfolha e a queda prematura dos frutos. Como uma alternativa sustentável para agricultura moderna no controle de doenças em plantas, os biofertilizantes tem se destacado. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi verificar a eficiência de um biofertilizante comercial e microfiltrado no controle de cancro cítrico. Para a determinação da flora microbiana, foi obtida uma amostra ativada do produto comercial, e semeada em meios de culturas específicos e seletivos. Para análise *in vitro*, os isolados foram inoculados em placas de petriem meio de cultura Nutriente Ágar (NA) na presença do biofertilizante ativado e microfiltrado, foram avaliadas o tamanho de colônias na presença das duas composições. Em folhas destacadas foram avaliadas duas variedades de laranja doce (Folha Murcha e Pera) e o potencial do biofertilizante no controle da doença inoculada. As folhas foram desinfetadas e inoculadas por perfuração com agulha, oito perfurações por folha. Foram utilizadas quatro repetições de cada dose do biofertilizante (0, 5, 10 e 15 L ha⁻¹) e as avaliações foram realizadas aos 10, 15 e 20 dias após a inoculação pela medida do diâmetro de lesões. O teste utilizado para a comparação das médias dos parâmetros avaliados foi o de Scott Knott, ao nível de 5% de significância. Os resultados obtidos *in vitro* demonstraram menor diâmetro de UFC nas duas composições do biofertilizante (ativado e microfiltrado). Em folhas destacadas a variedade Pera demonstrou maior resistência ao patógeno. A dose comercial 10 L ha⁻¹ obteve menores médias de diâmetro nas duas composições (ativada e microfiltrada). Quanto aos dias após a inoculação, não houve aumento do tamanho das lesões nas variedades testadas, mas comparadas as duas variedades, a Pera demonstrou menores diâmetros de lesões na face adaxial conforme os dias foram aumentando.

Palavras chaves: sustentabilidade, *Xanthomonas citri*, laranja doce.

CONTROL OF CITRIC CANCER BY THE USE OF BIOFERTILIZER

ABSTRACT

Citrus canker caused by the bacterium *Xanthomonascitri* subsp. *citri*, directly interferes with fruit production and quality. This bacterium is capable of infecting young tissues, leaves, fruits and branches, which can cause necrosis, defoliation and premature fruit drop. As a sustainable alternative to modern agriculture in controlling diseases in plants, biofertilizers have stood out. In this way, the objective of this work was to verify the efficiency of a commercial and microfilteredbiofertilizer in citrus canker control. For the determination of the microbial flora, an activated sample of the commercial product was obtained, and seeded in means of specific and selective cultures. For in vitro analysis, the isolates were inoculated in Petri dishes in Agar Nutrient (NA) culture medium in the presence of the activated and microfilteredbiofertilizer, the size of colonies were evaluated in the presence of the two compositions. Two sweet orange varieties (FolhaMurcha and Pera) and the potential of the biofertilizer in the control of the inoculated disease were evaluated. The leaves were disinfected and inoculated by needle punching, eight perforations per leaf. Four replicates of each biofertilizer dose (0, 5, 10 and 15 L ha⁻¹) were used and the evaluations were performed at 10, 15 and 20 days after inoculation by measuring the lesion diameter. The test used to compare the means of the parameters evaluated was that of Scott Knott, at a level of 5% of significance. The results obtained in vitro showed a smaller diameter of CFU in the two compositions of the biofertilizer (activated and microfiltered). In leaves, the Pera variety showed greater resistance to the pathogen. The commercial dose 10L ha⁻¹ obtained smaller mean diameter in both compositions (activated and microfiltered). As for days after inoculation, there was no increase in lesion size in the tested varieties, but compared to the two varieties, Pera showed smaller diameters of lesions on the adaxial surface as the days increased.

Keywords: sustainability, *Xanthomonascitri*, sweet orange.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Isolamento do patógeno em meio de cultura Nutriente Ágar (NA).	36
Figura 2 Inoculação do patógeno em meio Nutriente Ágar (NA) para medição do diâmetro de colônias. Foto A (estirpe padrão, testemunha do isolado 306), foto B (testemunha do isolado 2), inoculação dos isolados em 5 pontos da placa.....	39
Figura 3 Folhas destacadas da variedade Pera com oito perfurações (inoculação Xcc 306) e armazenadas em tubo falcon de 50 mL, com 1,5 mL de água destilada. Figura A (folhas destacadas com 8 inoculações por agulha), Figura B (Folhas destacadas armazenadas em tubo falcon com 1,5 mL de água destilada).....	41
Figura 4 Diâmetro de colônias de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> (isolado Xcc 306) com composição do biofertilizante ativado (produto comercial) e testemunha.....	43
Figura 5 Diâmetro de lesão de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> nas faces abaxial (A) e adaxial (B) de folhas destacadas, em função da concentração e composição do biofertilizante, e da variedade de laranja doce.	46
Figura 6 Diâmetro de lesão de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> nas faces abaxial (A) e adaxial (B) de folhas destacadas, em função da concentração e composição do biofertilizante, ativado e microfiltrado, em relação as médias de diâmetro de lesão das duas variedades testadas.....	48
Figura 7 Teste de inoculação de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> em folhas destacadas da variedade Pera com aplicação do biofertilizante em dose comercial (DC) ativado (A), testemunha (B) e filtrado (C).	50
Figura 8 Diâmetro de lesão de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> na face adaxial de folhas destacadas, comparada com os dias após a inoculação de duas variedades de laranja doce (Folha Murcha e Pera)	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Meios de cultura seletivos utilizados para análise microbiana do biofertilizante.	37
Tabela 2 Análise de variância da inibição do crescimento <i>in vitro</i> de fitopatógenos na presença de biofertilizante, em função da composição do biofertilizante, ativado ou filtrado e do isolado dos patógenos.	42
Tabela 3 Diâmetro de unidade formadora de colônia (UFC), em mm, em função da composição do biofertilizante, ativado ou filtrado, no meio de cultura, <i>in vitro</i>	42
Tabela 4 Análise de variância da inibição do crescimento <i>in vivo</i> de fitopatógenos com o uso de biofertilizante, em função da composição do biofertilizante, ativado ou filtrado, sua concentração e variedade do citros.	45

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 Citricultura brasileira	14
2.2 Principais doenças da citricultura	15
2.3 Cancro Cítrico	16
2.4 Biofertilizantes para controle de doenças	19
REFERÊNCIAS	22
3 ARTIGO 1: EFICIÊNCIA DE CONTROLE DO CANCRO CÍTRICO PELO USO DE BIOFERTILIZANTE	32
3.1 RESUMO E ABSTRACT	32
3.2 Introdução	34
3.3 Materiais e Métodos	35
3.3.1 Análises <i>in vitro</i>	35
3.4 Avaliação em folhas destacadas	39
3.5 Resultados e Discussão	41
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	53
5 CONCLUSÃO	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

1 INTRODUÇÃO

A citricultura brasileira possui grande importância para economia brasileira e mundial, principalmente ao setor do agronegócio, através de suas importações e exportações (NEVES et al., 2001). A citricultura gera em torno de 230 mil posições de emprego indireta e diretamente, com taxa salarial que chega a R\$676 milhões anuais (NEVES et al., 2010). Apesar da alta capacidade de produção, as diversas doenças que acometem a cultura podem reduzir sua produtividade (ALEGRIA et al., 2005). Mesmo o Brasil sendo o maior produtor de laranja do mundo, a citricultura sofre com oscilações de ano a ano desde a safra 2000/2001, isso se deve a interações climáticas e a disseminação de doenças altamente prejudiciais à produção, como o *huanglongbing* (*greening*) e o cancro cítrico (SCHAAD et al., 2006).

O cancro cítrico é uma das principais doenças na citricultura, causando graves danos na maioria das variedades de laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck) (ANTHONI e COGGINS, 1999). A água é considerada uma das principais carreadoras da bactéria até ferimentos presentes em órgãos das plantas, causando infecções (BOCK et al., 2009), sendo também introduzida através de estômatos (GOTTWALD et al., 1992), a infecção pode ser facilitada devido aos danos causados pela larva minadora do citros (*Phyllocnist citrella*), através de galerias no mesófilo da planta (BRUNINGS; GABRIEL, 2003), podendo ocasionar desfolha da planta, seca de ramos e queda de frutos (GOTTWALD et al., 1989).

Com o avanço das práticas de manejo na agricultura, dejetos de animais confinados podem ser utilizados como material biofertilizante, dessa forma, fornecer nutrientes essenciais para as plantas e contribuir com atributos físicos, químicos e biológicos do solo melhorando sua fertilidade (HANISCH & FONSECA 2011). Devido ao fato dos biofertilizantes surgirem através da compostagem de restos orgânicos, faz com que esse tipo de prática sustentável se torne economicamente viável quando comparada aos valores de insumos, principalmente importados.

Os biofertilizantes são um complemento para controle de doenças e adubação mineral do solo, promovendo recursos de forma sustentável e estabelecendo uma melhoria na microbiota do solo (QIU et al., 2012; BHARDWAJ et al. 2014; FU et

al., 2017). Prática essa mais comum entre pequenos produtores, onde a fonte de renda na maioria das vezes não proporciona a possibilidade de investimentos maiores.

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi verificar a eficiência de um biofertilizante comercial e seus extratos no controle de cancro cítrico *in vitro* e em folhas destacadas de citros.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Citricultura brasileira

A citricultura está presente em diversas regiões do mundo, e concentra-se em regiões de clima tropical e subtropical (SENTELHAS, 2005). A safra 2015/2016 alcançou produção de 300,65 milhões de caixas de 40,8 quilos em todo estado de São Paulo e triângulo mineiro (CITRUS BR, 2016). A estimativa da safra 2016/2017 de laranja no estado de São Paulo e Minas Gerais é de 249,04 milhões de caixas (FUNDECITRUS, 2016). Estima-se ainda que a produção média entre os dois maiores estados produtores, São Paulo e Minas Gerais, mais especificamente no triângulo mineiro para a safra 2017/2018, seja de 397,27 milhões de caixas (FUNDECITRUS 2018). Com a expectativa de alcançar 1 milhão de toneladas na safra de 2017/2018 no estado do Paraná, o que significa um aumento de 33% comparado a safra anterior, produtores buscam a retomada da produtividade depois de perdas ocasionadas pela seca na safra 2016/2017 (AENPR, 2017).

Dentre as variedades predominantes de laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck) na agricultura do estado do Paraná, encontram-se: IAPAR 73, Valência, Folha Murcha e a Pêra, sendo que a última se destaca por sua grande aceitação no mercado, tanto de frutas *in natura*, como na comercialização do suco da laranja (GONÇALVES-ZULIANI, 2014). O produto com maior valorização no mercado mundial é o suco de laranja, trazendo grandes benefícios para economia brasileira, por ser o produto de maior exportação oriundo da cultura (NEVES et al., 2001). O Brasil detém cerca de 50% da produção mundial do suco de laranja, exporta 98% da sua produção e contribui em 85% no mercado mundial (NEVES et al., 2011).

Devido a alta infestação de cancro cítrico no Paraná nas décadas de 60 e 70, o estado perdeu a permissão do cultivo de citros (RINALDI, 1998). Estudos do Instituto Agrônomo do Paraná - IAPAR, na década de 80 possibilitaram a reimplantação da citricultura no estado (NUNES et al., 2010). Mesmo sendo líder no mercado cítrico, o Brasil enfrenta problemas na produção nos últimos anos. Em 2012, passou por uma de suas maiores crises, devido ao clima, doenças e mercado mundial, prejudicando a safra de 2013/2014 (CONAB, 2013).

2.2 Principais doenças da citricultura

Mesmo com alta capacidade produtiva, um dos fatores mais preocupantes é o alto índice de doenças que afetam a cultura do citros. Dentre os estados que participam diretamente sobre esse tema, o Paraná se destaca pela ocorrência em seu território de doenças como a mancha preta dos citros causada pelo fungo *Guignardiacitricarpa* (GOES e FEICHTENBERGER, 1993); clorose variegada dos citros (CVC), causada pela bactéria *Xylella fastidiosa* (NUNES et al., 2007) a qual depende de vetores para sua disseminação (GONÇALVES et al., 2008; MOLINA et al., 2010); *citrus tristeza vírus* (CTV) (CARRARO et al., 2003, COSTA et al., 2010); gomose causada por *Phytophthoraspp.* (*P. nicotianae* e *P. citrophthora*) (CAIXETA, 2013); huanglongbing (HLB) causado pela bactéria *Candidatus Liberibacter spp.* (BOVÉ et al., 1999) e o cancro cítrico causado pela bactéria *Xanthomonas citris subsp. citri*. (VARGAS et al., 2013).

