

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE POS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

**OTIMIZAÇÃO DO MANEJO DA PINTA PRETA CAUSADA POR
Guignardia citricarpa Kiely NA PRODUÇÃO ECOLÓGICA DE
TANGERINAS cv. MONTENEGRINA SOB A ÓTICA DA PESQUISA
PARTICIPATIVA**

**Juliana Dalmagro Pandolfo
Bióloga, MSc (UFRGS)**

Tese apresentada como um dos requisitos à obtenção
do Grau de Doutor em Fitotecnia
Ênfase em Fitopatologia

Porto Alegre (RS), Brasil
Janeiro de 2011

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Julio Cesar Pandolfo e Maria Elizabete Dalmagro Pandolfo, pelo apoio, pelos conselhos e incentivo. E, principalmente, pelo amor que sempre me deram.

Ao meu orientador Fábio Kessler Dal Soglio, por me apresentar outra maneira de ver a pesquisa em Fitopatologia, pelos ensinamentos e conselhos para o desenvolvimento desse trabalho.

Aos agricultores participantes desta pesquisa, pela convivência durante três anos de trabalho.

À Ecocitrus, à Associação Companheiros da Natureza e à EMATER de Montenegro/ RS.

Aos bolsistas de iniciação científica, Alexandre Matusiak, Gabriela Chesim, Lauren Pettenon, Lucas da Rocha e Rafael Nunes, pela contribuição na construção dessa tese.

À Daniela Pacífico e Juliane Marques de Souza pela breve, mas fundamental, participação nesse projeto.

Ao professor Emerson Del Ponte pela ajuda com as análises estatísticas.

À todos os professores do Departamento de Fitossanidade da UFRGS, pela disponibilidade e ensinamentos.

Às minhas amigas e doutoras em Fitotecnia, Isabel Padula Paz e Rita

Madail Santin.

À Cândia Montero pelo auxílio para realização do experimento em pós-colheita.

Às minhas irmãs de coração Alice e Andréa Fogaça Monteiro, pelo apoio, pela conversas, conselhos e risadas.

Ao meu grande amigo Eduardo Diehl Fleig, por estar ao meu lado em todos os momentos dessa caminhada.

Aos meus amigos amados, Alexandre Rambo de Moura, André Rigo, Camila Rocha e Loise Teigão, por me acolherem em um momento difícil, pela convivência, pelos incontáveis momentos de diversão, pelo apoio e ajuda indispensáveis durante esses últimos meses. Vocês tornam a minha vida menos ordinária.

À Julia Fernandes, secretária do Departamento de Fitossanidade.

À secretária do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Marisa Carvalho Bello, pela atenção dispensada em todo o período.

À todas as pessoas que, de alguma maneira, colaboraram para construção deste trabalho.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela oportunidade de realização do Curso de Doutorado.

À Capes, pela bolsa concedida.

**OTIMIZAÇÃO DO MANEJO DA PINTA PRETA CAUSADA POR
Guignardia citricarpa Kiely NA PRODUÇÃO ECOLÓGICA DE
TANGERINAS cv. MONTENEGRINA SOB A ÓTICA DA PESQUISA
PARTICIPATIVA**

Autora: Juliana Dalmagro Pandolfo

Orientador: Prof. Dr. Fábio Kessler Dal Soglio

RESUMO

No Rio Grande do Sul cultiva-se diversas espécies cítricas, destacando-se o município de Montenegro, no Vale do Café/RS. Para a produção de frutas destinadas ao consumo *in natura*, a maioria dos citricultores adota pacotes tecnológicos que consistem no uso de insumos químicos e na simplificação do ambiente. No entanto, experiências de citricultores ecológicos demonstram ser possível produzir citros usando métodos de manejo que dispensam agrotóxicos ou fertilizantes químicos. Entretanto eles enfrentam dificuldades no manejo da pinta preta dos citros, causada pelo fungo *Guignardia citricarpa* Kiely. Essa doença deprecia o aspecto visual e quando em alta severidade, causa queda de frutos. A utilização de microrganismos no biocontrole pode interromper algum estágio da doença ou do ciclo de vida do patógeno. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo gerar, junto com os agricultores, uma tecnologia de controle biológico da pinta-preta do citros, além de encontrar, problemáticas do controle da doença e soluções para estas, e gerar metodologias de baixo custo para o cultivo de microrganismos e adequadas às condições locais. Foram isolados microrganismos da microflora nativa de pomares agroecológicos. Esses microrganismos foram testados *in vitro* e *in vivo* quanto ao seu potencial antagônico ao fitopatógeno e quanto a sua patogenicidade ao citros, respectivamente. Duas leveduras e uma bactéria (em processo de identificação) foram selecionadas para serem avaliadas em pomares quanto a sua eficiência ao controle da pinta-preta dos citros. Um isolado *T. koningii*, TC01, foi testado em 11 pomares orgânicos de tangerineiras cv. Montenegrina e avaliado em três desses pomares. O isolado foi eficiente no controle da pinta preta. O TC01 foi cultivado em sete substratos alternativos para sua produção massal, o composto da Ecocitrus, composto biodinâmico e meio sólido com suco de laranja se destacaram pelo fácil acesso, baixo custo e alta eficiência no desenvolvimento do antagonista. O projeto de pesquisa participativa fez com que os agricultores observassem seus pomares e criassem autonomia para buscar soluções adequadas e testar diferentes formas de manejo.

¹ Tese de Doutorado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (162p), Janeiro, 2011.

OPTIMIZATION OF MANAGEMENT TECHNIQUES OF BLACK SPOT (*Guignardia citricarpa* Kiely.) IN ECOLOGICAL ORCHARDS OF TANGERINE TREES cv. MONTENEGRINA FROM THE PERSPECTIVE OF PARTICIPATORY RESEARCH¹

Author: Juliana Dalmagro Pandolfo

Mentor: Prof. Dr. Fábio Kessler Dal Soglio

ABSTRACT

In the state of Rio Grande do Sul many citric species are grown, the town of Montenegro, in Vale do Caí/RS stands out among the most important producers. For the production of fruits for *in natura* consumption most of the local farmers adopt technological packages that consist in the use of chemical inputs and in environmental simplification. However, experiments of ecological farmers in this region demonstrated that it is possible to produce citrus using management methods that exempt the use of pesticides or chemical fertilizers. However, they face difficulties in the management of citrus black spot, caused by the fungus *Guignardia citricarpa* Kiely. This illness depreciates the visual aspect and, when in high severity, causes the fall of the fruits. The usage of microorganisms for the control of illnesses can interrupt a stage of the illness or the pathogen life cycle. In this sense, this work has the aim of creating, together with the farmers, a technology of citrus black spot biological control using microorganisms with antagonistic potential, as well as finding problematics of illness control and solutions for them, and also, create low-cost methodologies to the growth of microorganisms appropriate to local conditions. Microorganisms of the native microflora of agroecological orchards were isolated. These microorganisms were tested *in vitro* and *in vivo* regarding their antagonistic potential to the phytopathogen and regarding their pathogenicity to citrus, respectively. Two yeasts and one bacterium (in process of identification) were selected to be evaluated in orchards regarding their efficiency in citrus black spot control. An isolated *T. Koningii*, TC01, was tested in eleven organic orchards of tangerine trees cv. Montenegrina and was evaluated in three of these orchards. The isolated was efficient in the control of black spot. TC01 was cultivated in seven alternative substrates to its massive production, Ecocitrus compound, biodynamic compound, and solid medium with orange juice stood out for their easy access, low cost and high efficiency in the development of the antagonist. The project of participatory research allowed the farmers to observe their orchards and to create autonomy in the search of appropriate solutions and to test different ways of management.

¹ Doctoral thesis in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (162p), Janeiro, 2011.

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO.....	01
2 CAPÍTULO I.....	06
REVISÃO DE LITERATURA.....	06
2.1 Agroecologia.....	06
2.2 Desenvolvimento Rural Sustentável.....	09
2.3 Metodologias Participativas.....	11
2.4 Citros.....	13
2.4.1 A citricultura ecológica no Rio Grande do Sul.....	14
2.4.2 A pinta preta dos citros.....	16
2.4.2.1 Ocorrência.....	16
2.4.2.2 Etiologia.....	17
2.4.2.3 Sintomatologia.....	18
2.4.2.4 Epidemiologia.....	20
2.4.3 Controle da pinta preta dos citros.....	23
2.4.4 Métodos culturais para controle da pinta preta dos citros.....	23
2.4.5 Métodos biológicos para controle da pinta preta dos citros.....	24
2.5 Microrganismos epifíticos.....	28
2.6 Microrganismos endofíticos.....	30
2.7 O fungo <i>Trichoderma</i> sp.....	31
3 CAPÍTULO II.....	36
ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS DA MICROFLORA NATIVA DE POMARES ECOLÓGICOS DO VALE DO CAÍ/RS E AVALIAÇÃO DESTES QUANTO AO POTENCIAL ANTAGÔNICO A PINTA PRETA DOS CITROS.....	36
3.1 Introdução.....	36
3.2 Materiais e Métodos.....	38
3.2.1 Obtenção dos isolados endofíticos de <i>G. citricarpa</i>	38
3.2.2 Obtenção de microrganismos endofíticos.....	39
3.2.3 Obtenção de microrganismos epifíticos.....	40
3.2.4 Conservação de microrganismos.....	41
3.2.5 Confrontos entre isolados e o fungo <i>G. citricarpa</i>	41
3.2.6 Testes de patogenicidade.....	42
3.2.6.1 Testes de hipersensibilidade.....	42
3.2.6.2 Experimento em casa de vegetação.....	43
3.2.7 Avaliação do potencial antagônico dos microrganismos no controle de podridão causada por <i>Penicillium</i> sp., e conservação dos frutos em pós-colheita.....	44