A mancha preta dos citros ou também chamada de pinta preta é causada pelo fungo *Guignardiacitricarpa*, presente em todas as espécies de citros e em especial na laranja doce (GLIENKE et al. 2011), na qual tem maior relevância entre as espécies de citros no Brasil. Mais adaptada em regiões de clima ameno e úmido como Ásia, África, Oceania e Américas (KOTZÉ, 2000). Esta doença causa maiores prejuízos em frutos e os sintomas em folhas são raros, causando manchas negras na casca do fruto, podendo ocasionar a queda prematura (KOTZÉ, 2000; SPÓSITO et al., 2007).

A clorose variegada do citros, causada pela bactéria *Xylella fastidiosa*, é dependente de vetor para sua disseminação. Possui características de interação exclusiva com células do xilema da planta (ALVES et al., 2004). Seus sintomas são clorose, que se estendem por toda planta, e folhas com sintomas de deficiência de zinco, boro e potássio, apresentando frutos pequenos e sem suculência, o que os tornam impróprios para comercialização (ROSSETI; DE NEGRI, 1990). A doença pode ser transmitida através de enxertias e cigarrinhas da família *Cicadellidae* (FADEL et al., 2014).

Citrus tristeza vírus (CTV) pertencente a família *Closteroviridae* (JOSEPH et al., 1979), pode ser transmitido por enxertia do tipo borbulha e tem como principal vetor o pulgão-preto do citros (*Toxoptera citricidus*) (MULLER et al., 2005). Entre 1930 e 1940 o CTV causou grandes danos a citricultores brasileiros, devastando milhares de

plantas de porta-enxerto Laranja Azeda [*Citrus aurantium* (L.) Osbeck] suscetível a virose. Seus sintomas causam depreciação do fruto, como aumento de acidez e baixa produção de suco, além de causar atrofiamento da planta e necrose.

A gomose do citros é causada por oomicetos do gênero *Phytophthora*. Entre as décadas de 1930 e 1940 onde o porta enxerto mais utilizado foi o de laranja Azeda, tolerante a gomose, a doença ganhou força com a chegada do CTV. Ao ser substituído pelo porta-enxerto limão-cravo, o mais comum na atualidade citrícola do Brasil o problema voltou a ser recorrente por este porta-enxerto apresentar maior suscetibilidade ao patógeno (MEDINA FILHO et al. 2003). Os sintomas comuns são: senescência de tecidos da casca do caule e vasculares, que evoluem para aberturas com exsudação de goma e em caso de avanço no desenvolvimento da doença e grau mais evoluído pode causar a podridão radicular e a morte da planta (TIMER et al., 2000).

Huanglongbing (HLB) é uma doença originária da China cuja tradução do nome significa “doença do ramo amarelo”, também conhecida como *greening* (SULZBACH et al., 2017), causada pela bactéria *Candidatus Liberibacter* spp. (BOVÉ et al., 1999). No Brasil o primeiro relato registrado foi em 2004 no Estado de São Paulo (COLETTA-FILHO et al., 2004; TEIXEIRA et al., 2005), no ano seguinte em Minas Gerais (CASTRO et al., 2010) e em 2006 no Estado do Paraná (MENEGUIM et al., 2008). Considerada a doença mais severa na citricultura (RODRIGUES et al., 2016), pela dificuldade de técnicas de controle, rápida disseminação através do inseto vetor psílídeo (*Diaphorin citri* Kuwayama) e por possuir plantas hospedeiras, como a murta [*Murraya paniculata* (L.) Jack], planta de paisagismo e arborização urbana (STUCHI; GIRARDI, 2010). Os sintomas são: amarelecimento das folhas, queda de folhas e frutos, ramos secos, deficiência nutricional, maturação irregular dos frutos e queda prematura (FUNDECITRUS 2009). Pelo fato de não existir métodos de controle curativo, a técnica mais indicada para regiões que não possuem HLB, é o método de erradicação (SULZBACH et al., 2017).

2.3 Cancro Cítrico

O cancro cítrico, causado pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (SCHAAD et al., 2006) é uma doença de grande importância na maioria das regiões do mundo produtoras de citros. Em países da Europa, classifica-se a doença como “praga exótica”, dificultando as importações com várias exigências (AMARAL, 2003).

O cancro cítrico possui uma grande área de expansão. Foi detectado pela primeira vez no Sudeste Asiático onde rapidamente a doença se espalhou por vários continentes produtores de citros, com exceção do continente europeu que foi o único a não ser afetado (SCHUBERT et al., 2001; DAS, 2003).

No Brasil, a doença foi detectada em 1957 na cidade de Presidente Prudente, estado de São Paulo (BITTENCOURT, 1957). Ainda no mesmo ano foram encontrados sintomas da doença nos estados Mato Grosso do Sul e Paraná (AMARAL, 1957). Como solução imediata, tratamentos culturais como exclusão e erradicação de plantas, foram implantados como técnica de controle, iniciando uma campanha de erradicação do cancro cítrico (GIMENES-FERNANDES et al., 2000).

Quando a planta é infectada, todos os órgãos da parte aérea podem sofrer lesões (SCHUBERT; SUN, 1996). Em alto grau de severidade pode haver desfolha, queda de frutos e ramos secos, sendo comum em variedades suscetíveis (GOTTWALD et al., 1988; GOTTWALD et al., 1989). Embora os principais sintomas sejam apresentados nas folhas e nos frutos, qualquer órgão da planta que esteja acima do solo, pode ser infectado, principalmente por aberturas nos tecidos vegetais, sendo elas naturais como os estômatos, ou físicas como lesões causadas pelos próprios espinhos da planta (AMARAL, 2003).

A larvaminadora dos citros (*Phyllocnist citrella* Staiton) causa ferimentos que podem contribuir para a infecção da bactéria, e a água o principal fator ambiental para a condução da bactéria até os ferimentos. Os danos causados pela doença podem comprometer o valor comercial do fruto. Ainda não existem variedades totalmente resistentes ao cancro, entretanto no mercado de mudas existem variedades com diferentes graus de resistências quantitativas, sendo menos suscetíveis a doença (GOTTWALD et al., 2002).

Nas folhas os primeiros sinais aparecem com a formação de pústulas circulares e oleosas na sua parte dorsal, onde esta é a via principal da bactéria, pois contém a maior concentração de estômatos. A bactéria causa excessiva divisão celular no mesófilo onde ocorre a infecção, rompimento da epiderme, e surgimento da lesão no lado oposto da folha. Nos frutos, os sintomas são parecidos com os das folhas, já nos ramos ocorre a coalescência das lesões com formato irregular e de grande

porte (AMARAL, 2003). A doença reduz a área fotossintética da planta, levando folhas e frutos a senescência prematura (BOCK et al., 2011).

Se a planta não reconhecer o patógeno, seus mecanismos de defesas não são ativados ocorrendo uma rápida infecção do patógeno, como no caso de plantas suscetíveis, essa interação planta-patógeno é conhecida como interação compatível (GREWAL et al., 2012). O estudo da interação planta-patógeno é um desafio para a pesquisa ao tentarelucidar os mecanismos que regulam essa interação. Bactérias do gênero *Xanthomonas* tornaram-se modelos importantes para o estudo da interação planta-patógeno e para a compreensão da patogenicidade bacteriana e mecanismos de virulência (BÜTTNER; BONAS, 2010). Os sintomas de *X. citrisubsp. citri* se desenvolvem bem entre 28 a 30° C sob condições de umidade alta. No ambiente, a bactéria consegue sobreviver por poucos dias em material inerte e no solo por até três meses. Em tecidos vegetais da planta, sua sobrevivência se estende por anos, mesmo que esses tecidos se encontrem desidratados ou após sua queda (FEICHTENBERGER et al., 2005). Na presença de ventos, precipitações de chuvas e temperaturas elevadas, aumentam-se os riscos de contaminação da planta, condições climáticas características do verão brasileiro (LARANJEIRA et al., 2005).

Desde 1974 até 2016, a legislação para o controle de cancro afirmava que sempre que constatada uma epidemia, a prioridade é a erradicação da doença, como estratégias de áreas livres. Na impossibilidade de erradicação, a medida é de vigilância, visando a contenção da doença para a mitigação de riscos e a condição de área com baixa prevalência da doença (AMARAL, 2009). Com a bactéria já instalada na planta, medida a ser tomada é de erradicação e queima do material erradicado, como é feito no estado de São Paulo (BR) e Flórida (EUA) (NAMEKATA et al., 1996) ou o controle químico com produtos a base de cobre, principalmente nas épocas do surto de crescimento, como ocorre no estado do Paraná (STALL et al., 1981; LEITE JR., 2002).

Devido a alta multiplicação das fontes de inóculo do cancro cítrico e o aumento da infestação da doença, se tornou inviável no ponto de vista de muitas pesquisadores, produtores e órgãos de controle, continuar com a campanha de erradicação. Portanto em 5 de dezembro de 2016, com a nova Instrução Normativa 37/2016, que visa novas estratégias de controle, como a mitigação de risco, reduzindo a

fonte inóculo e controla a disseminação, que atende as normas de países importadores de frutas (OLIVEIRA et al., 2017).

A pulverização com cúpricos a cada emissão de brotação reduzem a severidade da doença, pois protege o tecido vegetal contra a penetração da doença (BEHLAU et al., 2007). Pelo fato dos cúpricos não possuírem efeito curativo, métodos de controle naturais são indicados, como plantio de mudas sadias e de cultivares resistentes, quebra-vento e poda de tecidos lesionados junto com pulverização de fungicidas a base de cobre (LEITE JR.; MOHAN, 1990) minimizando a exposição da planta ao inóculo (BOCK et al., 2014).

2.4 Biofertilizantes para controle de doenças

A sustentabilidade é um desafio para a citricultura e para todo o agronegócio brasileiro. Com dificuldades de implantação, por muitas vezes devido ao preconceito de alguns produtores, a pesquisa sustentável busca tecnologias inovadoras que são economicamente viáveis, satisfatórias para a condução das lavouras e estratégias conservacionistas aos recursos naturais como o solo e água (MONACO, L.C 2015).

A citricultura brasileira sofre com as barreiras fitossanitárias e como a aumentada utilização de agrotóxicos, que podem causar contaminação no homem, solo e água. Independente do modo de aplicação, os agrotóxicos possuem potencial de atingir o solo e a água, através de chuvas, ventos e lixiviação, onde o homem é o seu maior receptor (MMA, 2016). A sustentabilidade deve ainda considerar as mudanças sofridas pelos modelos agrícolas que modificaram o cenário de produção atual, exigindo um conceito dinâmico que atenda à evolução e ao desenvolvimento da sociedade (PEREIRA et al., 2005; MEDEIROS e LOPES, 2006).

O demasiado uso de agrotóxicos eleva os custos de produção da lavoura e aumenta a contaminação do meio ambiente. A contaminação de agricultores e consumidores, também não pode ser ignorada (DIAS et al., 2002).

Como uma alternativa sustentável, produtos novos vêm sendo comercializados em busca de maior eficiência no controle de pragas e doenças. Os biofertilizantes líquidos, obtidos através da compostagem de material orgânico, animal e vegetal, recebem destaque nesse propósito sustentável (MEDEIROS; LOPES, 2006;

SILVA et al., 2007). Nos biofertilizantes, provavelmente os principais mecanismos de ação são as contribuições antibióticas e a indução da resistência da planta (D'ANDRÉA; MEDEIROS, 2002).

A substituição de agrotóxicos por produtos naturais vem apresentando melhorias para a agricultura, como aumento da produtividade, redução dos gastos, controle de doenças e pragas, melhorias para fertilidade e conservação do solo e da água, teor de matéria orgânica com alta relação de carbono – nitrogênio (DIAS et al., 2002). Uma estratégia bastante indicada para pequenos produtores onde os recursos financeiros e tecnológicos são menores, aproveitando subprodutos de origem vegetal e animal que muitas vezes são descartados (MEDEIROS; LOPES, 2006).

Os biofertilizantes são definidos, na Instrução Normativa nº 46 de 06 de outubro de 2011, como produtos que contêm componentes ativos ou agentes biológicos capazes de atuar, direta ou indiretamente, sobre o todo ou sobre partes das plantas cultivadas, melhorando o desempenho do sistema de produção, e que sejam isentos de substâncias proibidas pela regulamentação de orgânicos (MAPA, 2011).

Os biofertilizantes aumentam a carga de nutrientes presentes no solo, aceleram o desenvolvimento de microrganismos, podem apresentar efeito fitohormonal, fungicida, bactericida, nematicida, acaricida e repelência contra insetos pragas. Além de ser considerado um produto de proteção natural, minimizando custos, efeitos ambientais e riscos fitossanitários para o desenvolvimento das lavouras (SILVA et al., 2007).