	Página
3.3 Resultados e discussão.....	46
3.3.1 Obtenção dos isolados de <i>G. citricarpa</i>	46
3.3.2 Obtenção de microrganismos endofíticos.....	47
3.3.3 Obtenção de microrganismos epifíticos.....	48
3.3.4 Confrontos entre os microrganismos obtidos de tangerineiras cv. Montenegrina e o isolado <i>G. citricarpa</i>	49
3.3.5 Testes de patogenicidade – Reação de hipersensibilidade e experimento em casa de vegetação.....	53
3.3.6 Avaliação do potencial antagônico dos microrganismos no controle de podridão causada por <i>Penicillium</i> sp., e conservação dos frutos em pós-colheita.....	55
 4 CAPÍTULO III.....	 62
AVALIAÇÃO DO ISOLADO TCO1 DE <i>Trichoderma koningii</i> NO CONTROLE DA PINTA PRETA DOS CITROS (<i>Guignardia</i> <i>citricarpa</i>) EM TRES MICRO-REGIÕES DO VALE DO CAI/RS.....	62
...4.1 Introdução.....	62
4.2 Materiais e métodos.....	64
4.2.1 Sobre o isolado de <i>Trichoderma koningii</i> (isolado TC01).....	64
4.2.2 Produção massal do isolado TC01.....	64
4.2.3 Preparo da suspensão de esporos de TC01 para aplicação no campo.....	65
4.2.4 Aplicações do isolado TC01 em pomares de tangerineiras cv. Montenegrina.....	65
4.2.5 Desenvolvimento do isolado TC01 em meio de cultura com diferentes concentrações de cala sulfocálcica.....	66
4.2.6 Recuperação do isolado TC01 de frutos de tangerineiras cv. Montenegrina.....	67
4.2.7 Recuperação do isolado TC01 de folhas de tangerineiras cv. Montenegrina.....	68
4.2.8 Avaliação da flutuação sazonal de inoculo de <i>G. citricarpa</i>	69
4.2.9 Avaliação da incidência e severidade da pinta preta dos citros nos pomares de tangerineiras cv. Montenegrina.....	69
4.2.10 Avaliação dos agricultores quanto à eficiência do i isolado TC01 no controle da pinta preta dos citros.....	70
4.2.11 Dados meteorológicos.....	71
4.2.12 Análise estatísticas dos dados.....	71
4.3 Resultados e discussão.....	71
4.3.1 Desenvolvimento do isolado TC01 em meio de cultura com diferentes concentrações de cala sulfocálcica.....	71
4.3.2 Recuperação do isolado TC01 de cascas de frutos e folhas de tangerineiras cv. Montenegrina.....	73
4.3.4 Avaliação da flutuação sazonal de inoculo de <i>G. citricarpa</i>	76
4.3.5 Avaliação da eficiência do isolado TC01 no controle da pinta preta dos citros em pomares de tangerineiras cv. Montenegrina.....	79

	Página
5 CAPÍTULO IV.....	87
SUBSTRATOS ALTERNATIVOS PARA A PRODUÇÃO MASSAL DO ISOLADO TC01 DO FUNGO <i>Trichoderma koningii</i>	87
5.1 Introdução.....	87
5.2 Materiais e métodos.....	89
5.2.1 Composto Ecocitrus e composto Biodinâmico.....	90
5.2.2 Cactos (<i>Opuntia</i> sp.).....	91
5.2.3 Suco de laranja.....	92
5.2.4 Calda de bagaço de laranja.....	93
5.2.5 Bagaço de cana de açúcar.....	94
5.2.6 Batata doce (<i>Ipomea batatas</i>).....	95
5.2.7 Arroz quirera.....	95
5.3 Resultados e discussão.....	96
6 CAPÍTULO V.....	103
UTILIZAÇÃO DE MÉTODOS PARTICIPATIVOS NO CONTROLE BIOLÓGICO DA PINTA PRETA DOS CITROS.....	103
6.1 Introdução.....	103
6.2 Grupo de Citricultora Ecológica.....	105
6.3 Desenvolvimento participativo do manejo agroecológico da pinta preta dos citros em comunidades do Vale do Cai/RS – Projeto Pinta Preta.....	108
6.4 Oficinas e reuniões realizadas durante a pesquisa.....	111
6.5 Resultados e discussão.....	127
6.6 Conclusões.....	133
6.7 Considerações sobre a pesquisa participativa em Fitopatologia.....	137
6.7.1 Um breve relato da experiência.....	137
6.7.2 Uma nova formação de profissionais.....	140
7 CONCLUSÕES.....	144
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	145
ANEXOS.....	158

RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
3 CAPÍTULO II	
1 Critérios de avaliação utilizados para avaliação das mudas que receberam aplicação dos microrganismos.....	44
2 Microrganismos epifíticos isolados a partir de folhas da copa e do solo de tangerineiras cv. Montenegrina.....	49
3 Média dos diâmetros das colônias do fungo <i>G. citricarpa</i> quando confrontados com fungos filamentosos isolados a partir de tangerineiras cv. Montenegrina.....	51
4 Média dos diâmetros das colônias do fungo <i>G. citricarpa</i> quando confrontados com leveduras e bactérias isoladas a partir de tangerineiras cv. Montenegrina.....	52
5 Avaliação da incidência de laranjas cv. Valência apresentando podridões pós-colheita tratados com leveduras e com o isolado TC01, após 5 e 7 semanas em câmara de crescimento.....	57
6 Incidência de frutos com sintomas de podridão, sólidos solúveis totais e acidez total titulável em tangerinas cv. Montenegrina armazenadas por 15 dias a 20°C±2°.....	58
7 Incidência de frutos com sintomas de podridão, sólidos solúveis totais e acidez total titulável em tangerinas cv. Montenegrina armazenadas por 3 semanas a 5°C±2°C.....	58
4 CAPÍTULO III	
1. Análise de variância por medidas repetidas para as variáveis relacionadas à propriedade, altura e data, no período de junho a outubro de 2010.....	77
2. Análise de variância mista (PROC GLIMMIX) entre efeitos fixos apresentando diferença significativa entre os efeitos Tratamento e Altura, quando avaliados em relação à incidência da pinta preta dos citros.....	81
3. Análise de variância mista (PROC GLIMMIX) entre efeitos fixos, não apresentando diferença significativa, quando avaliados em relação a severidade da pinta preta dos citros.....	83
5 CAPÍTULO IV	
1. Peso do micélio seco dos tratamentos com suco e calda de laranja ...	100
2. Avaliação do desenvolvimento do isolado TC01 em diferentes substratos, utilizando uma escala de notas para análise visual.....	101
3. Contagem de esporos do isolado TC01 quando cultivado em substratos alternativos.....	102

RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
3 CAPÍTULO II	
1. Isolado de <i>G. citricarpa</i> obtido de lesões na casca de tangerinas cv. Montenegrina.....	47
2. Fragmentos de casca de frutos de tangerineiras cv. Montenegrina apresentando desenvolvimento de <i>Colletotrichum</i> sp.....	48
3. Confronto entre isolado 12 de <i>Trichoderma</i> sp e <i>G. citricarpa</i> . Desenvolvimento do agente de biocontrole sobre o fitopatógeno (A); Detalhe do isolado 12 desenvolvendo-se sobre o patógeno.....	53
4. Confrontos entre o isolado lev54 e o fitopatógeno <i>G. citricarpa</i>	53
5. Teste de hipersensibilidade em folhas de fumo (<i>Nicotiana tabacum</i>) para verificar a patogenicidade das leveduras e bactéria com potencial antagônico a <i>G. citricarpa</i>	54
6. Mudanças referentes aos tratamentos, após cinco semanas de inoculação com os microrganismos.....	55
4 CAPÍTULO III	
1. Garrafa plástica contendo suspensão de esporos do fungo <i>T. koningii</i> , isolado TC01, na concentração 1×10^7 para ser entregue aos agricultores.....	66
2. Caça-esporos nas alturas 1,0m e 0,5m (A). Detalhe da placa de Petri dentro do caça-esporos (B).....	70
3. Desenvolvimento do isolado TC01 em meio de cultura BDA suplementado com calda sulfocálcica a 0,5% (A), 0,8% (B) e 1% (C).....	73
4. Desenvolvimento do fungo <i>Trichoderma</i> sp. em fragmentos de casca de frutos de tangerineiras cv. Montenegrina que receberam aplicações do isolado TC01.....	74
5. Fragmentos de folhas de tangerineiras var. Montenegrina tratadas (A) Luis; (B) Ademar; (C) Antônio, apresentando desenvolvimento de <i>Trichoderma</i> sp.; e fragmentos de folhas de tangerineiras var. Montenegrina não tratadas (D) Luis; (E) Ademar; (F) Antônio, não apresentando desenvolvimento de <i>Trichoderma</i> sp.....	76
6. Box Plot da flutuação de inóculo de <i>G. citricarpa</i> , com amostragens quinzenais do período de junho a outubro de 2010. Linha no Box indica o valor da mediana. Linha superior do Box representa o quartil superior (75%). A linha inferior do Box representa o quartil inferior (25%). As linhas externas ao Box representam os percentis superior (95%) e inferior (5%). Os pontos representam os valores extremos da distribuição.....	78

7. Box Plot apresentando as diferenças na incidência da pinta preta dos citros, quando relacionada aos tratamentos (A) e quando relacionada a altura da copa (B). Linha no Box indica o valor da mediana. Linha superior do Box representa o quartil superior (75%). A linha inferior do Box representa o quartil inferior (25%). As linhas externas ao Box representam os percentis superior (95%) e inferior (25%).	82
8. Severidade da pinta preta dos citros nas três propriedades amostradas.	84

5 CAPÍTULO IV

1. Desenvolvimento do isolado TC01 no composto Ecocitrus (A); Desenvolvimento do isolado TC01 no composto preparado segundo a biodinâmica (B).	98
2. Desenvolvimento do isolado TC01 em meio BDA. Tratamento esterilizado suplementado com açúcar e não agitado (a); Tratamento esterilizado suplementado com açúcar e agitado (b).	98
3. Desenvolvimento miscelial do isolado TC01 em meio de cultura a base de suco de laranja suplementado com açúcar (a) e não suplementado (b).	99
4. Desenvolvimento miscelial do isolado TC01 em meio de calda de casca e bagaço de laranja não suplementado com açúcar (a) e suplementado com açúcar (b).	100
5. Desenvolvimento do isolado TC01 em meio de calda de casca e bagaço de laranja suplementado com açúcar (a) e não suplementado (b).	101
6. Desenvolvimento do isolado TC01 em meio de cultura com suco de laranja (A) e em meio de cultura com batata doce (B).	101

6 CAPÍTULO V

1. Esquema ilustrativo do processo, até a formação do Grupo de Pesquisa Participativa.	108
2. Esquema ilustrativo do processo durante o Projeto Pinta Preta.	111
3. Oficina para elaboração do calendário de atividades para o primeiro semestre de 2009.	113
4. Oficina para elaboração do calendário de atividades para o primeiro semestre de 2009.	113
5. Fluxograma que reflete a percepção dos citricultores quanto ao ciclo de vida do fungo <i>G. citricarpa</i> .	116
6. Fluxograma que reflete a percepção dos citricultores quanto ao ciclo de vida do fungo <i>G. citricarpa</i> .	117
7. Equipe da UFRGS e grupos de agricultores-pesquisadores discutindo os critérios de avaliação no pomar.	118
8. Equipe da UFRGS e grupos de agricultores-pesquisadores discutindo os critérios de avaliação no pomar.	118
9. Elaboração da ferramenta de avaliação pela equipe da UFRGS e pelos grupos dos agricultores.	119

10. Elaboração da ferramenta de avaliação pela equipe da UFRGS e pelos grupos dos agricultores.....	119
11. Construção do calendário de atividades para o segundo semestre de 2009 e início de 2010.....	121
12. Reunião dos grupos participantes do projeto de pesquisa. Oficina de avaliação no pomar do Maique.....	122
13. Reunião dos grupos participantes do projeto de pesquisa. Oficina de avaliação no pomar do Maique.....	122
14. Ferramenta de avaliação do Projeto Pinta Preta. Percepções dos agricultores-pesquisadores.....	124
15. Ferramenta de avaliação do Projeto Pinta Preta. Percepções dos agricultores-pesquisadores.....	124
16. Painéis elaborados para ilustrar os resultados da avaliação realizada pela equipe da UFRGS.....	125
17. Painéis elaborados para ilustrar os resultados da avaliação realizada pela equipe da UFRGS.....	125
18. Participantes do Projeto Pinta Preta executando ferramenta.....	127
19. Painel gerado no final da ferramenta.....	127

LISTA DE ABREVIATURAS

BDA.....	Batata – Dextrose - Agar
CAPES.....	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CNPq.....	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DRP.....	Diagnóstico Rural Participativo
ECOCITRUS.....	Cooperativa de Citricultores Ecológicos de Vale do Caí
GCE.....	Grupo de Citricultura Ecológica
EMATER.....	Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural
EMBRAPA.....	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
UCS.....	Universidade de Caxias do Sul
UFRGS.....	Universidade Federal do Rio Grande do Sul

1 INTRODUÇÃO

As plantas cítricas, compreendidas principalmente por laranjeiras, tangerineiras, limoeiros, limeiras, pomeleiros e toranjeiras, desempenham um papel de acentuada importância sócio-econômica mundial. No Brasil, a citricultura ocupa lugar de destaque, tendo como principais produtores os Estados de São Paulo, Bahia, Sergipe, Rio Grande do Sul e Minas Gerais.

No Rio Grande do Sul, são cultivados principalmente laranjeiras, tangerineiras e limoeiros. Em 2009, a área colhida foi de 41 mil ha gerando uma produção de 515,6 mil toneladas (IBGE, 2010). A maior parte da produção provém da região do Vale do Rio Caí, onde se destaca o município de Montenegro, considerado a capital gaúcha da citricultura e berço da tangerina cv. Montenegrina.

Entre os sistemas de produção adotados no Estado, destaca-se o sistema convencional, baseado no elevado uso de insumos sintético-industriais e o sistema de produção orgânico, baseado na produção de alimentos com menor impacto ao ambiente agrícola, utilizando princípios ecológicos de manejo e desenho de agroecossistemas, valorizando também o conhecimento local e empírico dos agricultores (Gliessman, 2000). Embora o Estado apresente condições favoráveis para a produção de frutas para o consumo *in natura*, a maioria dos citricultores gaúchos adota pacotes tecnológicos. A utilização desses pacotes é uma prática questionável, considerando os prejuízos à saúde de

agricultores e consumidores e ao meio ambiente, além dos elevados custos na produção (Dal Soglio *et al.*, 2006).

Diante desta realidade, alguns agricultores do Vale do Rio Caí começaram a utilizar métodos de manejo que dispensa o uso de agrotóxicos ou fertilizantes químicos industriais. A partir dessa iniciativa, em 1994, um grupo de quinze agricultores familiares, que defendiam um modelo de desenvolvimento regional fundamentado na produção de base familiar e ecológica, fundou a Cooperativa de Citricultores Ecológicos do Vale do Caí (Ecocitrus) que tem por objetivo desenvolver uma agricultura sustentável, que viabilize a produção do pequeno agricultor com menores impactos negativos para o meio ambiente (Dal Soglio *et al.*, 2006; Guimarães, 2008).

A citricultura ecológica inclui práticas integradas de manejo como o uso de caldas, fertilizantes orgânicos, o monitoramento de insetos através de armadilhas, a movimentação mínima no solo, o controle de ervas nativas e a utilização de resíduos naturais (Lopes, 1997). Há experiências de citricultores ecológicos dessa região que demonstram ser possível produzir citros com o emprego de métodos de manejo que dispensam agrotóxicos ou fertilizantes químicos (Dal Soglio *et al.*, 2006), entretanto ainda enfrentam dificuldades no manejo da pinta preta dos citros, principalmente em anos favoráveis a doença.

A pinta preta dos citros, causada pelo fungo *Guignardia citricarpa* Kiely, representa um entrave para a comercialização de frutos *in natura*, uma vez que deprecia o aspecto visual e quando em alta severidade, causa queda de frutos. O manejo desta doença, realizado pelos agricultores da Cooperativa de Citricultores Ecológicos do Vale do Caí, tem sido realizado através da aplicação de calda bordaleza (0,5% de sulfato de cobre). Entretanto, em anos de condições

climáticas favoráveis para a doença, a eficiência do controle é baixa, uma vez que a ação protetora da calda bordaleza é afetada pela lixiviação do ingrediente ativo pela água das chuvas; pela abertura de espaços sem proteção no fruto através de seu rápido crescimento e pela elevada liberação de conídios e ascósporos do fungo causador da doença.

A utilização de microrganismos para o biocontrole de doenças pode interromper algum estágio da doença ou do ciclo de vida do patógeno através de diversos mecanismos tais como parasitismo, produção de antibióticos e enzimas hidrolíticas, e competição por nutrientes e nichos de colonização. Para o controle biológico do fungo *G. citricarpa*, diferentes agentes de biocontrole estão sendo descobertos em todo mundo, como a levedura *Saccharomyces cerevisiae* Hansen, (Pascholati, 1998), *Trichoderma koningii* Rifai (Guimarães, 2008), assim como outros fungos e bactérias. Agentes de controle biológico, que atuam parasitando os patógenos, competindo com eles por espaço ou alimentos, ou produzindo compostos antibióticos, podem ser amplamente encontrados em diferentes ambientes. Isso indica que estão, também, adaptados aos diferentes ambientes e por isso o seu uso deveria ser limitado às condições ecológicas similares aos dos ambientes em que são isolados.

Assim, é necessária a utilização de diferentes abordagens metodológicas do desenvolvimento de tecnologias que respondam à necessidade de redução dos problemas fitossanitários de forma ecologicamente responsável e, que ao mesmo tempo, possibilitem a melhor participação, de forma autônoma e dinâmica. Uma abordagem tem base pesquisa participativa, que neste trabalho tem perspectiva da geração de tecnologias para o manejo da pinta preta.

A adoção de métodos participativos na pesquisa Fitopatológica, que

incorporem a participação das comunidades, dos agricultores e da sociedade em geral no desenvolvimento de métodos de controle de doenças pode aproximar esta ciência da perspectiva do desenvolvimento sustentável e contribuir para a construção do conhecimento agroecológico da localidade de pesquisa em questão.

Sendo assim, as hipóteses desta pesquisa foram: (i) é possível desenvolver uma tecnologia de controle biológico utilizando métodos participativos; (ii) microrganismos da microflora nativa podem ser eficientes no biocontrole de *G. citricarpa* em diferentes microregiões do Vale do Rio Caí. Para tentar provar às hipóteses, o objetivo geral da pesquisa foi desenvolver, através de métodos participativos, métodos de manejo de controle biológico da pinta preta do citros. A pesquisa teve como objetivos específicos: (i) desenvolver uma estratégia de pesquisa participativa para manejo de doenças de plantas; (ii) isolar microrganismos de folhas e frutos de tangerineiras cv. Montenegrina e testar *in vitro* seu potencial antagônico ao agente causal da pinta preta; (iii) avaliar os microrganismos isolados quanto a sua patogenicidade às plantas cítricas; (iv) testar *in vivo* o fungo *T. koningii* em diferentes regiões do Vale do Rio Caí; (v) elaborar um método, junto com os agricultores, para que eles possam avaliar os tratamentos em seus pomares; (vi) comparar, através de análises epidemiológicas, os tratamentos com o fungo *T. koningii* em diferentes pomares de tangerineiras cv. Montenegrina infectados pelo fungo *G. citricarpa*.

Esta tese está estruturada da seguinte maneira: o primeiro capítulo é referente à revisão bibliográfica dos conteúdos abordados. Nos capítulos dois, três e quatro são apresentados os experimentos realizados em laboratório, casa

de vegetação e no campo. Todos os experimentos tiveram o objetivo de responder os questionamentos dos agricultores participantes desta pesquisa. O capítulo cinco, e último, é dedicado a pesquisa participativa.

2 CAPÍTULO I

REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Agroecologia

Na última década, a referência constante à Agroecologia, que se constitui em mais uma expressão sócio-política do processo de ecologização, nos faz lembrar de estilos de agricultura menos agressivos ao meio ambiente, que promovem a inclusão social e proporcionam melhores condições econômicas aos agricultores. Nesse sentido, são comuns as interpretações que vinculam a Agroecologia com uma vida mais saudável, com o ato de trabalhar no meio ambiente, preservando-o, ou a inda com um novo equilíbrio nas relações homem e natureza, entre outras. Assim, o uso do termo Agroecologia tem trazido a idéia e a expectativa de uma nova agricultura capaz de fazer bem ao homem e ao meio ambiente (Caporal & Costabeber, 2004).

Entretanto, se mostra cada vez mais evidente uma profunda confusão no uso do termo Agroecologia, gerando interpretações conceituais que, em muitos casos, prejudicam o entendimento da Agroecologia como ciência que estabelece as bases para a construção de estilos de agriculturas sustentáveis e de estratégias de desenvolvimento rural sustentável (Caporal & Costabeber, 2004).

A construção do conceito de Agroecologia ainda desperta muitas interpretações devido à sua abrangência e interdisciplinariedade. Alguns autores têm colaborado efetivamente para a construção deste conceito (Altieri, 1989;

Norgaard, 1989; Guzmán & Molina, 1996; Altieri *et al.*, 1998). Neste trabalho, o conceito utilizado foi o de Caporal & Costabeber (2002) que definem a Agroecologia como um enfoque científico destinado a apoiar a transição dos atuais modelos de desenvolvimento rural e de agricultura convencionais para estilos de desenvolvimento rural e de agriculturas sustentáveis.