Os tratamentos de esgoto e dejetos suínos, por exemplo, podem se tornar biofertilizante para a agricultura. Isto é possível devido a realização dos tratamentos ideais para se tornarem componentes líquidos adequados para suprir as necessidades nutricionais das plantas, devido a presença de materiais solúveis na sua composição, esses elementos podem favorecer a planta com nitrogênio amoniacal e fósforo. O efluente tratado apresenta elevada carga orgânica, possuindo características biodegradáveis que quando aplicados ao solo, controlam suas propriedades, como capacidade de troca catiônica (CTC), absorção de água, acidez, aumento do teor de matéria orgânica, entre outros (SILVA et al., 2012).

Diante da escassez de alternativas para o controle de doenças nos métodos de produção orgânica, estas informações favorecem produtores rurais que se utilizam deste método, bem como aqueles produtores rurais com problemas de sanidade vegetal recorrentes na área (BETTIOL et al., 1997). Serão necessários maiores investimentos em pesquisas para que se tenham métodos que estejam ao alcance do agricultor, afim de consolidar o uso de produtos naturais e seus processos bioquímicos para o desenvolvimento de uma agricultura sustentável e moderna (MEDEIROS; LOPES, 2006).

Práticas alternativas e modernas para desenvolvimento da agricultura, como uso de biofertilizante e outras práticas orgânicas para controle de pragas e doenças (SOUZA, 2015), tem se destacado entre os consumidores que buscam alimentos manejados sem utilização de químicos.

REFERÊNCIAS

- AENPR. **Agência de Notícias do Paraná.** Disponível em: <http://www.aen.pr.gov.br/modules/noticias/article.php?storyid=94334>. Acessado em 22/02/2018.
- ALEGRIA, M.C.; SOUZA, D.P.; ANDRADE, M.O.; DOCENA, C.; KHATER, L.; RAMOS, C.; da SILVA, A.C.R.; FARAH, C.S. Identification of new protein-protein interactions involving the products of the chromosome and plasmid-encoded type IV secretion loci of the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. **Journal of Bacteriology**, v.187, p. 2315-325, 2005.
- ALVES, E.; MARUCCI, C.R.; LOPES, J.R.S.; LEITE, B. Leaf symptoms on plum, coffee, and citrus and the relationship with the extent of xylem vessels colonized by *Xylella fastidiosa*. **J. Phytopathol**, v. 152, p. 291–97, 2004.
- AMARAL, S. F. Providências para a erradicação do Cancro Cítrico. **O Biológico**. v.23, p.112-23, 1957.
- AMARAL, A.M. **Cancro cítrico: permanente preocupação da citricultura no Brasil e no mundo.** Comunicado Técnico Embrapa, 2003.
- AMARAL, E.S. **Revisão da Legislação do Cancro Cítrico *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*.** Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2009.
- ANTHONI, M.F.; COGGINS, J. R. C. W. The efficacy of five forms of 2,4-D to control preharvest fruit drop in citrus. **Scientia Hort.** n.81, p.267-77, 1999.
- BEHLAU F.; BELASQUE JR. J.; BERGAMIM FILHO, A.; LEITE JR., R.P. Incidência e Severidade de Cancro Cítrico em Laranja ‘Pêra Rio’ sob Condições de Controle Químico e Proteção com Quebra-Vento. **Fitopatologia Brasileira**. v.32, n.4, p.311-17, 2007.

BETTIOL, W.; TRATCH, R.; GALVÃO, J. A. H. **Controle de doenças de plantas com biofertilizantes**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, 1997. 22 p. (EMBRAPA-CNPMA. Circular Técnica, 02).

BITTENCOURT, A.A. O CancroCítrico. **O Biológico**. v.23, p.101-11, 1957.

BOCK, C.H.; PARKER, P.E.; COOK, A.Z.; RILEY, T.; GOTTWALD, T.R. Comparison of assessment of citrus canker foliar symptoms by experienced and inexperienced raters. **PlantDisease**, n.93, p. 412-24, 2009.

BOCK, C. H.; PARKER, P. E.; COOK, A. Z.; GRAHAM, J. H.; GOTTWALD, T. R. Infection and decontamination of citrus canker-inoculated leaf surfaces. **Crop Protection** vol. 30, p. 259-264. 2011.

BOCK, C.H.; GRAHAM, J.H.; GOTTWALD, T.R.; COOK, A.Z.; PARKER, P.E. Effect of the duration of inoculum exposure on development of citrus canker symptoms on seedlings of Swinglecitrumelo. **Eur J Plant Pathol**, v.138, p.237-45, 2014.

BOVÉ, J.M.; HOCQUELLET, A.; TOORAWA, P.; GARNIER, M. Detection and identification of the two *Candidatus Liberibacter* species associated with citrus huanglongbing by PCR amplification of ribosomal protein genes of the b operon. **Molecular and Cellular Probes** v. 13, p. 373–379, 1999

BRUNINGSN, M.; GABRIEL, W. *Xanthomonas citri*: quebrando superfície. **Molecular Plant Pathology**, p. 141-157, 2003.

BÜTTNER, D.; BONAS, U. Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. FEMS (Fed. Eur. Microbiol. Soc.) **Microbiology Reviews**, v. 34, n. 2, p. 107-133, 2010.

CAIXETA, M.P.; CORAZZA, M.J.; OLIVEIRA, R.R.; ZANUTTO, C.A.; NUNES, W.M.C.; VIDA, J.B. Caracterização morfofisiológica e identificação molecular de isolados de *Guignardia citricarpa*, agente patogênico da mancha preta dos citros. **Acta Sci. Agron. Maringá**, v.30, n.5, p.625-30, 2008.

CAIXETA, M.P.; NUNES, W.M.C.; SANTOS, A.F.; TESSMANN, D.J.; VIDA, J.B. Espécies de *Phytophthora* associadas à gomose em pomares de citros no Estado do Paraná, Brasil. **Summa Phytopathol.** Botucatu, v.39, n.4, p.242-47, 2013.

CARRARO, B.P. et al. Avaliação de complexos do *Citrus tristeza* vírus da região Norte do Estado do Paraná por meio de testes imunológicos e SSCP do gene da capa protéica. **Acta Sci. Agron.** Maringá, v.25, n.2, p.269-73, 2003.

CASTRO, M. E. A.; BEZERRA, A. R.; LEITE, W. A.; NOGUEIRA, N. D. Situação e ações do estado de Minas Gerais frente ao Huanglongbing. **CitrusResearch&Technology**, Cordeirópolis, v. 31, n. 2, p. 163-168, 2010.

CITRUS BR. **Associação Nacional dos Exportadores de Sucos Cítricos** em: http://www.citrusbr.com/download/Dados_processamento_safr2015-2016.pdf. Acesso em: 07 de outubro de 2016.

COLETTA-FILHO, H. D.; Targon, M. L. P. N.; Takita, M. A.; De Negri, J. D.; Pompeu JUNIOR, J.; Machado, M. A.; Amaral, A. M.; Muller, G. W. First report of the causal agent of Huanglongbing (*Candidatus Liberibacter asiaticus*) in Brazil. **Plant Disease**, v. 88, p. 1382, 2004.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Laranja, Terceiro Levantamento**. Brasília: CONAB, 2013. 11 p.

COSTA, A.T.; NUNES, W.M.C.; ZANUTTO, C.A.; MULLER, G.W. Stability of Citrus tristeza virus protective isolates in field conditions. **Pesq. agropec. bras.** v.45, n.7, p.693-700. 2010.

DAS, A.K. Citrus canker – A review. **Journal Applied Horticulture**, v. 5, p. 52-60, 2003.

D'ANDREA, P. A.; MEDEIROS, M. B. **Biofertilizantes biodinâmicos na nutrição e proteção de hortaliças**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE AGRICULTURA ORGÂNICA, NATURAL, ECOLÓGICA E BIODINÂMICA, 1, 2002, Piracicaba. Anais... Piracicaba: Agroecológica, 2002.

DIAS, P.F.; SOUTO, S.M.; LEAL, M.A.A; SCHIMIDT, L.T. **Uso de biofertilizante líquido na produção de alfafa**. Seropédica: EMBRAPA Agrobiologia, out. 2002. 16 p. (EMBRAPA, Agrobiologia. Documentos, 151).

FADEL, A. L.; STUCHI, E. D.; CARVALHO, S. A.; FEDERICI, M. T.; COLETTA FILHO, H. D. Navelina ISA 315 a cultivar resistant to citrus variegated chlorosis. **Crop Protection**, v. 64, p. 115-121, 2014.

FEICHTENBERGER, E.; BASSANEZI, R.B.; SPÓSITO, M. B.; BELASQUE JR. J. **Doenças dos citros**. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. **Manual de fitopatologia**. Volume 2. 4 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005.

FU, L.; PENTON, C. R.; RUAN, Y.; SHEN, Z.; XUE, C.; LI, R.; SHEN, Q. Inducing the rhizosphere microbiome by biofertilizer application to suppress banana *Fusarium* wilt disease. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 104, p. 39-48, 2017.

FUNDECITRUS. **Fundo de Defesa da Citricultura**. Disponível em: <http://www.fundecitrus.com.br/comunicacao/noticias/integra/safra-da-laranja-deveraser-de-24904-milhoes-de-caixas/445>. Acessado em 06/10/2016. Acesso em: 06 de outubro de 2016.

FUNDECITRUS. **Fundo de Defesa da Citricultura**. Disponível em: http://www.citrusbr.com/manuais/tecnicos/fundecitrus_greening.pdf. Acessado em: 24 de abril de 2018.

FUNDECITRUS. **Fundo de Defesa da Citricultura**. Disponível em: [http://www.fundecitrus.com.br/pdf/pes_relatorios/3%C2%AA_Reestimativa_da_safra_de_laranja_201718_\(Fevereiro_2018\).pdf](http://www.fundecitrus.com.br/pdf/pes_relatorios/3%C2%AA_Reestimativa_da_safra_de_laranja_201718_(Fevereiro_2018).pdf). Acessado em: 27 de abril de 2018.

GOES, A.; FEICHTENBERGER, E. Ocorrência da mancha preta causada por *Phyllosticta citricarpa* (Guignardia citricarpa) em pomares cítricos do Estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira** 15:73-75. 1993.

GIMENES-FERNANDES, N.; BARBOSA, J. C.; AYRES, A. J.; MASSARI, C. A. Plantas doentes não detectadas nas inspeções dificultam a erradicação do cancro cítrico. **Citrus**, p. 175, 2000.

Glienke, C.; Pereira, O.; Stringari, D. Endophytic and pathogenic *Phyllosticta* species, with reference to those associated with Citrus Black Spot. **Persoonia** v. 26p. 47–56, 2011.

GONÇALVES, A.M.O.; MOLINA, R.O.; NUNES, W.M.C.; ZANUTTO, C.A. Incidência de *Dilobopterus costalimai* Young e *Acrogonia citrina* Marucci & Cavichioli, em pomares cítricos no noroeste paranaense. **Acta Sci. Agron.** Maringá, v.30, n.3, p.321-24, 2008.

GONÇALVES-ZULIANI, A.M.O. **Avaliação da resistência de diferentes genótipos de laranja doce (*Citrus sinensis*) ao cancro cítrico e estudo da diversidade genética de *Xanthomonas citri* subsp. *citri***. 2014. 149p. Tese (Doutorado). Universidade Estadual de Maringá, 2014.

GOTTWALD, T.R.; MCGUIRE, R.G.; GARRAN, S. Asiatic Citrus canker: spatial and temporal spread in simulated new planting situations in Argentina. **Phytopathology**, v. 78, p. 739-745, 1988.

GOTTWALD, T.R.; TIMMER, L.W.; MCGUIRE, R.G. Analysis of disease progress of Citrus canker in nurseries in Argentina. **Phytopathology**, v. 79, p. 1276-1283, 1989.

GOTTWALD, T.R.; GRAHAM, J.H. **A device for precise and nondestructive stomatal inoculation of leaf tissue with bacterial pathogens**. *Phytopathology*, n.82, p.930–35, 1992.

GOTTWALD, T. R.; GRAHAM, J. H.; SCHUBERT, T. S. Citrus canker: the pathogen and its impact. **Plant Health Progress**, v. 10, 2002.

GREWAL, R.K.; GUPTA, S.; DAS, S. *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* triggers immediate transcriptomic modulations in rice. **BMC Genomics**, v. 13, p. 49 -61, 2012.

HANISCH, A. L. FONSECA, J. A. Características produtivas e qualitativas de sete forrageiras perenes de verão sob adubação orgânica e mineral. **Revista Verde** (Mossoró – RN – Brasil), v.6, n. 4, p. 01. 2011.

Bar-Joseph, M.; Garnsey, S.M.; Gonçalves, D. The Closteroviruses: a distinct group of elongated plant virus. **Advances Virus Research**, Nova York, v.25, p.93-168, 1979.

Kotzé, J. M. (2000). Black spot. In L. W. Timmer, S. M. Garnsey, & J. H. Graham (Eds.), *Compendium of Citrus Diseases* (2nd ed., pp. 23–25). St. Paul: **The American Phytopathological Society**.

LARANJEIRA, F.F.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; COLETTA-FILHO, H.D. Fungos, procariotos e doenças abióticas. In: Mattos Junior, D., et al. **Citros**. Campinas: Instituto Agrônômico e Fundag. Centro APTA Citros Sylvio Moreira. p. 509 -566, 2005.

LEITE JUNIOR, R.P.; MOHAN, S.K. Integrated management of the citrus bacterial canker disease caused by *Xanthomonas campestris* sp. *citri* in the State of Paraná, Brazil. **Crop Protection**. v.9, p.3-7, 1990.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa MAPA nº 46 de 06/10/2011 – **Estabelece o Regulamento Técnico para os Sistemas Orgânicos de Produção Animal e Vegetal**. Disponível em: <<http://www.legisweb.com.br/legislacao/?id=78910>>. Acessado em: 09 de outubro de 2016.

MEDEIROS, M. B; LOPES, J. S. Biofertilizantes líquidos e sustentabilidade agrícola. **Bahia Agríc.**, v.7, n.3, nov. 2006.

MEDINA FILHO, H. P.; BORDIGNON, R.; SIQUEIRA, W. J.; FEICHTENBERGER, E.; CARVALHO, M. R.; SOBRINHO, J. T. Resistência de clones e híbridos de porta-enxertos de citros à gomose de tronco causada por *Phytophthora parasitica*. **Fitopatologia Brasileira**, v.28 n. 5, 2003.

MENEGUIM, L.; Buassi, M.; Vilas-Boas, L. A.; Marques-Marçal, V. V.; Paccola-Meirelles, L. D.; Leite Jr., R. P. Ocorrência de ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ agente causal do Huanglongbing no estado do Paraná. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 33, n. 100, 2008.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Segurança química**. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/seguranca-quimica/agrotoxicos>. Acesso em: 09 de outubro de 2016.

MOLINA, R.O.; GONÇALVES, A.M.O.; ZANUTTO, C.A.; NUNES, W.M.C. Populational fluctuation of vectors of *Xylella fastidiosa*, wells in sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] varieties of northwest Paraná State, Brazil. **Braz. arch.biol. technol.** v.53, n.3, p.549-54, 2010.

MONACO, L.C. Aposta na sustentabilidade. **Citricultor**, n 29, p. 2, 2015.

MULLER, G.W.; TARGON, M.L.P.N.; CARVALHO, S.A.; SOUZA, A.A.; RODRIGUES, J.C.V. Doenças de citros causadas por vírus e viróides. In: Mattos Junior, D.; De Negri, J.D.; Pio, R.M.; Pompeu Junior, J. **Citros**. Cordeirópolis: Instituto Agrônomico; Fundag, v.19, p. 567-604, 2005.

NAMEKATA, T.; ROSSI, A.C.; CERÁVOLO, L.C. Avaliação de novos métodos de erradicação de CC. **Laranja**, v.17, n.1, p.67-78, 1996.

NEVES, E. M.; DAYOU, M.; DRAGONE, D. S.; NEVES, M. F. **Citricultura brasileira: efeitos econômicos-financeiros**, 2001.

NEVES, M. F.; TROMBIN, V. G.; MILAN, P.; LOPES, F. F.; PEREIRA, F. C.; KALAKI, R.B. **O Retrato da Citricultura Brasileira**, 1ª edição, p. 98, 2010.

NEVES, M. F.; TROMBIN, V. G.; MILAN, P.; LOPES, F. F.; CRESSONI, F.; KALAKI, R. **O retrato da citricultura brasileira**, São Paulo: CitrusBR, p. 138, 2011.

NUNES, W.M.C.; CROCE, Filho, J.; SEVERINO, J.J.; ZANUTTO, C.A.; TESSMANN, D.J.; MAFICIOLI, R.; CORAZZA-NUNES, M.J.; VIDA, J.B. Ocorrência de pinta preta, causada por *Guignardia citricarpa*, em tangerineiras 'Montenegrina' no sul do Paraná. **Summa phytopathol.** v.32, n.3, p.295, 2006.

NUNES, W.M.C.; MOLINA, R.O.; ALBUQUERQUE, F.A.; CORAZZA-NUNES, M.J.; ZANUTTO, C.A.; MACHADO, M.A. Flutuação populacional de cigarrinhas vetoras de *Xylella fastidiosa* em pomares comerciais de citros no Noroeste do Paraná. **Neotropical Entomology**. Vacaria, v.36, n.2, p.254-60, 2007.

OLIVEIRA, R.P.; FELICETTI, R.A.; JOAÕ, P.L.; CARBONARI, J.J.; DANIELI, R.; Sistema integrado de medidas fitossanitárias para o manejo do cancro cítrico no Rio Grande do Sul / Roberto Pedroso de Oliveira... [et al.]. – Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2017. 78 p. **Documento 451**. (Documentos / Embrapa Clima Temperado, ISSN 1516-8840 ; 451).

PEREIRA, O. A. P.; CARVALHO, R. V.; CAMARGO, L. E. A. Doenças do milho. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. **Manual de Fitopatologia**. São Paulo: Ceres, 2005. p. 478-488. v. 2.

QIU, M.; ZHANG, R.; XUE, C.; ZHANG, S.; LI, S.; ZHANG, N.; SHEN, Q. Application of bio-organic fertilizer can control *Fusarium* wilt of cucumber plant by regulation microbial community of rhizosphere soil. **Biologogy and Fertility of Soils**, v. 48, p. 807-816, 2012.

RODRIGUES, G. S.; Stuchi, E. S.; GIRARDI, E. A. Impactos ambientais e tecnologias de controle do Huanglongbing (HLB) dos citros: visão dos consultores técnicos. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2016. 35 p. (Embrapa Meio Ambiente. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, 68).

ROSSETTI, V. V.; DE NEGRI, J. D. Clorose variegada dos citros – revisão. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 11, n. 1, p. 1-14, 1990.

RINALDI, D.A.M.F. **Estudo da sensibilidade a cobre e estreptomicina e caracterização do perfil de plasmídeos em *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri***. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual de Maringá, 1998. 66p.

SCHAAD, N.W.; POSTNIKOVA, E.; LACY, G.; SECHLER, A.E.; AGARKOVA, I.V. **Emended classification of *Xanthomonas* pathogen on citrus. Systematic and Applied Microbiology**, v.29, p.690-95, 2006.

SCHUBERT, T. S.; RIZBI, S. A.; SUN, X.; GOTTWALD, T. R.; GRAHAM, J. H.; DIXON, W. N. Meeting the challenge of eradicating citrus canker in Florida – Again. **Plant Disease**, v. 5, p. 340-356, 2001.

SCHUBERT, T. S.; SUN, X. (fifth revision January 2003). **Plant Pathology**, Circular 377. Florida Department of Agriculture and Conservation Services. Division of Plant Industry. 1996.

SENTELHAS, P.C. Agrometeorologia dos citros. In: MATTOS JÚNIOR, D.; DE NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JÚNIOR, P. (Ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agrônomo, Fundag, 2005. p. 319-341.

SILVA, A. F; PINTO, J. M; FRANÇA, C. R. R. S; FERNANDES, S. C; GOMES, T. C. A; SILVA, M. S. L; MATOS, A. N. B. **Preparo e uso de biofertilizantes líquidos**. EMBRAPA. Comunicado técnico 130, 2007.

SILVA W. T. da et al. Avaliação físico-química de efluente gerado em biodigestor anaeróbio para fins de avaliação de eficiência e aplicação como fertilizante agrícola. **Quim. Nova**. v. 35. n.1. São Paulo, 2012. p. 35-40.

SOUZA, J.L. **Agroecologia e agricultura orgânica: princípios, métodos e práticas**. Vitória: Incaper, 2015.

SPÓSITO, M.B., AMORIM, L., RIBEIRO, P.J., BASSANEZI, R.B., KRAINSKI, E. T. Spatial pattern of trees affected by black spot in citrus groves in Brazil. **Plant Dis**. v. 91, p. 36-40, 2007.

STALL, R. E., MILLER, J. W., MARCO, G. M., CANTEROS DE ECHENIQUE, B. I. C. Timing of sprays to control cancro sisof grape fruit in Argentina. **Proceedings of the International Society of Citriculture**, v.1, p.414-417, 1981.

Stuchi, E. S.; GIRANDI, E. A. **Utilização de práticas culturais na citricultura frente ao Huanglongbing**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2010. 77 p. (Embrapa Mandioca e Fruticultura. Documentos, 191).

SULZBACH, M.; OLIVEIRA, R.P; GIRANDI, E.A.; SCHWARZ, S.F.; BERTOLINI, E.; **Huanglongbing (HLB) dos citros e estratégias de manejo visando prevenção e controle** /– Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2017. 36 p. (Documentos / Embrapa Clima Temperado, ISSN 1516-8840 ; 450).

TIMMER, L. W.; GARNSEY, S.M.; GRAHAM, J.M. Compendium of citrus diseases. ST Paul: **APS Press**, 2000. 80p.

VARGAS, R.G.; GONÇALVES-ZULIANI, A.M.; FILHO, J.C.; CARVALHO, S.A.; NOCCHI, P.T.R.N.; NUNES, W.M.C. Avaliação da resistência de variedades de *Citrus* spp. à *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. Na região Noroeste Paranaense, em condições de campo. **Summa Phytopathol.** Botucatu, v.39, n.4, p.235-41, 2013.

3 ARTIGO 1: EFICIÊNCIA DE CONTROLE DO CANCRO CÍTRICO PELO USO DE BIOFERTILIZANTE

3.1 RESUMO E ABSTRACT

RESUMO

O cancro cítrico causado pela bactéria *Xanthomonascitrisubsp.citri*, está presente em diversas regiões do mundo produtoras de citros, capaz de infectar tecidos jovens, folhas, frutos e ramos, podendo causar necrose, desfolha e a queda prematura dos frutos. Os biofertilizantes possuem efeitos antagonistas a diversos patógenos da agricultura, além de ser uma alternativa de controle sustentável. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi verificar a eficiência de um biofertilizante comercial e microfiltrado no controle de cancro cítrico *in vitro* e em folhas destacadas de citros. A identificação dos isolados foi realizada de acordo com as características morfológicas e moleculares. Para a determinação da flora microbiana do produto comercial, foi obtido o microfiltrado e avaliada o tamanho de colônias na presença do biofertilizante. Em folhas destacadas foram avaliados dois genótipos de laranja doce e o potencial do biofertilizante no controle da doença inoculada. As folhas foram desinfetadas e inoculadas por perfuração com agulha, oito perfurações por folha. As folhas foram mantidas em tubo *Falcon*, contendo 1 mL de água destilada. Foram utilizadas quatro repetições de cada dose do biofertilizante, e as avaliações foram realizadas pela medida do diâmetro de lesões. As avaliações foram realizadas aos 10, 15 e 20 dias após a inoculação. O teste utilizado para a comparação das médias dos parâmetros avaliados foi o de Scott Knott, ao nível de 5% de significância. Os resultados obtidos *in vitro* demonstraram menor diâmetro de UFC nas duas composições do biofertilizante (ativado e microfiltrado). Em folhas destacadas a variedade Pera demonstrou maior resistência ao patógeno. A dose comercial 10L ha^{-1} obteve menores médias de diâmetro nas duas composições (ativada e microfiltrada). Pera demonstrou menores diâmetros de lesões na face adaxial conforme os dias foram aumentando. O biofertilizante na composição ativada, interferiu no desenvolvimento do patógeno. A variedade Folha Murcha demonstrou ser mais suscetível ao patógeno.

Palavras chaves: Controle biológico, *Xanthomonascitri*, laranja doce.

ABSTRACT

Citrus canker caused by the bacterium *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, is present in several regions of the world producing citrus, capable of infecting young tissues, leaves, fruits and branches, which can cause necrosis, defoliation and premature fruit drop. Biofertilizers have antagonistic effects on several agricultural pathogens, as well as being an alternative for sustainable control. In this way, the objective of this work was to verify the efficiency of a commercial and microfiltered biofertilizer in the control of citrus canker in vitro and in leaves of citrus. Identification of the isolates was performed according to the morphological and molecular characteristics. In order to determine the microbial flora of the commercial product, the microfiltrate was obtained and the size of colonies evaluated in the presence of the biofertilizer. In highlighted leaves, two sweet orange genotypes and the biofertilizer potential in the inoculated disease control were evaluated. The leaves were disinfected and inoculated by needle punching, eight perforations per leaf. The leaves were kept in Falcon tube containing 1 mL of distilled water. Four replicates of each dose of the biofertilizer were used, and the evaluations were performed by measuring the diameter of the lesions. Evaluations were performed at 10, 15 and 20 days after inoculation. The test used to compare the means of the parameters evaluated was that of Scott Knott, at a level of 5% of significance. The results obtained in vitro showed a smaller diameter of CFU in the two compositions of the biofertilizer (activated and microfiltered). In leaves, the Pera variety showed greater resistance to the pathogen. The commercial dose 10L ha⁻¹ obtained smaller mean diameter in both compositions (activated and microfiltered). Pera showed smaller lesion diameters on the adaxial surface as the days increased. The biofertilizer in the activated composition interfered in the development of the pathogen. The Folha Murcha variety has been shown to be more susceptible to the pathogen.