Caporal *et al.* (2006) afirmam que a Agroecologia vem se constituindo na ciência basilar de um novo paradigma de desenvolvimento rural, que tem sido construído ao longo das últimas décadas e, que isto ocorre entre outras razões, porque a Agroecologia se apresenta como uma matriz disciplinar integradora, totalizante, holística, capaz de aprender e aplicar conhecimentos gerados em diferentes disciplinas científicas.

A Agroecologia tem sido difundida na América Latina, em outros países e no Brasil, em especial, como sendo um padrão técnico-agronômico capaz de orientar as diferentes estratégias de desenvolvimento rural sustentável, avaliando as potencialidades dos sistemas agrícolas através de uma perspectiva social, econômica e ecológica. O objetivo maior da agricultura sustentável – que sustenta o enfoque agroecológico – é a manutenção da produtividade agrícola com o mínimo possível de impactos ambientais e com retornos econômico-financeiros adequados à meta de redução da pobreza assim atendendo às necessidades sociais das populações rurais (Altieri, 2009).

As condições culturais e comunitárias em que estão imersos os agricultores, sua identidade local e suas práticas sociais são elementos centrais para a concretização e apropriação social de suas práticas e métodos. A Agroecologia, como instrumento do desenvolvimento rural sustentável, é fundada nas experiências produtivas da agricultura ecológica, para elaborar

propostas de ação social coletiva que enfrentam a lógica produtiva do modelo agroindustrial hegemônico, para substituí-lo por outro, que orienta para a construção de uma agricultura socialmente justa, economicamente viável e ecologicamente sustentável. Ela envolve o pesquisador na realidade que estuda, ao aceitar, em pé de igualdade com seu conhecimento científico, os saberes locais gerados pelos agricultores (Leff, 2002).

Portanto, a Agroecologia reconhece e se nutre dos saberes, conhecimentos e experiências dos agricultores, bem como dos demais atores sociais envolvidos em processos de desenvolvimento rural, incorporando o potencial endógeno. No enfoque agroecológico, o potencial endógeno constitui um elemento fundamental e ponto de partida de qualquer projeto de transição agroecológica, na medida em que auxilia na aprendizagem sobre os fatores sócio-culturais e agroecossistêmicos que constituem as bases estratégicas de qualquer iniciativa de desenvolvimento rural ou de desenho de agroecossistemas que visem alcançar patamares crescentes de sustentabilidade (Caporal *et al.*, 2006).

A produção estável somente pode acontecer no contexto de uma organização social que proteja a integridade dos recursos naturais e estimule a interação harmônica entre os seres humanos, o agroecossistema e o ambiente (Altieri, 2009). A Agroecologia faz uso das ferramentas metodológicas necessárias para que a participação da comunidade venha a se tornar a força geradora dos objetivos e atividades dos projetos em desenvolvimento. O objetivo é que os agricultores se tornem os arquitetos e atores de seu próprio desenvolvimento (Chambers, 1983).

2.2 Desenvolvimento Rural Sustentável

Até os séculos XVIII e XIX, com a disseminação do sistema de rotação, o processo de inovação agrícola caracterizou-se por tecnologias, como a rotação de culturas e a integração entre atividades de produção vegetal e animal, que respeitavam o ambiente a partir da utilização inteligente das próprias leis da natureza. Entretanto, a partir do século XIX, com a disseminação dos conhecimentos da química agrícola, esse processo teve sua lógica modificada e as regras ecológicas passaram a ser vistas como desnecessárias à prática agrícola por se considerar que o caráter ambientalmente agressivo da chamada agricultura moderna era um mal necessário e que podia ser moderado com algumas práticas conservacionistas (Assis, 2005; Romeiro, 1996).

A “Revolução Verde”, ocorrida nas décadas de 1960 e 1970, foi fundada, basicamente, em princípios de aumento da produtividade através do uso intensivo de insumos químicos, de variedades de alto rendimento melhoradas geneticamente, da irrigação e da mecanização, criando a idéia que passou a ser conhecida como “pacote tecnológico”. Vários problemas, entretanto, ocorreram nesse período, especialmente quanto à desigualdade social e à sustentabilidade (econômica e ecológica) da produção agrícola a longo prazo (Almeida, 1997).

Ao longo do tempo, a palavra desenvolvimento foi utilizada com sentidos diversos que variaram de acordo com a época em que foram postulados. No contexto do desenvolvimento sustentável, o que se apresenta atualmente é a conjugação do crescimento econômico com as preocupações sociais e ambientais. Hoje, sabe-se da impossibilidade de prosseguir com padrões de consumo altamente elevados que utilizam os recursos naturais de

forma desordenada em nome da alta produtividade. A busca pela satisfação dos nossos desejos de consumo faz com que se esgotem rapidamente tais recursos, provocando profundas alterações nos ecossistemas (Kummer, 2007).

Um conceito oficial de Desenvolvimento Sustentável surge a partir do Relatório Brundtland, em 1987, onde o crescimento econômico passa a ser contrastado com a noção de sustentabilidade e se difunde a idéia de que, para ser *sustentável*, o desenvolvimento necessita compatibilizar crescimento econômico, distribuição da riqueza e preservação ambiental, tarefa considerada por muitos como inviável ou mesmo impossível. Conforme essa orientação, o “desenvolvimento sustentável é aquele que satisfaz as necessidades da geração presente sem comprometer a capacidade das gerações futuras para satisfazer suas próprias necessidades” (Costabeber & Caporal, 2003).

No meio rural, o exercício de práticas sustentáveis começam na pequena propriedade de cada agricultor familiar. Desta forma, fica estabelecido, na prática, a idéia do local que influencia o global, na medida em que o indivíduo deve se enxergar como parte de um processo mais amplo no qual suas ações, por menores que pareçam, serão responsáveis pelas alterações de qualidade de vida das gerações futura (Kummer, 2007).

Sabe-se que a noção de desenvolvimento sustentável supõe o estabelecimento de estilos de agricultura sustentável que não podem ser alcançados unicamente pela transferência de tecnologias. A transição agroecológica demanda a necessidade de construção de conhecimentos sobre distintos agroecossistemas e variedades de sistemas culturais e condições econômicas o que determina que a extensão rural, como um dos instrumentos de apoio ao desenvolvimento rural, adote objetivos, estratégias, metodologias e

práticas compatíveis com os requisitos desse processo (Caporal, 2003).

A ação em apoio a estratégias de desenvolvimento local e à transição em direção a estilos de agricultura sustentável precisa partir do entendimento da agricultura como um processo permanente de aprendizagem e aplicação prática e que considere a co-evolução natural do homem com o ambiente e as transformações dos agroecossistemas têm lugar dentro de um sistema planetário finito, de modo que alguns recursos naturais, uma vez utilizados no processo de desenvolvimento, não estarão disponíveis por uma segunda vez, o que exige nova abordagem do desenvolvimento rural (Caporal, 2003).

Na caminhada em direção ao desenvolvimento rural sustentável é necessário um conjunto de inovações tecnológicas, bem como novas abordagens dos problemas agrários contemporâneos, entendendo que não haverá agricultura ou desenvolvimento rural de base sustentável a margem de uma sociedade igualmente sustentável. Na perspectiva de análise adotada, a diversidade sociocultural e ecológica aparece como um componente fundamental, e nunca dissociável, da incorporação de estratégias de ação apoiadas em metodologias participativas, elementos estes tão caros ao enfoque agroecológico (Caporal, *et al.*, 2006).

2.3 Metodologias Participativas

A partir da década de 80, com o processo de redemocratização do país, o termo participação passou a ser utilizado como palavra-chave, especialmente para dar legitimidade às ações realizadas por organizações e instituições políticas e sociais, assim como em outras (Souza, 2009).

Segundo Gomes *et al.* (2001), o conceito de participação, no âmbito dos

processos de diagnósticos e planejamentos participativos, pressupõe divisão do poder no processo decisório, passando pelo controle das partes sobre a execução e a avaliação dos resultados pretendidos. Ou seja, participar neste caso, é tomar parte das decisões e ter parte dos resultados.

Nesse contexto recente de promoção da participação popular de políticas, se destaca o surgimento de uma infinidade de técnicas e metodologias participativas para diagnosticar e, especialmente, planejar as novas propostas para o desenvolvimento socioeconômico do país (Souza, 2009). Uma das metodologias participativas mais utilizada é o chamado DRP (Diagnóstico Rápido/Rural Participativo), com origem nos trabalhos de Robert Chambers, nos Estados Unidos (Gomes *et al.*, 2001). A metodologia prega, além de maior rapidez na obtenção de dados importantes para a promoção do desenvolvimento socioeconômico de populações rurais, a participação ativa dos beneficiários envolvidos no processo e uma multidisciplinariedade técnica. O DRP tem sido utilizado, cada dia mais, por diversas entidades e organizações em processos de diagnóstico e planejamento rural (Souza, 2009).

Um processo participativo deve proporcionar a oportunidade de auto-avaliação de si e da cultura do grupo a que pertence, capacidade reflexiva sobre os efeitos de vida cotidianos, capacidade de criar e recriar não somente objetivos materiais, mas também criar e recriar formas novas de vida e convivência social. As técnicas de diagnóstico e planejamento participativo devem valorizar, por sua vez, o processo de obtenção de informações. É importante que esse processo seja um fator de formação e discussão política no seio da comunidade. Os dados devem ser utilizados pela própria comunidade (Souza, 2009).

A participação popular é uma das bases da Agroecologia, e esta participação é que permite a união entre os saberes populares e científicos, fundamental para o alcance de uma agricultura mais ecológica e sustentável. E para tanto, o avanço das metodologias participativas de assistência técnica e extensão rural (ATER) é parte importante da estratégia agroecológica (Ribeiro *et al.*, 2010). Segundo Souza (2009), as metodologias participativas devem ser utilizadas como norteadores do desenvolvimento dos trabalhos, priorizando-se fundamentalmente, a possibilidade de expressão dos participantes.

As abordagens e métodos participativos representam uma oportunidade para construir melhores ligações entre os vários atores e melhorar o conhecimento de uns pelos outros. Além disso, quando são utilizados o Diagnóstico Rápido Participativo e outros métodos participativos, extensionistas, pesquisadores e agricultores têm a oportunidade de trabalhar em conjunto, formando uma mesma equipe. Nessa troca de experiências e conhecimentos se alcança algum tipo de consenso com os agricultores sobre o que é mais necessário. Ademais os agricultores participantes tendem a confiar mais nos profissionais e na possibilidade de que esses lhes ajudem “sem impor soluções” (Pretty & Vodouchê, 1997).

2.4 Citros

Os citros compreendem um grande grupo de plantas do gênero *Citrus* e outros gêneros afins (*Fortunella* e *Poncirus*) ou híbridos da família Rutaceae, representado, na maioria, por laranjas (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), tangerinas (*Citrus reticulata* L. e *Citrus deliciosa* Tenore), limões (*Citrus limon* (L.) Burm.), limas ácidas como o Tahiti (*Citrus latifolia* Tanaka) e o Galego (*Citrus*

aurantiifolia (Christm.) Swingle), e doces como a lima da Pérsia (*Citrus limettioides* Tanaka), pomelo (*Citrus paradisi* Macfad), cidra (*Citrus medica* L.), laranja-azeda (*Citrus aurantium*) e toranjas (*Citrus grandis* L. Osbeck). São originários principalmente das regiões subtropicais e tropicais do sul e sudeste da Ásia, incluindo áreas da Austrália e África. Foram levados para a Europa na época das Cruzadas. Chegaram ao Brasil, trazidos pelos portugueses, no século XVI (Mattos Jr. *et al.*, 2008).

A classificação botânica mais utilizada, segundo Koller (1994) baseia-se na proposta por Tanaka em 1954. As plantas cítricas pertencem à subfamília *Aurantioideae*, gênero *Citrus*. A tangerineira cv. Montenegrina (*C. deliciosa*) pertence ao subgrupo mediterrâneo que produzem frutos pouco coloridos, de casca relativamente fina e de fácil remoção; os gomos são facilmente destacáveis e com elevado número de sementes (Koller, 1994).

2.4.1 A citricultura ecológica no Rio Grande do Sul

A citricultura do Rio Grande do Sul está concentrada, principalmente, nos Vales do Caí e Taquari, nos municípios de Montenegro, São Sebastião do Caí, General Câmara, Triunfo e Taquari (Koller, 1994). A produção anual de frutas cítricas no Rio Grande do Sul é de aproximadamente, 750 mil toneladas e baseia-se, principalmente, em pomares de exploração familiar que possuem em média, dois a três ha. Embora o estado apresente condições favoráveis para a produção de frutas *in natura*, a maioria dos citricultores gaúchos adota pacotes tecnológicos que consistem no uso de insumos químicos e na simplificação do ambiente – práticas questionáveis, considerando os prejuízos à saúde de agricultores e consumidores e ao ambiente, além dos elevados custos de

produção (Dal Soglio *et al.*, 2006). A preocupação com os impactos sócio-ambientais tem estimulado o surgimento de propostas como a agricultura ecológica, cujo objetivo é promover a sustentabilidade ecológica e social além da viabilidade econômica (Paulus, 2001).

A agricultura ecológica além de aumentar a produtividade e diminuir os custos da produção, contribui para o controle da poluição, o reaproveitamento de resíduos industriais e reduz problemas de pragas e enfermidades (Lutzenberger, 1985). O manejo ecológico da flora de cobertura protege o solo contra erosão, melhora o microclima, fortalece a estrutura e a fertilidade do solo e elimina insetos e patógenos.

Em 1994, foi formada a Cooperativa de Citricultores Ecológicos do Vale do Caí (Ecocitrus) por quinze agricultores familiares que defendiam um modelo de desenvolvimento regional fundamentado na produção de base familiar e ecológica. A cooperativa tem por princípio o protagonismo dos agricultores em toda a cadeia produtiva de citros. A citricultura ecológica inclui práticas como o uso de caldas, fertilizantes orgânicos, o monitoramento de insetos através de armadilhas, a movimentação mínima do solo, o manejo de ervas nativas e a utilização de resíduos industriais (Lopes, 1997).

Suas ações no campo da pesquisa participativa se iniciaram em 2000, com recursos do projeto de pesquisa por demanda, do Programa RS Rural¹ da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado do Rio Grande do Sul, articulando técnicos da Emater/RS, professores e estudantes do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

¹ O programa RS Rural foi desenvolvido pelo Governo do Rio Grande do Sul, com o objetivo de promover o desenvolvimento rural através de ações às comunidades rurais. O programa teve início em 1997 decorrente de empréstimo com o BIRD (Banco Internacional para Reconstrução e Desenvolvimento) e encerrou em 2005. Fonte: www.emater.tche.br/site/area/rsrural.php

O processo foi motivado, inicialmente, pela demanda dos agricultores associados à E cocitrus, que desejavam validar cientificamente as tecnologias que vinham adotando. Os participantes desse projeto autodenominaram-se Grupo de Citricultura Ecológica (GCE), que atualmente, reúne mais cooperativas e associações de citricultores, inclusive de produção convencional, além da Embrapa Clima temperado (Dal Soglio *et al.*, 2006). Há experiências de citricultores ecológicos dessa região que demonstram ser possível produzir citros com o emprego de métodos de manejo que dispensam agrotóxicos ou fertilizantes químicos (Dal Soglio *et al.*, 2006), entretanto eles enfrentam dificuldades no manejo da pinta preta dos citros, principalmente em anos de clima favorável a doença.

2.4.2 A Pinta preta dos citros

2.4.2.1 Ocorrência

A pinta preta dos frutos cítricos (*Citrus* sp.) foi relatada, inicialmente, em 1895 na Austrália, causando perdas consideráveis na variedade Valência, tanto nos frutos ainda nos pomares como em fase de pós-colheita (Sutton & Waterson, 1966). Em 1925, foi constatada na província de Natal, na África do Sul (Doidge, 1929). Nos anos posteriores, ela foi detectada em diversos continentes como Ásia, África e América do Sul (Feichtenberger *et al.*, 1997).

No Brasil, a pinta preta foi descrita inicialmente no Estado de São Paulo, a partir de frutas cítricas coletadas em uma feira livre do município de Piracicaba, em 1940 (Averna-Saccá, 1940). No estado do Rio Grande do Sul, a doença foi descrita em 1986, no Vale do Caí, onde, atualmente causa sérios prejuízos para a citricultura (Feichtenberger & Góes, 1998).

A pinta preta dos citros é de grande importância econômica, pois causa depreciação estética dos frutos e acarreta prejuízos na comercialização dos frutos *in natura* no mercado externo em decorrência das barreiras fitossanitárias impostas pelos países como Estados Unidos e a Comunidade Européia. Quando ocorre alta infecção na região do pedúnculo de frutos em desenvolvimento pode haver queda prematura refletindo desta maneira na produção (Aguilar-Vildoso, 2002).

2.4.2.2 Etiologia

A pinta preta dos citros é uma doença de origem fúngica cuja fase sexual ou perfeita foi descrita em 1948 (Kiely, 1948), sendo denominada *Guinardia citricarpa* Kiely cuja forma assexual ou imperfeita corresponde a *Phyllosticta citricarpa* (McAlp.) Van der Aa. A fase assexuada foi a primeira a ser descrita, em 1889 por McAlpine (McOnie, 1964), mas inicialmente denominada *Phoma citricarpa* McAlpine (Robbs, 1990).

O fungo *G. citricarpa* possui dois tipos de esporos. Os esporos sexuados (ascósporos) se desenvolvem em pseudotécios somente nas folhas de citros em decomposição no solo (Fundecitros, 2000). Os pseudotécios são isolados ou agregados, globosos, imersos, de cor castanho-escura a preta, com 95-125 µm de diâmetro e pseudoparáfises ausentes. Os ascos são cilíndricos-clavados (40-64 x 12-15 µm), de parede bitunicada, contendo oito ascósporos unicelulares, hialinos, multigutulados, cilíndricos com o centro dilatado e apêndices hialinos nas duas extremidades obtusas (Baldassari *et al.*, 2000).

A fase assexual representada por *P. citricarpa*, produz picnídios em lesões nos ramos, frutos e folhas e em folhas em decomposição. Os picnídios

são solitários, às vezes agregados, globosos, com 115-190 µm de diâmetro, de coloração marrom escura para preta, ostíolo levemente papilado, circular e com 12-14,5 µm de diâmetro. Os conídios possuem formato obovóide para elíptico, hialinos, unicelulares, com um apêndice hialino em uma das extremidades, base truncada e medem 8-10,5 x 5,5-7 µm. O conidióforo é cilíndrico e alongado com 9 µm de comprimento (Baldassari *et al.*, 2000).

2.4.2.3 Sintomatologia

Os órgãos atacados podem ser em ordem de maior para menor frequência: frutos, folhas, pedúnculos, pecíolos, ramos verdes e espinhos. Uma das principais características desta doença é a ausência de sintomas típicos nos tecidos vegetais mesmo estando infectados (Aguilar-Vildoso, 2002). Nos frutos, as lesões produzidas ficam estritas ao flavedo (epicarpo), desfavorecendo a comercialização de frutas *in natura*, no entanto, não alcançam o albedo (mesocarpo) do fruto (Góes, 1998).

O surgimento dos sintomas pode demorar até um ano (fase latente), dependendo da variedade e das condições ambientais. O aparecimento é favorecido pela luminosidade combinada com altas temperaturas, sendo comum encontrar frutos com maior número de lesões na fase exposta à luz do sol. A pinta preta dos citros apresenta vários tipos de sintomas, podendo variar dependendo do tamanho, fase de maturação do fruto, condições climáticas e tipo de esporo responsável pela infecção (Fundecitros, 2000).

O sintoma mais comum da pinta preta dos citros é a mancha preta ou mancha dura, que surge na época da maturação externa. As lesões são deprimidas, com bordos bem definidos, com centros acinzentados e pontos

escuras que constituem as frutificações (picnídios). Nos frutos verdes as lesões apresentam um halo amarelado ao seu redor. Frutos colhidos assintomáticos podem apresentar os sintomas posteriormente, porém apresentam áreas deprimidas e pontuações negras (Fundecitrus, 2000).

A falsa melanose se apresenta como uma lesão pequena e com numerosos pontos escuros ao seu redor. Frequentemente este tipo de lesão é confundido com a doença melanose dos citros, que tem como agente causal o fungo *Diaporthe citri*. A diferença entre as lesões está na textura: a melanose é áspera enquanto na pinta preta é lisa (Fundecitros, 2000).