Keywords: Biological control, *Xanthomonas citri*, sweet orange.

3.2 Introdução

A citricultura está presente em diversos países, predominante em regiões de clima tropical e subtropical (SENTELHAS, 2005). O estado do Paraná tem demonstrado uma crescente pelo interesse da cultura desde a safra 2012/2013, onde alcançou uma produção de 702.000 toneladas (CONAB 2013). Para a safra 2017/2018 a estima-se uma produção 1 milhão de toneladas, e um aumento de 33% em relação à safra anterior (AENPR, 2017). O Brasil é o principal país produtor de citros, cuja principal variedade de laranja doce (*Citros sinensis*) produzida é a variedade Pera. Entretanto a citricultura sofre com o alto índice de doenças que atacam a cultura.

Uma das principais doenças que atacam a citricultura é o cancro cítrico, causado pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (SCHAAD et al., 2006). Em países europeus, a doença é classificada como “praga exótica” (AMARAL, 2003). O patógeno possui uma ampla área de atuação por todo o mundo. No Brasil foi detectado pela primeira vez em 1957 no estado de São Paulo, na cidade de Presidente Prudente (BITTENCOURT, 1957), no mesmo ano os sintomas foram encontrados no estado do Paraná e Mato Grosso do Sul (AMARAL, 1957). Como solução imediata a medida de controle adotada foi de erradicação e exclusão das plantas infectadas (GIMENES-FERNANDES et al., 2000).

Os principais sintomas ocorrem nas folhas e nos frutos, entretanto todos os órgãos da planta acima do solo podem ser infectados, prejudicando o valor comercial dos frutos, que em ataques mais severos pode ocasionar a queda prematura dos frutos (AMARAL, 2003). O principal carreador da bactéria é a água, que através de aberturas naturais como os estômatos e aberturas físicas como galerias causadas pela larva minadora do citros (*Phyllocnistis citrella* Staiton), o patógeno penetra na folha (AMARAL, 2003). O controle preventivo da doença mais utilizado é o controle químico através de bactericidas a base de cobre (BEHLAU et al., 2007) e o uso de inseticidas para controle da larva minadora.

O uso de biofertilizantes auxilia no controle de vários patógenos prejudiciais a agricultura e como uma alternativa de controle sustentável, a utilização de biofertilizantes está crescendo no ambiente agrícola. Obtidos através da compostagem líquida, onde ocorre a fermentação de material orgânico de origem vegetal e animal, por bactérias e leveduras, juntamente com a água (MEDEIROS; LOPES, 2006; SILVA et

al., 2007). Sua composição varia conforme o material orgânico utilizado, rico em nutrientes para o desenvolvimento vegetal, além de microrganismos presentes que podem ter ação fito hormonal e antagonismo a diversos patógenos (HRIDYA et al., 2013). Seus efeitos são mais lentos que fungicidas, mas são mais duradouros e menos prejudiciais ao meio ambiente (BAILEY; LAZAROVITS, 2003; BHARDWAJ et al., 2014). Os microrganismos presentes na composição do biofertilizante que tenham efeitos antagonistas aos fitopatógenos, são chamados de “agentes de biocontrole” (VINALE et al., 2008; KIM, VUJANOVIC, 2016).

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi verificar a eficiência de um biofertilizante comercial e seu extrato microfiltrado no controle de cancro cítrico *in vitro* e em folhas destacadas de citros.

3.3 Materiais e Métodos

3.3.1 Análises *in vitro* do controle de cancro de cítrico com biofertilizante

3.3.1.1 Isolamento do patógeno

Amostras de folhas de diferentes variedades de laranja doce apresentando sintomas característicos da doença foram coletadas de diferentes regiões citrícolas dos estados de São Paulo e Paraná: isolado (I) I.2 *Citrus arantifolia* (Lins-SP), I.8 *Citrus sinensis* (Corbélia-PR), I.11 *Citrus reticulata* (Palmital-SP), I.649 *C. sinensis* (Nova Londrina-PR). As folhas foram encaminhadas ao laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual de Maringá - UEM, onde se realizou o isolamento da bactéria *X. citris* subsp. *citrie* os isolados foram cedidos gentilmente para a realização do trabalho. O I. 306 foi coletado da variedade *C. sinensis* (Paranavaí-PR), estirpe padrão Xcc 306 foi cedido gentilmente pelo laboratório de Fitopatologia do Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR).

Figura 1 Isolamento do patógeno em meio de cultura Nutriente Ágar (NA).



Fonte: Reis, 2016.

3.3.1.2 Caracterização morfológica dos isolados

As análises morfológicas foram realizadas visualmente através da coloração, formato das colônias e coloração de Gram com auxílio de microscopia óptica.

3.3.1.3 Determinação da flora microbiana do biofertilizante

Obtenção do biofertilizante ativado

O biofertilizante comercial foi ativado de acordo com as recomendações do fabricante, sendo sua composição: 80% de água mineral, 10% de açúcar cristal e 10% do produto comercial, por um período de ativação de no mínimo 5 dias em temperatura ambiente.

Obtenção da flora microbiana do biofertilizante

Para a determinação da flora microbiana, foi obtida da amostra ativada do biofertilizante comercial 'FertBokashi Premium®' (Kórin). Após a homogeneização, 50 µL foram semeados sobre o meio de cultura, solidificado específico e seletivo (Tabela

1), através do método de diluição seriada e uniformizado com o auxílio de alça de *Drigalski*. As placas foram mantidas em B.O.D. a 25 °C e a avaliação foi realizada 48 a 72 horas após a incubação, determinando as unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC mL⁻¹) e valores transformados em razão logarítmica (LogUFCmL⁻¹).

Tabela 1 Meios de cultura seletivos utilizados para análise microbiana do biofertilizante.

Grupo Funcional	Meio de cultura	Diluição seriada
Fungos totais	B.D.A (Acumedia®)	
Amilolíticos	Amido-caseína (PONTECORVO et al., 1953)	10 ⁻⁴
Bactérias heterotróficas	T.S.A (Acumedia®)	
Solubilizadores de fosfato	SF (SYLVESTER-BRADLEY et al., 1982)	
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	King B (MISAGHI et al., 1982)	
Celulolíticos	Celulolítico (WOOD, 1980)	
Proteolíticos	Proteolítico (PONTECORVO et al., 1953 – modificado)	10 ⁻³
Actinomicetos	Caseinagar (KUSTER; WILLIAMS, 1964)	
Fixadores biológicos de nitrogênio (NFB)	Nfb (DOBEREINER; DAY, 1976)	

Obtenção do filtrado do biofertilizante obtido por microfiltração

O microfiltrado do biofertilizante foi obtido por meio da filtração por fluxo tangencial em unidade MinitanTM Microfiltration/ Ultrafiltration System (MILLIPORE). A unidade foi equipada com placas de acrílico onde foram fixadas as membranas de diâmetro de poro de 0,2 μm . Cada placa possuía uma área de superfície filtrante de 60 cm^2 . Foram utilizadas até dez placas ao mesmo tempo, perfazendo uma área de superfície total do filtro de 600 cm^2 . A capacidade de filtração variou entre 500 mL a 2000 mL. O fluxo foi realizado por uma bomba peristáltica que transferiu o produto a ser filtrado de um reservatório até a unidade de filtração. As partículas maiores que 0,2 μm foram retidas na superfície das membranas e retornaram ao reservatório, de onde novamente foi bombeada para a membrana. Água, sais minerais e outras partículas menores que 0,2 μm capazes de passarem pelas membranas se constituíram no permeado, também denominado extrato (microfiltrado), que foi armazenado em outro recipiente. O extrato (microfiltrado) foi usado nos experimentos *in vitro* e em folhas destacadas.

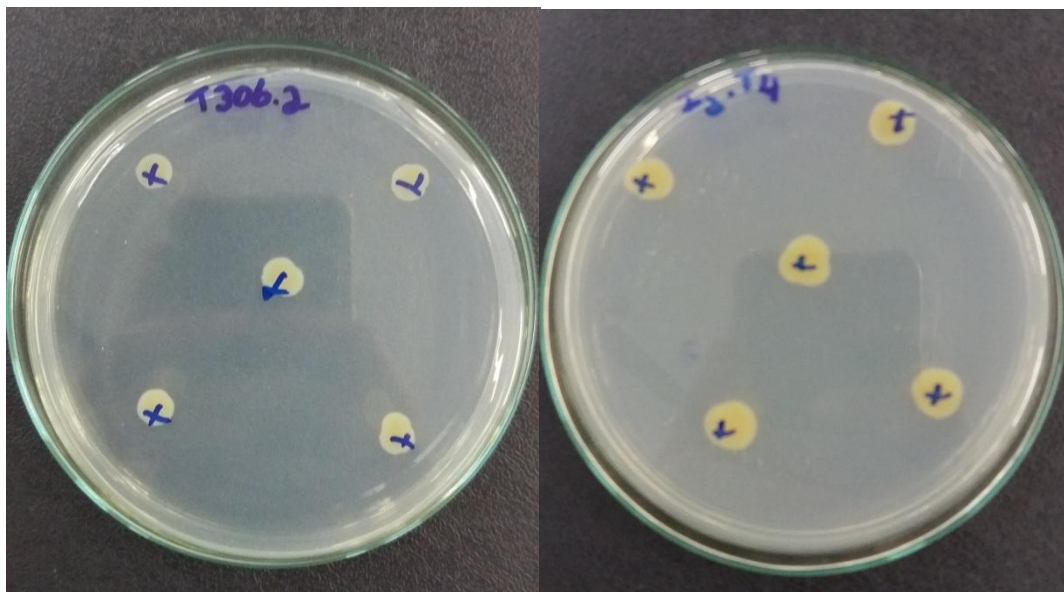
Tamanho de UFC na presença do biofertilizante

Foi diluído 5 mL do produto ativado em 95 mL de água mineral autoclavada, foram selecionados 5 isolados (I) da bactéria *X. citris* subsp. *citris* sendo eles: I. 306, I. 2, I. 8, I. 11 e I. 649. Foi preparado meio NA (*Nutriente Agar*) e vertidos em placas de *Petri*, após o meio solidificado, com a micropipeta foi adicionado 100 μL do biofertilizante (ativado e microfiltrado) e espalhado com alça de *Drigalskina* superfície do meio, após o espalhamento e a secagem do produto, foi inoculado os isolados bacterianos em 5 pontos da placa com alça de platina. Foram realizadas quatro repetições por isolado e incubados em BOD a $28,7^\circ\text{C} \pm 2$ para crescimento. Após 7 dias, com o auxílio de um paquímetro foi avaliado o tamanho em milímetros das unidades formadoras de colônias (UFC).

Figura 2 Inoculação do patógeno em meio Nutriente Ágar (NA) para medição do diâmetro de colônias. Foto A (estirpe padrão, testemunha do isolado 306), foto B (testemunha do isolado 2), inoculação dos isolados em 5 pontos da placa.

A)

B)



Fonte: Reis, 2017.

3.4 Avaliação em folhas destacadas

Foram avaliados dois genótipos de laranja doce (*C. sinensis*): Pera e Folha Murcha, utilizando a estirpe Xcc 306 de *X.citrisubsp. citrina* inoculação das plantas estudadas. Utilizou-se folhas de dois genótipos estudados, com o mesmo estágio de maturação e com boa sanidade (sem sintomas ou sinais de patógenos), os quais foram lavados e desinfetados com hipoclorito 1%. Realizou-se o corte de folhas com auxílio de um bisturi próximo ao local de inserção do pecíolo no ramo. Imediatamente após o corte, as folhas foram inoculadas por perfuração com agulha (0,55 x 0,20 mm), com oito perfurações por folha. Utilizou-se 16 folhas por isolado, os quais foram previamente ajustados a uma concentração de 10^8 UFC mL⁻¹ (BELASQUE JR, JESUS JR, 2006) em espectrofotômetro a 600 nm.