A mancha rendilhada apresenta lesões superficiais sem bordas definidas e textura lisa, que aparecem quando os frutos ainda estão verdes, podendo atingir grande parte da superfície. A mancha trincada é superficial e ocorre em pequeno número em frutos ainda verdes. Quando o fruto amadurece, a lesão trinca e está sempre associada ao ácaro da falsa ferrugem (*Phyllocoptruta oleivora*) (Fundecitros, 2000).

A mancha marrom ou sardenta é levemente deprimida e avermelhada, com bordos definidos e formato irregular, normalmente não apresenta frutificações do patógeno. Aparece em frutos maduros e também na pós-colheita. Frutos já contaminados, mas sem sintomas, podem expressar lesões durante o armazenamento ou transporte. A mancha virulenta é resultado da fusão dos diferentes tipos de sintomas. Caracteriza-se pela formação de lesões grandes que podem tomar grandes áreas do fruto no decorrer do desenvolvimento, são escuras ou de coloração marrom, com ou sem frutificações, de formato irregular podendo ser deprimidas ou não. Geralmente, surge no final da safra quando os frutos estão maduros, e com ocorrência de

altas temperaturas (Góes, 1998; Fundecitros, 2000).

As folhas podem apresentar sintomas caracterizados por lesões de centro acinzentado, com bordos salientes marrom-escuros e circundados por um halo amarelado. As lesões em folhas são frequentemente observadas em tangerineira e limoeiros verdadeiros, e raramente em plantas de pomelo (Góes, 1998; Fundecitrus, 2000).

2.4.2.4 Epidemiologia

Segundo Kotzé (1988), os fatores que afetam a epidemiologia da pinta preta dos citros são a quantidade de inóculo disponível, as condições climáticas, o ciclo de crescimento da planta cítricas e estágio de desenvolvimento do fruto.

O ciclo da doença é bem definido, possuindo os ciclos primário e secundário. No ciclo primário, a fase sexual da *G. citricarpa*, cujas estruturas infectivas são os ascósporos, responsáveis pela introdução do patógeno nas áreas e início das epidemias a cada ciclo da cultura. Os ascósporos são formados somente em folhas caídas e em decomposição, cujo tempo de formação depende das condições climáticas, variando de 40 a 180 dias após a queda da folha (Kotzé, 1981; Alcoba, 2000). Os ascósporos liberados são ejetados em uma altura de 1 cm, carregados por correntes de ar e disseminados a longas distâncias. A produção de esporos sexuais no ciclo primário é de suma importância para a sobrevivência do fungo, devido à sua maior viabilidade genética e tolerância ao ressecamento.

Já, o ciclo secundário é caracterizado pela fase assexual do fungo (*P. citricarpa*), onde os conídios são responsáveis pelo incremento da doença na planta e ao seu redor (Aguilar-Vildoso, 2002). Na fase anamórfica, *P. citricarpa*

produz picnídios em lesões de frutos e folhas e ocasionalmente no pedúnculo de frutos. Em frutos maduros e folhas caídas, são produzidos picnídios, que por sua vez produzem conídios (Smith, 1996). Os conídios são as principais estruturas responsáveis pela disseminação do fungo à curta distância, e emergem de um ostíolo, envolvidos por uma substância muscilaginosa que é facilmente solubilizada e transportada pela água das chuvas, orvalho ou irrigação, atingindo a superfície de órgãos suscetíveis, podendo dessa forma iniciar novas infecções (Kotzé, 1981; Robbs *et al.*, 1985). Dessa forma, pode-se afirmar que os ascósporos são responsáveis pelo início da epidemia (aloinfecção) enquanto os conídios respondem pelo desenvolvimento da doença na planta (autoinfecção) (Kiely, 1948a,b; Aguilar-Vildoso, 2002).

Embora em alguns países, a doença tenha um comportamento monocíclico, sendo a infecção causada apenas por ascósporos, a exemplo do que ocorre na África do Sul e na Austrália, no Brasil o papel dos conídios é tão importante quanto os dos ascósporos (Kiely, 1948b; Kotzé, 1996). Na África do Sul e Austrália, devido à presença de florescimento e frutificação uniforme, é possível a colheita de uma safra antes que inicie o florescimento e a frutificação da safra seguinte (Kotzé, 1981) onde a descarga de ascósporo ocorre totalmente durante o estágio fenológico mais suscetível do hospedeiro, ou seja, na formação dos frutos (McOnie, 1967). No Brasil, a ocorrência da infecção por conídios é favorecida em virtude da presença de frutos maduros apresentando sintomas e, da presença de frutos jovens suscetíveis na mesma planta. Isso é observado principalmente em variedades que apresentam vários surtos de florescimento ou mesmo quando as condições climáticas favoreçam essa situação em variedades tardias (Silva-Pinhati *et al.*, 2009).

Segundo Kotzé (1981), o período crítico de suscetibilidade dos frutos para pinta preta dos citros ocorre desde a fase de chumbinho até cerca de seis meses após a queda das pétalas. Kotzé (1981) ressalta que a doença é severa em plantas mais velhas e com o envelhecimento do pomar de citros a incidência tende a aumentar. Na África do Sul, o período crítico para a infecção ocorre após a queda das pétalas e estende-se até quatro a cinco meses de desenvolvimento dos frutos. No Brasil, este período parece mais longo (Kotzé, 1988). De acordo com Baldassari *et al.*, (2001), a janela de suscetibilidade das laranjas ‘Natal’ e ‘Valência’ à infecção é de pelo menos seis meses.

Os esporos, sexuais e assexuais, germinam na superfície de órgãos suscetíveis e produzem tubo germinativo e apressório do qual se origina um delgado ‘grampo de penetração’ que penetra na cutícula, dando origem a uma pequena massa de micélio entre a cutícula e a epiderme do órgão infectado. Nessa região o micélio subcuticular quiescente do fungo pode permanecer dormente por até doze meses. Esta dormência ou infecção latente pode ser interrompida quando o fruto atingir seu tamanho final e ou quando a folha, já caída, começar a se decompor. O patógeno, então, cresce a partir do micélio subcuticular e coloniza tecidos mais internos, produzindo os sintomas típicos da doença (Kotzé, 1988).

Os mecanismos envolvidos no processo de formação destas infecções não são conhecidos. Porém, sabe-se que sintomas em níveis mais severos normalmente estão associados à elevação de temperatura por ocasião da maturação dos frutos, maior incidência de raios solares nos frutos mais expostos, estresse hídrico e debilidade das plantas resultante de vários fatores, como por exemplo, doenças e desequilíbrio nutricional, sendo as plantas mais

velhas e estressadas as mais afetadas pela pinta preta dos citros (Feichtenberger *et al.*, 1997).

2.4.3 Controle da pinta preta dos citros

Dentre as medidas clássicas de controle da pinta preta dos citros, são recomendadas o plantio de mudas saudáveis, a remoção de frutos temporões infectados antes do início da florada à fim de reduzir a fonte de inóculo, uso de irrigações no inverno para prevenir a queda excessiva de folhas (para o Estado de São Paulo), nutrição adequada e uso de fungicidas (Feichtenberger, *et al.*, 1997). As medidas de controle da pinta preta dos citros devem levar em consideração o período de suscetibilidade dos frutos e as fontes de inóculo do patógeno. A suscetibilidade do fruto ocorre até cerca de cinco meses após a queda das pétalas das flores. Em folhas, a suscetibilidade ao fungo ocorre até cerca da metade do seu tamanho final (quatro semanas de idade) (Aguilar – Vildoso, 2002).

No entanto, diversos problemas são associados à utilização frequente de agrotóxicos, tais como aquisição de resistência pelos fitopatógenos; deriva dos produtos ocasionando contaminações ambientais; riscos à saúde humana. Nos últimos anos, vem surgindo uma grande preocupação da sociedade em relação a estes problemas gerados pelo uso indiscriminado de agrotóxicos, incentivando, assim, a busca de alternativas mais sustentáveis e racionais para o controle da doença (Gullino & Kuijpers, 1994).

2.4.4 Métodos culturais para controle da pinta preta dos citros

O controle cultural visa manter a população dos patógenos a níveis

aceitáveis de danos nas áreas de produção. Este controle populacional deve-se ao fato de minimizar as condições favoráveis ao seu desenvolvimento e multiplicação, baseando-se em práticas agrícolas (Rodrigues, 2006).

O aparecimento de sintomas da pinta preta dos citros pode demorar de um a três anos, dependendo das condições ambientais. A manifestação dos sintomas é favorecida pela radiação solar combinada com altas temperaturas, sendo comum encontrar frutos com maior número de lesões na face exposta ao sol (Rodrigues, 2006). Nos locais com clima propício à ocorrência da doença, a expressão dos sintomas dos frutos deve ser minimizada mediante o manejo racional dos pomares, de tal forma que se tenham plantas em boas condições vegetativas, visando à redução da exposição dos frutos à influência direta dos efeitos dos raios solares, visto que as folhas senescentes, quando secas servem como suporte de multiplicação do inóculo. Dessa forma, todos os fatores que propiciam a queda de folhas devem ser suprimidos e o pomar deve estar sempre livre de restos culturais.

2.4.5 Métodos biológicos para controle da pinta preta dos citros

Várias são as definições sobre controle biológico, mas Cook & Baker (1983) o definem como sendo “a redução da soma de inóculo ou das atividades determinantes da doença provocada por um patógeno, realizada através de um ou mais organismos que não o homem”.

Recentemente, alguns pesquisadores têm voltado sua atenção para outras formas de controle. De acordo com Pascholati (1998), a utilização do controle biológico e a indução de resistência, poderiam representar estratégias interessantes. O controle biológico visa a utilização de técnicas que venham

manter a densidade populacional das espécies de microrganismos fitopatogênicos associadas à agricultura, em níveis economicamente e ecologicamente aceitáveis.

Nesse sentido, estudos vêm sendo realizados para desenvolver o controle biológico da pinta preta dos citros, como a utilização de *Saccharomyces cerevisiae* Meyen (Pascholati, 1998; Fialho, 2004). A utilização de fungos filamentosos e leveduras no controle das moléstias requer uma interrupção de algum estágio da doença ou do ciclo de vida do patógeno. Segundo Punja & Utkhede (2003), agentes biológicos podem atuar na prevenção da infecção, redução na colonização do tecido hospedeiro, redução da esporulação ou da sobrevivência do patógeno.

Vários são os mecanismos utilizados pelos agentes de biocontrole, como o parasitismo, antibiose e competição por nutrientes. Tais mecanismos interferem nos fatores de patogenicidade, como é o caso da produção de cisteína proteases por *Trichoderma harzianum* Rifai na inibição da atividade de enzimas hidrolíticas, em especial poligalacturonases, um importante fator de patogenicidade em muitos fungos (Elad & Kapat, 1999). Também, induzem resistência na planta hospedeira, como demonstrado por Rodov *et al.* (1994), onde levedura induziu a produção de fitoalexinas em citros. A competição por nutrientes e nichos de colonização também afetam os patógenos, como a ação de espécies do gênero *Trichoderma* e *Gliocladium* (Harman, 2000). É provável que os diferentes mecanismos atuem em sinergia durante a interação antagônica (Punja & Utkhede, 2003).

O controle biológico realizado nos campos de produção tem como objetivo, evitar a penetração dos patógenos nos tecidos de frutos e hortaliças e

seu posterior desenvolvimento durante o armazenamento (Bettiol & Ghini, 1995). As leveduras têm se mostrado promissoras no controle de doenças que ocorrem em pós-colheita, devido à facilidade de integrar o seu uso ao ambiente e o sistema usado para manejo das frutas (Wisniewski *et al.*, 1991). Determinadas leveduras apresentam o fator “killer”, um peptídeo tóxico capaz de inibir o crescimento de outros microrganismos (Young, 1982). Fungos filamentosos também podem ser suscetíveis às leveduras “killer”, constatando-se a ação de *S. cerevisiae* (Walker *et al.*, 1995) e *Sporobolomyces roseus* Kluyver et Van Niel (Janisiewicz *et al.*, 1994) entre as linhagens com maior potencial antagônico.

As espécies de leveduras mais citadas como agentes de controle biológico na pós-colheita de citros são: *Debaryomyces hansenii*, *Rhodotorula mucilaginosa* (Jørgensen) FC Harrison e *Candida oleophila* strain O (Valdebenito-Sanhueza, 2000). As leveduras têm sido os microrganismos preferencialmente utilizados quando o objetivo é a proteção de frutos destinados ao consumo *in natura*, pelo fato destes organismos não serem bons produtores de antibióticos, uma vez que estas substâncias são indesejáveis para a dieta do homem (Valdebenito-Sanhueza, 2000). O uso de leveduras também é justificado pelo fato destas serem muito abundantes entre as comunidades epifíticas (Wilson & Wisniewski, 1989), além de apresentarem maior adaptação a este nicho, caracterizado pelo alto potencial na colonização, competição por nutrientes e espaço (McLaughlin *et al.* 1990). As leveduras também parasitam e degradam hifas de fungos patogênicos, Valdebenito-Sanhueza (2000) relata esse efeito quando leveduras encontram-se aderidas nas hifas de fungo, bem como a elevada produção de glucanase a partir de diferentes fontes de carbono. A

levedura *Pichia guilliermondii* Wickerham inibe *Botrytis cinerea* Pers. e se adere fortemente ao micélio fúngico (Wisniewski *et al.*, 1991).

A superfície das plantas é colonizada por uma ampla variedade de gêneros de bactérias, leveduras e fungos filamentosos (Lindow & Brandl, 2003), denominados de microrganismos epifíticos ou do filoplano (Langvad, 1980). Dentre eles há dois grupos, os residentes que se multiplicam sobre a folha sem afetar o hospedeiro, e os ocasionais que apenas habitam o filoplano sem se reproduzirem (Lee & Hyde, 2002). Azevedo *et al.* (2002), consideraram que não existe uma exata distinção entre as categorias de microrganismos epifíticos, endofíticos e patogênicos, havendo sim, um gradiente com interfaces entre endófitos, epifíticos e patógenos. Segundo estes autores, a condição em que o microrganismo se encontrar pode determinar sua categoria, ou seja, um microrganismo epifítico pode ser eventualmente encontrado dentro de um vegetal (endófito) e em certas condições pode tornar-se um patógeno.

No entanto, a população epifítica é altamente influenciada pelas condições do filoplano como a disponibilidade de nutrientes. Neste ambiente, pode-se encontrar nutrientes essenciais ao desenvolvimento de muitos microrganismos, como exsudados foliares, resíduos orgânicos, grãos de pólen, secreções liberadas por afídios e outras substâncias. Os nutrientes inorgânicos encontrados nos lixiviados de órgãos das plantas incluem todos os minerais essenciais e alguns outros elementos comumente encontrados nas plantas, incluindo macro, microelementos e também uma grande soma de substâncias orgânicas como açúcares, aminoácidos, ácidos orgânicos, fenóis, vitaminas e reguladores de crescimento (Bettiol, 1991). Há também várias substâncias liberadas pelos esporos de fungos e metabólitos microbianos extracelulares

(Morris & Rouse, 1985). Assim sendo, mudanças neste ambiente e na disponibilidade de nutrientes conduzem a alterações no equilíbrio existente (Bettiol, 1997). Segundo Boddy & Wimpenny (1992), os fatores mais importantes que governam as variações na composição da microbiota epifítica das plantas são aqueles que também causam situações de estresse, como mudança nas condições de disponibilidade de nutrientes e de energia, acarretando significativa influência no estabelecimento dos microrganismos. O grupo de organismos dominantes em um momento continuará dominando se for o mais competitivo e sua substituição por outros dependerá do efeito das mudanças nutricionais e do ambiente sobre a sua população. Também é necessário que os organismos mostrem-se resistentes às ações de antagonismos entre as espécies, fato que governa a sobrevivência desses grupos, principalmente em substratos ricos em nutrientes. A relação entre hospedeiro e comunidade microbiana do filoplano, é influenciada pelo microclima na superfície das folhas, que variam mais rapidamente quando comparado ao ambiente da rizosfera, e pelas mudanças sazonais, fazendo com que esse habitat esteja em constante variação. A temperatura e a umidade variam amplamente na superfície foliar, e os microrganismos ficam expostos à dessecação e à luz solar, havendo exposição ao ar atmosférico e a riscos de serem removidos pela água da chuva (Blakeman, 1985).

2.5 Microrganismos epifíticos

A superfície das plantas é colonizada por uma ampla variedade de gêneros de bactérias, leveduras e fungos filamentosos (Lindow & Brandl, 2003), denominados de microrganismos epifíticos ou do filoplano (Langvad,

1980). Dentre eles há dois grupos, os residentes que se multiplicam sobre a folha sem afetar o hospedeiro, e os ocasionais que apenas habitam o filoplano sem se reproduzirem (Lee & Hyde, 2002). Azevedo *et al.* (2002) consideraram que não existe uma exata distinção entre as categorias de microrganismos epifíticos, endofíticos e patogênicos, havendo sim, um gradiente com interfaces entre endófitos, epifíticos e patógenos. Segundo estes autores, a condição em que o microrganismo se encontrar pode determinar sua categoria, ou seja, um microrganismo epifítico pode ser eventualmente encontrado dentro de um vegetal (endófito) e em certas condições pode tornar-se um patógeno.

No entanto, a população epifítica é altamente influenciada pelas condições do filoplano como a disponibilidade de nutrientes. Neste ambiente, pode-se encontrar nutrientes essenciais ao desenvolvimento de muitos microrganismos, como exsudatos foliares, resíduos orgânicos, grãos de pólen, secreções liberadas por afídios e outras substâncias. Os nutrientes inorgânicos encontrados nos lixiviados de órgãos das plantas incluem todos os minerais essenciais e alguns outros elementos comumente encontrados nas plantas, incluindo macro, microelementos e também uma grande soma de substâncias orgânicas como açúcares, aminoácidos, ácidos orgânicos, fenóis, vitaminas e reguladores de crescimento (Bettiol, 1991). Há, também, várias substâncias liberadas pelos esporos de fungos e metabólitos microbianos extracelulares (Morris & Rouse, 1985). Assim sendo, mudanças neste ambiente e na disponibilidade de nutrientes conduzem a alterações no equilíbrio existente (Bettiol, 1997). Segundo Boddy & Wimpenny (1992), os fatores mais importantes que governam as variações na composição da microbiota epifítica das plantas são aqueles que também causam situações de estresse, como

mudança nas condições de disponibilidade de nutrientes e de energia, acarretando significativa influência no estabelecimento dos microrganismos. O grupo de organismos dominantes em um momento continuará dominando se for o mais competitivo e sua substituição por outros dependerá do efeito das mudanças nutricionais e do ambiente sobre a sua população. Também, é necessário que os organismos mostrem-se resistentes às ações de antagonismos entre as espécies, fato que governa a sobrevivência desses grupos, principalmente em substratos ricos em nutrientes. A relação entre hospedeiro e comunidade microbiana do filoplano, é influenciada pelo microclima na superfície das folhas, que variam mais rapidamente quando comparado ao ambiente da rizosfera, e pelas mudanças sazonais, fazendo com que esse habitat esteja em constante variação. A temperatura e a umidade variam amplamente na superfície foliar, e os microrganismos ficam expostos à dessecação e à luz solar, havendo exposição ao ar atmosférico e a riscos de serem removidos pela água da chuva (Blakeman, 1985).

2.6 Microrganismos endofíticos

Os microrganismos endofíticos vivem no interior de tecidos e órgãos vegetais sem aparentemente causar danos aos seus hospedeiros (Azevedo et al., 2002). A colonização dos tecidos vegetais por microrganismos endofíticos ocorre pela transferência dos microrganismos já presentes nas plantas para as gerações seguintes através dos frutos e sementes, bem como pela entrada de microrganismos do solo logo após a germinação das sementes. Plantas adultas podem ser colonizadas pela entrada dos microrganismos pelos estômatos ou por fissuras nas folhas, caules e raízes (Strobel, 2003).

Os microrganismos endofíticos foram inicialmente descritos por Barry em 1866 (Azevedo *et al.*, 1998) entretanto, somente receberam a devida atenção nos últimos 20 anos, onde as pesquisas demonstraram que estes, até então considerados neutros, ou seja não causavam benefícios ou malefícios às plantas, desempenhavam um papel importante na proteção contra o ataque de doenças, insetos e animais herbívoros. Mais recentemente descobriu-se que os endófitos estariam também envolvidos no desenvolvimento das plantas aumentando sua taxa de crescimento, enraizamento e resistência a estresses bióticos e abióticos (Hallmann *et al.*, 1997) demonstrando assim, uma íntima relação evolutiva entre plantas e microrganismos endofíticos.