Após a inoculação as folhas foram distribuídas sobre uma bancada e realizou-se a pulverização do biofertilizante (ativado e microfiltrado) e a testemunha

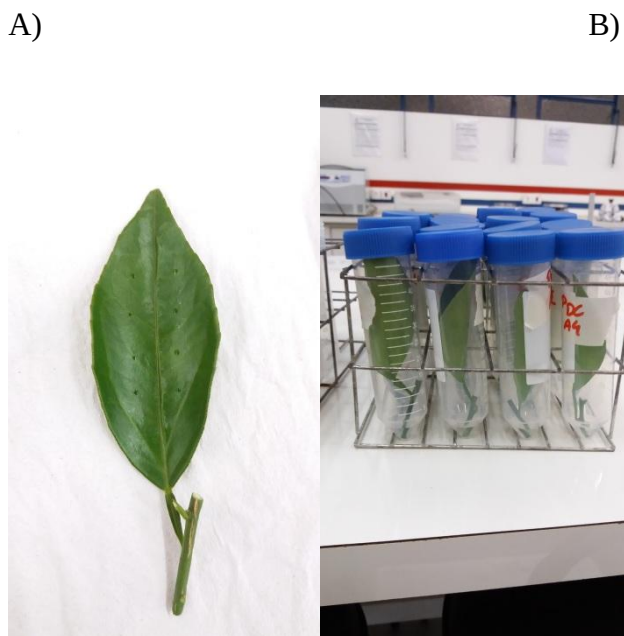
com água filtrada sobre as folhas com pulverizador costal pressurizado por CO₂, equipado com barra composta por um bico, com ponta de pulverização, válvulas antigotejo, capa tipo rosca, anéis de vedação e filtros malha 80, posicionada a 0,5 m da superfície do alvo. A ponta utilizada foi de jato plano com pré-orifício modelo ADI 11002, com pressão de trabalho 414 kPa, vazão correspondente a 0,91 L min⁻¹ e taxa de aplicação de 100 L ha⁻¹. Foram aplicados os produtos ativado e filtrado nas doses: dose comercial (DC) 10 L ha⁻¹, meia dose 5 L ha⁻¹, uma dose e meia 15 L ha⁻¹ e testemunha (T),

Após a aplicação esecagem das folhas, as mesmas foram mantidas em tubo Falcon de 50 mL, contendo 1,5 mL de água destilada. As avaliações ocorreram aos 10, 15 e 20 dias após a inoculação (DAI), através da aferição do tamanho das lesões com auxílio de paquímetro com precisão de 0,05 mm. Foram realizadas quatro repetições com o biofertilizante filtrado e quatro repetições com o biofertilizante ativado.

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, fatorial 4 x 2 x 2, quatro doses de biofertilizante (0, 5, 10 e 15 L ha⁻¹) associado a dois modos de preparo (ativado e microfiltrado) em duas variedades (Folha Murcha e Pera) com parcelas subdivididas no tempo para avaliação das lesões (aos 10, 15 e 20 dias após a inoculação), com quatro repetições.

A normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk ($p < 0,05$) e a homogeneidade de variância pelo teste de Levene. Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F, as médias dos fatores qualitativos foram comparadas pelo teste Tukey enquanto as médias dos fatores quantitativos foram comparadas por análise de regressão.

Figura 3 Folhas destacadas da variedade Pera com oito perfurações (inoculação Xcc 306) e armazenadas em tubo falcon de 50 mL, com 1,5 mL de água destilada. Figura A (folhas destacadas com 8 inoculações por agulha), Figura B (Folhas destacadas armazenadas em tubo falcon com 1,5 mL de água destilada).



Fonte: Reis, 2017.

3.5 Resultados e Discussão

Na obtenção da flora microbiana, foram observados apenas microrganismos do tipobacilos e leveduras. Não foram observados crescimento de microrganismos com atividade amilolítica, celulolítica, proteolítica. Os resultados para microrganismos como: Actinomicetos, *Pseudomonas fluorescens*, Solubizadores de fosfato, Bactérias heterotróficas e fixadores de nitrogênio, também foram negativos. Os resultados foram confirmados através da análise de coloração de Gram.

Os resultados obtidos referentes a análise *in vitro* do tamanho de colônias em mm, na presença das composições (ativada, microfiltrada e testemunha) do biofertilizante testado de acordo com a análise de variância (ANOVA) na Tabela 2, em todos os isolados estudados houve diferença estatística entre a composição do biofertilizante, de acordo com teste F a 1% de probabilidade.

Tabela 2 Análise de variância da inibição do crescimento *in vitro* de fitopatógenos na presença de biofertilizante, em função da composição do biofertilizante, ativado ou filtrado e do isolado dos patógenos.

	Isolados										
	2			8		11		306		649	
	GL	F	p-valor	F	p-valor	F	p-valor	F	p-valor	F	p-valor
Trat.	2	*4,39	0,0467	**13,01	0,0022	**13,81	0,0018	**65,67	0,0000	**10,03	0,0051
CV (%)		18,65		12,72		10,47		8,72		14,81	

¹ Variável transformada por $(x+1)^{0,5}$; UFC: Unidade formadora de colônia. *Significativo pelo teste F a 1% de probabilidade.

Os dados de acordo com o tamanho de UFC referente a interação da composição do biofertilizante (ativado e filtrado), se encontram na Tabela 3. Os resultados obtidos demonstraram que as duas composições do produto testado apresentaram menores diâmetros de lesões quando comparados com a testemunha.

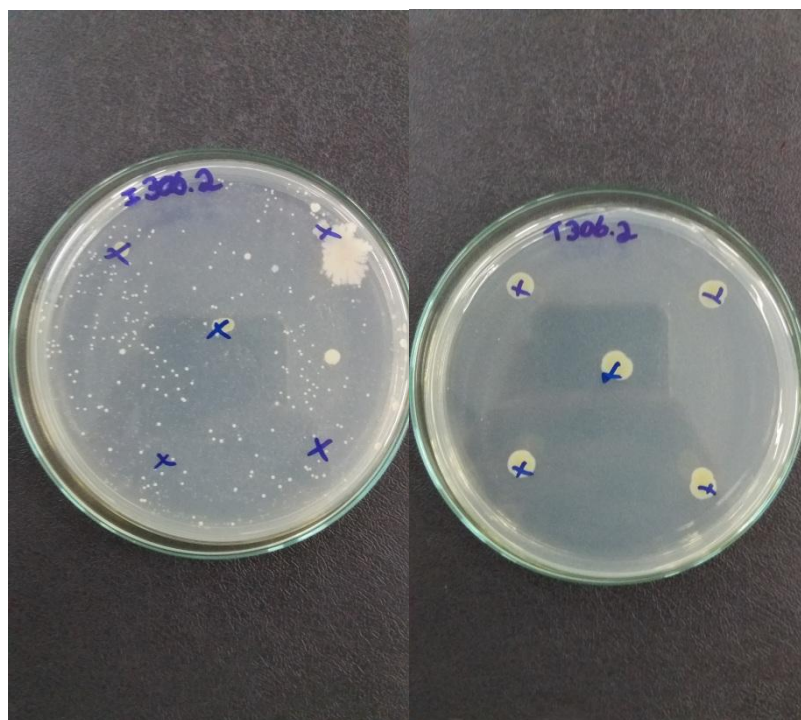
Tabela 3 Diâmetro de unidade formadora de colônia (UFC), em mm, em função da composição do biofertilizante, ativado ou filtrado, no meio de cultura, *in vitro*.

Isolado	Testemunha	Ativado	Filtrado
2	6,22 B	4,55 A	4,46 A
8	7,36 B	5,47 A	4,76 A
11	6,66 B	5,20 A	4,59 A
306	4,81 B	3,23 A	6,70 C
649	6,70 B	4,77 A	4,39 A

Médias seguidas de mesma letra maiúscula, na linha, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

Para o isolado Xcc 306, utilizado como isolado padrão da bactéria *X.citrisubsp. citri*, observou-se que houve diferença quanto ao tamanho de UFC entre os tratamentos com o produto ativado e produto filtrado. O produto ativado inibiu o desenvolvimento da bactéria (3,22 mm), quando comparado ao produto filtrado (6,70 mm), onde o diâmetro de UFC foi maior que o dobro, quando comparado ao tratamento ativado. Este comportamento observado pode estar relacionado ao fato da composição filtrada, por não conter microrganismos antagonistas e toda composição química do produto ser mantida, pode favorecer o desenvolvimento do patógeno (D'ANDRÉA, 2002).

Figura 4 Diâmetro de colônias de *Xanthomonascitrisubsp. citri* (isolado Xcc 306) com composição do biofertilizante ativado (produto comercial) e testemunha.



Fonte: Reis, 2016.

Entre os demais isolados de *X.citrisubsp. citri* não obteve diferença estatística entre as composições ativada e microfiltrada, isso pode estar relacionado que para a filtração do produto comercial, primeiro tenha que passar pela ativação do mesmo por um período de no mínimo 5 dias, portanto os microrganismos presentes na solução podem produzir metabolitos secundários durante esse tempo, que nos quais

passam pela filtração compondo a composição do microfiltrado utilizado. Entretanto o biofertilizante utilizado por possuir pH ácido (4 a 4,5), pode tornar o ambiente desfavorável para o crescimento bacteriano. De modo geral, o pH ideal para o crescimento bacteriano varia entre 6 a 7.

A composição ativada teve efeito antagonista ao crescimento bacteriano, diminuindo o diâmetro das colônias. Devido a resistência de muitos patógenos ao uso de agrotóxicos, os biofertilizantes podem ser um auxiliador no controle de doenças. Por apresentar uma ampla comunidade bacteriana, como actinobactérias, fungos filamentosos, *Bacillus* e entre outros, com ação antagonista a patógenos (FERRARI et al., 2012; KUPPER et al., 2006; TRATCHEBETTIOL, 1997).

A análise de variância dos resultados obtidos pelo método de folha destacada na Tabela 4, houve interação significativa tanto na parte abaxial, quanto adaxial em relação a Variedade x Concentração e Composição (produto ativado e microfiltrado) x Concentração pelo teste F a 5% de probabilidade.

Tabela 4 Análise de variância da inibição do crescimento *in vivo* de fitopatógenos com o uso de biofertilizante, em função da composição do biofertilizante, ativado ou filtrado, sua concentração e variedade do citros.

Fator de variação	GL	Abaxial		Adaxial	
		Fc	p-valor	Fc	p-valor
Variedade	1	35,45	** 0,0000	54,42	** 0,0000
Composição	1	16,69	** 0,0002	12,83	** 0,0008
Concentração	3	91,54	** 0,0000	77,51	** 0,0000
Variedade*Composição	1	1,31	0,2585	0,47	0,4953
Variedade*Concentração	3	8,00	** 0,0002	14,93	** 0,0000
Composição*Concentração	3	6,17	** 0,0012	3,81	* 0,0157
Variedade*Composição*Concentração	3	0,76	0,5200	1,32	0,2792
Erro 1	48				
DAI	2	1,84	0,1639	1,36	0,2628
DAI*Variedade	2	1,48	0,2325	4,11	* 0,0194
DAI*Composição	2	1,98	0,1442	1,37	0,2592
DAI*Concentração	6	0,37	0,8937	1,15	0,3403
DAI*Variedade*Composição	2	0,72	0,4895	0,24	0,7904
DAI*Variedade*Concentração	6	1,84	0,0986	1,49	0,1911
DAI*Composição*Concentração	6	0,39	0,8853	0,25	0,9587
DAI*Variedade*Composição*Concentração	6	0,39	0,8852	1,27	0,2770
Erro 2	96				
CV 1 (%)			14,83		13,90
CV 2 (%)			11,95		13,05

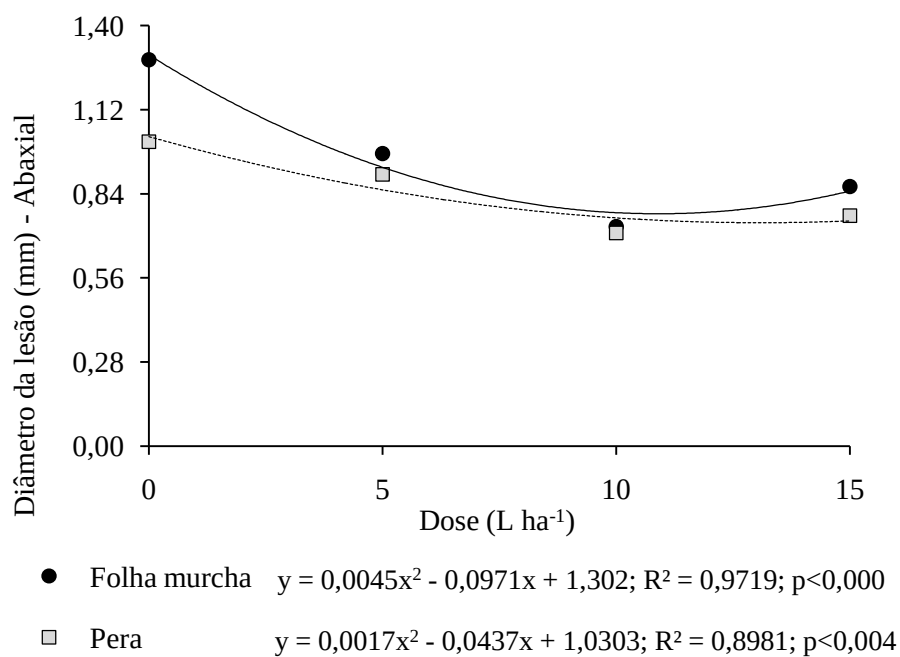
¹ Significativo a *5% e **1% de probabilidade pelo teste F.

Os resultados evidenciaram que a resistência das variedades de citros e os microrganismos presentes no biofertilizante, são fatores diretos para a inibição do desenvolvimento das lesões de cancrose. As variedades estudadas apresentaram diferença estatística entre si, quando comparadas com diferentes concentrações do produto testado, os resultados da testemunha comprovam essa diferença. Sendo que em diferentes concentrações, a dose comercial obteve os melhores resultados. De acordo com a análise de variância, os dias após inoculação (DAI) apresentou diferença estatística na face adaxial da folha quando comparado entre as variedades (Tabela 4).

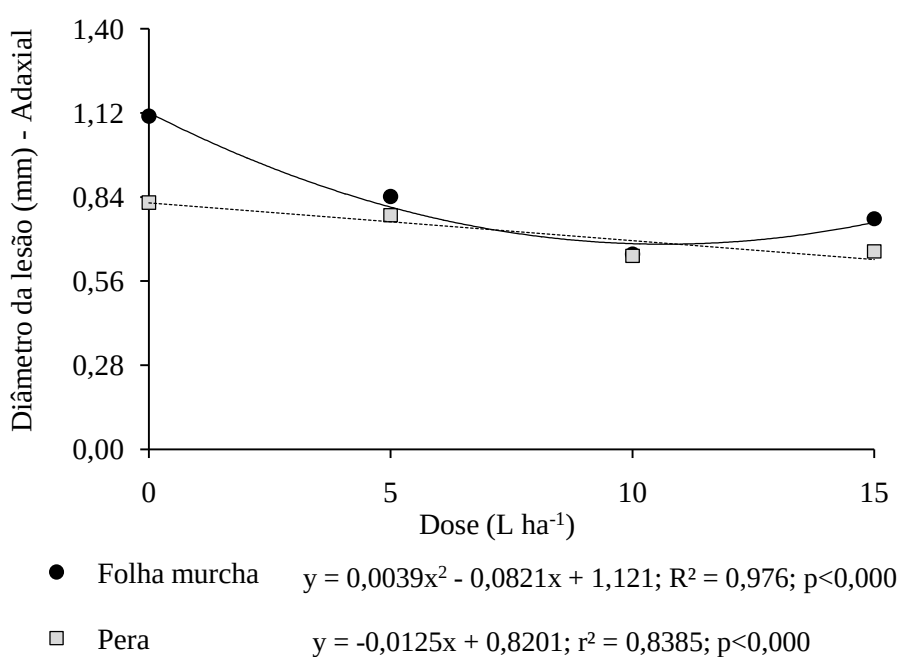
De acordo com a variedade e a dosagem utilizada, o diâmetro de lesão (mm) apresentou diferença significativa tanto na face abaxial, quanto adaxial da folha (Figura 5).

Figura 5 Diâmetro de lesão de *Xanthomonascitrisubsp. citri* nas faces abaxial (A) e adaxial (B) de folhas destacadas, em função da concentração e composição do biofertilizante, e da variedade de laranja doce.

A)



B)



Portanto pode-se afirmar através dos resultados obtidos, que existe diferença de resistência entre as variedades. A variedade Pera por apresentar menores diâmetros de lesões no tratamento testemunha (dose 0 L ha⁻¹) demonstrou ser mais resistente do que a variedade Folha Murcha. Vargas et al. (2013) encontraram resultados semelhantes ao comparar diferentes variedades: a Pera apresentou menor grau de severidade de acordo com o desenvolvimento do patógeno, podendo considerá-la resistente. Gonçalves-Zuliani et al (2016) ao testar a resistência de nove genótipos diferentes de laranja doce, também constataram menor grau de severidade do cancro cítrico em relação a variedade Pera IAC. A variedade Folha Murcha apresentou maior diâmetro de lesões que a variedade Pera (Figura 5), tanto na face adaxial (32% maior), quanto na face abaxial (27% maior).

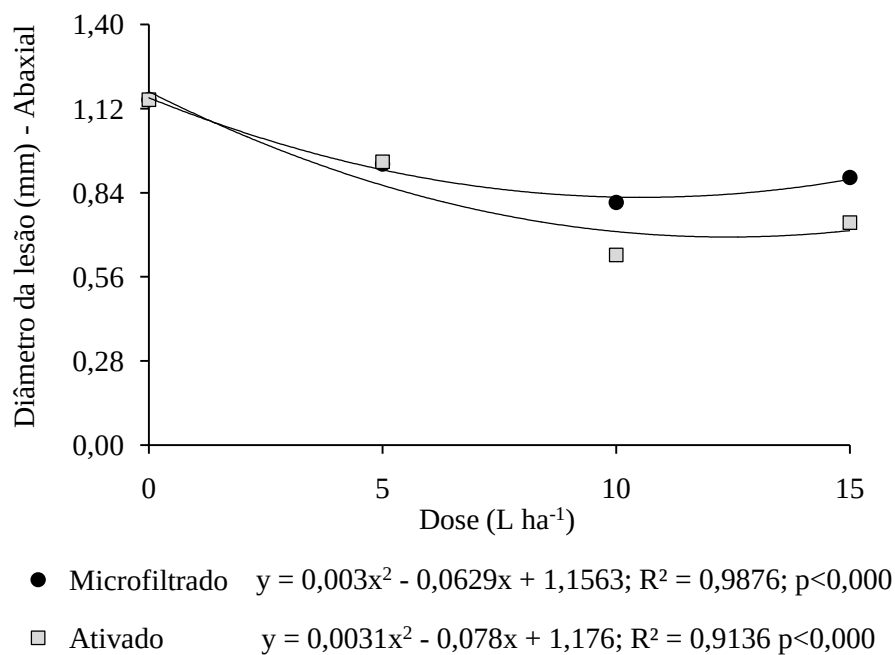
Analisando-se os valores na face abaxial, os diâmetros das lesões apresentaram-se maiores, isso se explica que pelo fato da face abaxial possuir uma maior concentração de estômatos. Estas aberturas naturais favorecem a penetração da bactéria, contribuindo para que a lesão nessa face da folha tenha um desenvolvimento avançado quando comparada com a face adaxial (Figura 5). Gonçalves-Zuliani et al (2016) através do método de folha destacada, também constataram os sintomas iniciais das lesões de cancro na face abaxial da folha, com pústulas esbranquiçadas e que ao final de seu experimento as lesões passaram a coloração marrom escuro e se espalharam para outra face da folha.

Na dosagem comercial de (10 L ha⁻¹) o diâmetro de lesão foi equivalente entre as variedades, demonstrando um efeito satisfatório para o desenvolvimento de microrganismos de biocontrole. Fazendo um comparativo com o controle químico a base de cobre, estudos realizados por BEHLAU et al (2007) demonstraram uma diminuição de severidade da doença em 37% com o controle a base de cobre. Entretanto conciliando o auxílio do biofertilizante com a diminuição do tamanho de lesão e o controle químico, essa taxa de severidade pode ser ainda menor.

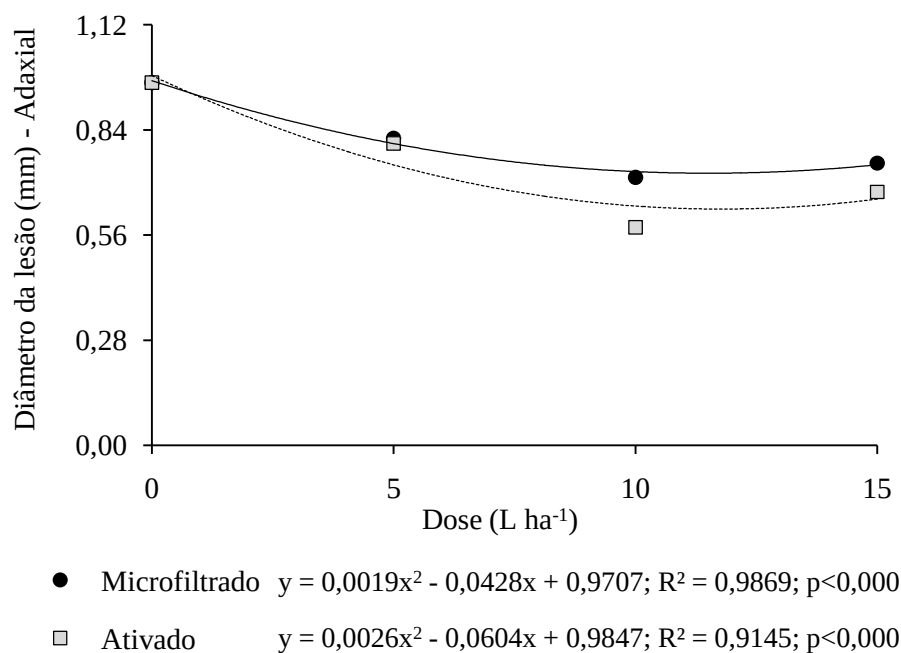
Quando comparado diferentes composições do biofertilizante (Ativado e Microfiltrado), os resultados obtidos demonstram uma diferença significativa ao tamanho de lesão causado pelo patógeno nas duas faces da folha (Figura 6).

Figura 6 Diâmetro de lesão de *Xanthomonascitrisubsp. citri* nas faces abaxial (A) e adaxial (B) de folhas destacadas, em função da concentração e composição do biofertilizante, ativado e microfiltrado, em relação as médias de diâmetro de lesão das duas variedades testadas.

A)



B)



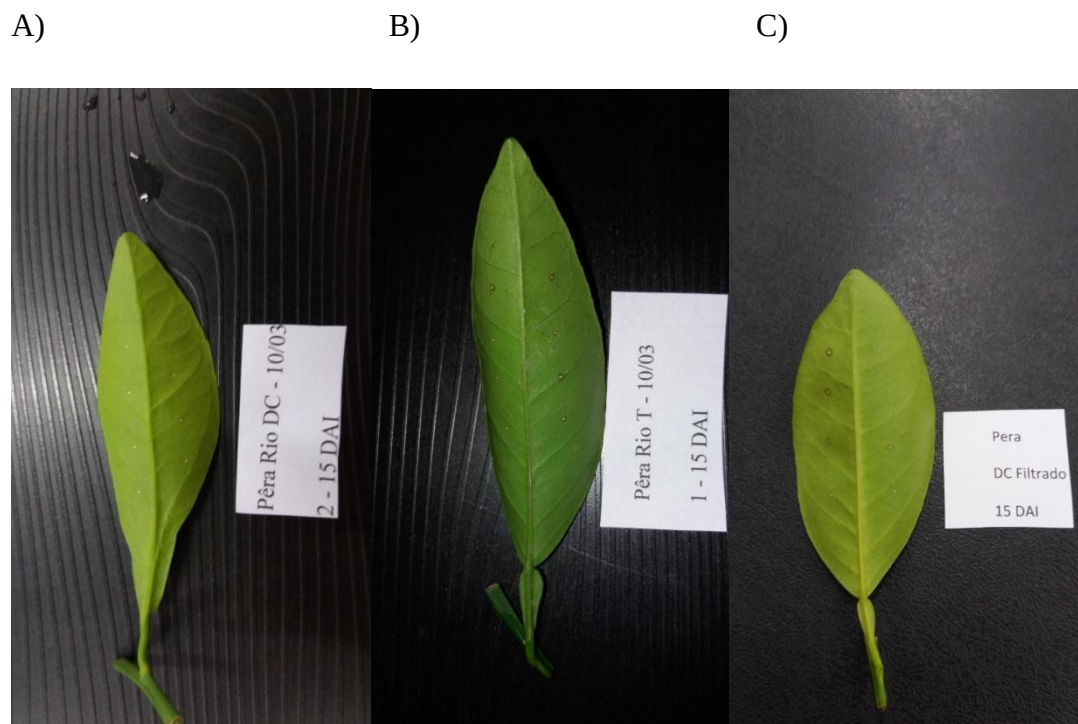
Para as diferentes dosagens testadas, a dose comercial (10 L ha^{-1}) do biofertilizante ativado quando comparada ao diâmetro de lesão, apresentou melhores resultados. Esses resultados sugerem que os microrganismos ativos na composição do produto, e pela característica ácida do produto, tornam o ambiente desfavorável para o desenvolvimento da bactéria causadora do cancro cítrico. Mesmo possuindo alta acidez, as lesões na concentração filtrada apresentaram maiores diâmetros, por se tratar de um adubo biológico, fornece nutrientes e auxilia no desenvolvimento do patógeno. Portanto os agentes de biocontrole presentes na concentração ativada proporcionaram uma competição com o patógeno, inibindo seu desenvolvimento. Esses agentes de biocontrole causam uma competição nutricional com o patógeno, interferindo no seu desenvolvimento e sem causar danos a planta (ULLOA-OGAZ et al., 2015).

Kupper et al (2006) também observaram que doses de biofertilizantes no controle da mancha preta do citros acima da dosagem comercial, não significam um melhor controle da doença, resultados semelhantes aos obtidos no controle da *X.citrisubsp. citri*.

O aumento da concentração e o período de fermentação para ativação do produto podem interferir no desenvolvimento dos microrganismos. Por possuir alta concentração de leveduras, importantes para a fermentação e ativação de outros microrganismos como actinomicetos, importantes antagonistas para o crescimento e desenvolvimento de fungos e bactérias, a concentração ativa faz com que esses agentes de biocontrole tenham atuação direta no desenvolvimento fitopatogênico (MEDEIROS; LOPES, 2006; SILVA et al., 2007).

A aplicação de produtos orgânicos varia de 0,1 a 5% do produto diluído em água, devido a elevada composição de nutrientes e de microrganismos que em excesso podem provocar estresse na planta, prejudicando sua produtividade (PINHEIRO; BARRETO, 1996; MEDEIROS; LOPES, 2006).

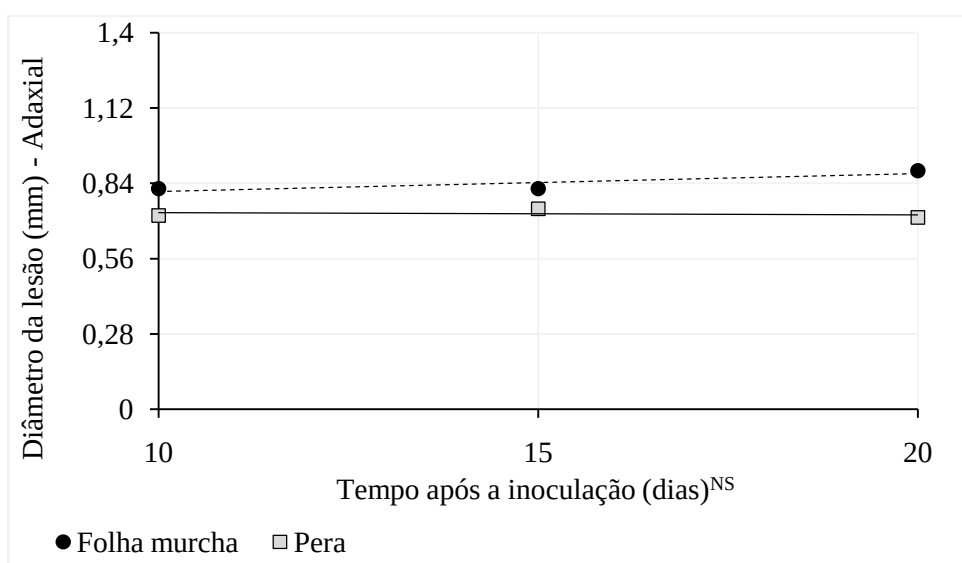
Figura 7 Teste de inoculação de *Xantomonascitrissubsp. citri* em folhas destacadas da variedade Pera com aplicação do biofertilizante em dose comercial (DC) ativado (A), testemunha (B) e filtrado (C).



Fonte: Reis, 2017.

Quando comparados os DAI nas duas faces da folha de acordo com a média geral do tamanho de lesão entre as variedades testadas, a face abaxial não apresentou diferença estatística entre as variedades, já na face adaxial a variedade Pera, apresentou menores diâmetros de lesão conforme os dias foram aumentando (Figura 8).

Figura 8 Diâmetro de lesão de *Xanthomonascitrisubsp. citri* na face adaxial de folhas destacadas, comparada com os dias após a inoculação de duas variedades de laranja doce (Folha Murcha e Pera)



A variedade Folha Murcha apresentou uma média de diâmetro de lesão maior do que a média da variedade Pera. Os resultados apresentados por Gonçalves-Zuliani et al (2016) comparando a resistência de diferentes variedades de laranja doce, demonstraram que a variedade Pera IAC, houve modificações no diâmetro da lesão entre 7 e 13 DAI. Já nos resultados apresentados, a variedade Pera não houve alterações no diâmetro da lesão. Portanto o biofertilizante aplicado sobre as lesões pode interferir no desenvolvimento do patógeno. Uma das hipóteses que pode ser trabalhada, é de que o fator pH e os agentes de biocontrole tenham interferido na divisão celular da bactéria fitopatogênica, impedindo o seu desenvolvimento e consequentemente o tamanho das pústulas.

Vários citricultores utilizam o biofertilizante testado em suas lavouras, porém não existe uma comprovação científica do seu mecanismo de ação na cultura. Um dos

motivos pode ser que pelo fato da sua alta acidez e por se tratar de um produto fermentado, essas variações podem causar um estresse na planta, interrompendo seu processo vegetativo e acelerando o reprodutivo, portanto a frutificação é acelerada.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados apresentados demonstraram que o biofertilizante, pode atuar como um auxiliador no controle do patógeno, pois sua composição possui efeito de inibição no desenvolvimento da bactéria. Entretanto, o uso de biofertilizante para controle do cancro cítrico ainda é pouco estudado.

Nas avaliações em folhas destacadas, os resultados demonstraram que a escolha de variedades mais resistentes é de grande importância para o manejo da doença e que a composição ativada do produto, pode diminuir o tamanho de lesão ocasionado pela bactéria. Portanto se torna uma alternativa sustentável para auxiliar no manejo da doença.

O uso de biofertilizantes deve ser testado em diferentes métodos de aplicações e fases de controle do patógeno, acreditando-se de que os agentes de biocontrole possam reforçar o controle de diferentes patógenos causadores de doenças prejudiciais a agricultura.

Portanto o biofertilizante pode atuar como um auxiliador no controle do cancro cítrico, um controle biológico que pode ser conciliado com o químico, visando menores prejuízos causados pela doença na cultura.

5 CONCLUSÃO

Conclui-se que no teste *in vitro* do tamanho de unidades formadoras de colônias (UFC) em mm, o biofertilizante na composição ativada, prejudicou o desenvolvimento da bactéria *Xanthomonascitrisubsp. citri*.

No teste *in vivo* em folhas destacadas, a variedade Folha Murcha demonstrou ser mais suscetível ao patógeno e que em dose comercial (DC), o biofertilizante tanto na sua composição ativada, quanto microfiltrada, pode ser um auxiliador no controle da doença.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AENPR. **Agência de Notícias do Paraná.** Disponível em: <http://www.aen.pr.gov.br/modules/noticias/article.php?storyid=94334>. Acessado em 22/02/2018.

AMARAL, S. F. Providências para a erradicação do Cancro Cítrico. **O Biológico.** v.23, p.112-23, 1957.

AMARAL, A.M. **Cancro cítrico: permanente preocupação da citricultura no Brasil e no mundo.** Comunicado Técnico Embrapa, 2003.

BAILEY, K. L.; LAZAROVITS, G. Suppressing soil-borne diseases with residuemanagement and organic amendments. **Soil&TillageResearch**, v. 72, p. 169–180, 2003.

BEHLAU F.; BELASQUE JR. J.; BERGAMIM FILHO, A.; LEITE JR., R.P. Incidência e Severidade de Cancro Cítrico em Laranja ‘Pêra Rio’ sob Condições de Controle Químico e Proteção com Quebra-Vento. **Fitopatologia Brasileira.** v.32, n.4 p.311-17, Jul./Ago. 2007.

BITTENCOURT, A. A. O Cancro Cítrico. **O Biológico.** v.23, p.101-11, 1957.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Laranja, Terceiro Levantamento.** Brasília: CONAB, p.11, 2013.

D’ANDREA, P. A.; MEDEIROS, M. B. **Biofertilizantes biodinâmicos na nutrição e proteção de hortaliças.** In: CONGRESSO BRASILEIRO DE AGRICULTURA ORGÂNICA, NATURAL, ECOLÓGICA E BIODINÂMICA, 1, 2002, Piracicaba. Anais... Piracicaba: Agroecológica, 2002.

FERRARI, E.; VALIATI, S.; SHIOMI, H.F. Efeito de biofertilizantes no biocontrole de *Penicillium* sp. em laranja “pêra”. **Scientific Electronic Archives**, Sinop, v.1, p.1-5, 2012.

GIMENES-FERNANDES, N.; BARBOSA, J. C.; AYRES, A. J.; MASSARI, C. A. Plantas doentes não detectadas nas inspeções dificultam a erradicação do cancro cítrico. **Citrus**, p. 175, 2000.

GONÇALVES-ZULIANI, A.M.O. **Avaliação da resistência de diferentes genótipos de laranja doce (*Citrus sinensis*) ao cancro cítrico e estudo da diversidade genética de *Xanthomonas citri* subsp. *citri***. 2014. 149p. Tese (Doutorado). Universidade Estadual de Maringá, 2014.

GONÇALVES-ZULIANI, A.M.O.; CARDOSO, K.A.K.; BELASQUE, JR. J.; ZANUTTO, C.A.; HASHIGUTI, H.T.; BOCK, C.H.; NAKAMURA, C.V.; NUNES, W.M.C.

Reaction of detached leaves from different varieties of sweet orange to inoculation with *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Summa Phytopathologica**, v.42, n.2, p.125-133, 2016.

HRIDYA, A. C.; BYJU, G.; MISRA, R. S. Effect of biocontrol agents and biofertilizers on root rot, yield, harvest index and nutrient uptake of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 59, n. 9, 2013.

JESUS, JR.W; BELASQUE JR. J.; AMORIM, L.; CHRISTIANO, R.S; PARRA, J.R; BERGAMIM FILHO, A. Injuries caused by citrus leafminer (*Phyllocnist citrella*) exacerbate citrus canker (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*) infection. **Fitopatologia Brasileira**. v.31, p.277-283, 2006.

KIM, S. H.; VUJANOVIC, V. Relationship between mycoparasites lifestyles and biocontrol behaviors against *Fusarium* spp. and mycotoxins production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, p. 5257-5272, 2016.

KUPPER, K. C.; BETTIOL, W.; DE GOES, A; DE SOUZA, P. S., BELLOTTE, J. A. M. Biofertilizer for control of *Guignardia citricarpa*, the causal agent of citrus black spot. **Crop Protection**, v. 25, p. 569–573, 2006.

KUSTER, E.; WILLIAMS, S. T. **Selective media for the isolation of Streptomycetes**. Nature, London, UK, v. 202, p. 928-929, 1964.

MEDEIROS, M. B; LOPES, J. S. Biofertilizantes líquidos e sustentabilidade agrícola. **Bahia Agríc.**, v.7, n.3, nov. 2006.

MISAGHI, I. J.; STOWELL, L. J.; GROGAN, R. G.; SPEARMAN, L. C., **Fungistatic activity of water-soluble fluorescent pigments of fluorescent pseudomonads.** *Phytopathol.*,v.72, p.33-36, 1982

PONTECORVO, G. et al. The genetics of *Aspergillus nidulans*. **Advances in Genetics**, San Diego, n.5, p.141-238, 1953.

SYLVESTER-BRADLEY, R.; ASAKAWA, N.; LA TORRACA, S.; MAGALHÃES, F.M.M.; OLIVEIRA, L.A. & PEREIRA, R.M. **Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fosfatos na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazônia.** *Acta Amazon.*, 12:15-22, 1982.

TRATCH, R.; BETTIOL, W. Efeito de biofertilizantes sobre o crescimento micelial e germinação de esporos de alguns fungos fitopatogênicos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, 32: 1131-1139, 1997.

ULLOA-OGAZ, A. L.; MUÑOZ-CASTELLANOS, L. N.; NEVÁREZ-MOORILLÓN, G. V. Biocontrol of phytopathogens: Antibiotic production as mechanism of control. In: **The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs**, Edition: 1st, Publisher: Formatex, Editors: Méndez-Vilas A., p.305-309, 2015.

VARGAS, R.G.; GONÇALVES-ZULIANI, A.M.; FILHO, J.C.; CARVALHO, S.A.; NOCCHI, P.T.R.N.; NUNES, W.M.C. Avaliação da resistência de variedades de *Citrus* spp. à *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. Na região Noroeste Paranaense, em condições de campo. **Summa Phytopathol.** Botucatu, v.39, n.4, p.235-41, 2013.

VINALE, F.; SIVASITHAMPARAM, K. GHISALBERTI, E. L.; MARRAA, R.; WOOA, S. L.; LORITO, M. *Trichoderma*–plant–pathogen interactions. **Soil Biology & Biochemistry**, v.40, p. 1–10, 2008.