Os microrganismos endofíticos habitam um nicho ecológico semelhante àqueles ocupados por fitopatógenos, podendo assim, controlá-los por competição por nutrientes, produção de substâncias antibióticas, parasitando o patógeno ou mesmo induzindo a planta a desenvolver resistência à doenças. Na maior parte das espécies vegetais avaliadas, o mecanismo mais importante de controle biológico de doenças é a indução à resistência sistêmica por meio da aplicação de fungos e bactérias endofíticas. Nesse tipo de controle, a penetração ativa do microrganismo endofítico induz a planta a sintetizar compostos que atuam sobre os patógenos ou compostos que alteram a morfologia vegetal. Essas alterações morfológicas podem incluir espessamento da parede celular por deposição de lignina e glucanas e aumento da espessura da cutícula, bem como a síntese de fitoalexinas, dificultando a entrada do patógeno e seu desenvolvimento na planta hospedeira (Azevedo *et al.*, 2002).

2.7 O fungo *Trichoderma* sp.

Os fungos do gênero *Trichoderma* correspondem a fase anamórfica do gênero *Hypocrea* que pertence ao filo Ascomycota (Agrios, 1997). As espécies de *Trichoderma* geralmente são encontradas como componentes da microbiota em quase todos os tipos de solos, especialmente os orgânicos, incluindo a camada de húmus das florestas, solos agrícolas e pomares, podem viver saprofiticamente ou parasitando outros fungos (Roiger *et al.*, 1991).

Este fungo tem como características morfológicas o micélio, inicialmente de coloração branca e de crescimento rápido. Com o desenvolvimento, torna-se cotonoso e compacto com tufo verde escuro. A coloração da colônia é devida, geralmente, à coloração e a quantidade de conídios. Os conídios são unicelulares, de forma subglobosa, ovóide, elipsóide ou elíptico-cilíndrica, com textura lisa ou rugosa e coloração hialina para verde-amarelado até verde-escuro, sendo a última mais comum. Sua posição é uma forma de esfera, no ápice das fiáides. As fiáides têm forma de cantil com o centro dilatado e o ápice afilado, solitários ou em grupos, hialinos, formando um ângulo com os conidióforos. Os conidióforos são muito ramificados, solitários ou em tufo compacto, geralmente em formato cônico ou piramidal. Normalmente mostram-se eretos, formando um ângulo reto com a hifa vegetativa. As áreas conidiais apresentam-se em forma de faixas concêntricas de coloração verde (Melo, 1991).

Os fungos do gênero *Trichoderma* são micoparasitas necrotrófico eficazes no controle de inúmeros fungos fitopatogênicos, principalmente aqueles com estruturas de resistência consideradas difíceis de serem atacadas por microrganismos (Melo, 1998). Estudos indicam que a forma de ação do fungo como agente de controle biológico está baseada na competição por

nutrientes, produção de metabólitos antifúngicos, enzimas hidrolíticas da parede celular, quitinases, proteases e glucanases, bem como micoparasitismo (Papavizas, 1985; Melo, 1991).

As várias espécies de *Trichoderma* têm capacidade de produção de uma quantidade de enzimas líticas, como por exemplo, celulasas, hemicelulasas, glucanases, tanto extra quanto intracelularmente, conferindo-lhes uma excelente capacidade de degradação de celulose e, conseqüentemente, a degradação de paredes celulares de fungos, tornando-o um potencial competidor. Em solos com grande presença de compostos à base de celulose há um favorecimento ao aumento da densidade populacional de espécies de *Trichoderma* (Melo, 1991; Melo, 1996; Melo, 1998).

No micoparasitismo, o hospedeiro, no caso o patógeno, pode ser mantido vivo, micoparasita biotrófico, ou ser morto, micoparasita necrotrófico. Esta interação pode ser dividida em quatro fases: localização, reconhecimento, contato e penetração. A localização provavelmente deve-se aos estímulos químicos liberados pelo patógeno, que são detectados pelo antagonista. A partir disso, há um reconhecimento do patógeno pelo antagonista, seguido pelo contato através de enrolamento da hifa do antagonista em torno da hifa do patógeno. Posteriormente ocorre a penetração, pela formação de apressórios e pela ação de enzimas que degradam a parede celular (Melo, 1996).

Outro mecanismo de ação do gênero *Trichoderma* é a capacidade de certos isolados promoverem o crescimento de plantas e aumentarem a germinação e emergência de sementes (Melo, 1998). A promoção de crescimento pode ser induzida de diversas formas por fungos e bactérias: por produção de hormônios vegetais, por produção de vitaminas ou conversão de

materiais a uma forma útil para a planta, por absorção e translocação de minerais e por controle de patógenos. A aplicação de espécies de *Trichoderma* tem levado a aumentos significativos na porcentagem e na precocidade de germinação, no peso seco e na altura de plantas (Melo, 1996).

Alguns fatores ambientais podem afetar a ação antagonística de fungos do gênero *Trichoderma* sobre os patógenos, dentre eles a disponibilidade de água (umidade) e nutrientes, o pH, a temperatura e textura do solo. A importância da umidade do solo na atividade antagônica do gênero *Trichoderma* é variável, conforme a espécie em questão. De modo geral, em condições de solo bastante seco e extremamente úmido esta atividade é reduzida, tendo como condições mais adequadas solos ligeiramente úmidos a úmidos (Liu & Baker, 1980; Melo 1996).

Os níveis de pH também influenciam o parasitismo do gênero *Trichoderma*. Em geral espécies deste fungo são favorecido por valores mais baixos, ou seja, pH ácido (Chet & Baker, 1980; Papavizas, 1985). Chet & Baker (1981) verificaram incremento da supressividade às doenças do solo com pH de 5,1, quando comparado com pH em torno de 8,0, isso conseqüência de um favorecimento do desenvolvimento de espécies de *Trichoderma*, além de outros fungos.

Outro fator que pode influenciar na atividade antagonista do gênero *Trichoderma* é a temperatura, no entanto, há diferenças entre as espécies. Harman *et al.* (1980) verificaram que *Trichoderma* sp. foi eficiente contra *Rhizoctonia solani* entre temperaturas de 17 a 30°C.

A rizosfera ou zona próxima das raízes das plantas no solo é uma área com atividades biológicas bastante ativas, com efeitos diretos importantes sobre

as plantas como, por exemplo, sobre a nutrição das mesmas (Salgado *et al.*, 1999). Na rizosfera encontram-se microrganismos que podem promover o crescimento vegetal, e proteger o sistema radicular da infecção por patógenos, estando incluído nesse grupo fungos do gênero *Trichoderma*. Assim, o fungos do gênero *Trichoderma*, além de apresentar potencial como biocontrolador de patógenos, pode ter a capacidade de promover o crescimento vegetal e mostrar competência rizosférica (Melo, 1996).

3 CAPÍTULO II

ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS DA MICROFLORA NATIVA DE POMARES ECOLÓGICOS DO VALE DO CAÍ / RS E AVALIAÇÃO DESTES QUANTO AO POTENCIAL ANTAGÔNICO A PINTA PRETA DOS CITROS

3.1 Introdução

No Rio Grande do Sul, entre as plantas cítricas, são cultivados laranjeiras, tangerineiras, limoeiros e limeiras. A produção comercial ocorre, principalmente, nos vales dos Rios Taquari e Caí, onde se destaca o município de Montenegro, considerado a capital gaúcha da citricultura e berço da tangerina cv. Montenegrina (*Citrus deliciosa* Tenore). Em 2009 a área colhida foi de 41 mil ha gerando uma produção de 515,6 mil toneladas (IBGE, 2010). Embora o Estado apresente condições favoráveis para a produção de frutas para consumo *in natura*, a maioria dos citricultores gaúchos adota pacotes tecnológicos que consistem no uso de insumos químicos e na simplificação do ambiente – práticas questionáveis, considerando os prejuízos à saúde de agricultores e consumidores e ao meio ambiente, além dos elevados custos na produção.

Há experiências de citricultores ecológicos dessa região que demonstram ser possível produzir citros com o emprego de métodos de manejo que

dispensam agrotóxicos ou fertilizantes químicos (Dal Soglio *et al.*, 2006), entretanto ainda enfrentam dificuldades no manejo da pinta preta dos citros, principalmente em anos de clima favorável a doença. A pinta preta dos citros, causada pelo fungo *Guignardia citricarpa* Kiely, representa um entrave para a comercialização de frutos *in natura*, uma vez que deprecia o aspecto visual e quando em alta severidade, causa queda de frutos. Os citricultores ecológicos, normalmente utilizam a calda bordaleza (0,5% de sulfato de cobre) para o manejo da pinta preta, entretanto, em anos de condições climáticas favoráveis para a doença, a eficiência do controle é baixa, uma vez que a ação protetora da calda bordaleza é afetada pela lixiviação do ingrediente ativo pela água das chuvas; pela abertura de espaços sem proteção no fruto através de seu rápido crescimento e pela elevada liberação de conídios e ascósporos do fungo causador da doença.

O controle biológico baseia-se na supressão de fitopatógenos pela ação de microrganismos não patogênicos à planta, esses são conhecidos como inimigos naturais. Os trabalhos presentes na literatura revelam uma diversidade filogenética de microrganismos que podem atuar como agentes de biocontrole a diversos fitopatógenos (Rodrigues, 2006). Para o controle biológico do fungo *G. citricarpa*, diferentes agentes de biocontrole estão sendo descobertos em todo mundo, como a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, (Pascholati, 1998), *Trichoderma sp.* (Guimarães, 2008), assim como outros fungos e bactérias. Agentes de controle biológico, que atuam parasitando os patógenos, competindo com eles por espaço ou nutrientes, ou produzindo compostos antibióticos, podem ser amplamente encontrados em diferentes ambientes. Isso indica que estão também, adaptados aos diferentes ambientes e por isso o seu uso deveria

ser limitado às condições ecológicas similares aos dos ambientes em que são isolados. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo isolar, a partir de folhas e frutos de tangerineiras cv. Montenegrina, e selecionar microrganismos não patogênicos às plantas cítricas e com potencial antagônico ao agente causal da pinta preta dos citros, o fungo *G. citricarpa*.

3.2 Materiais e Métodos

O trabalho foi realizado em pomares de tangerineiras cv. Montenegrina no município de Montenegro, no Vale do Caí (RS) e no Departamento de Fitossanidade da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

3.2.1 Obtenção dos isolados endofíticos de *G. citricarpa*

Do pomar localizado na região de Faxinal no Vale do Caí foram coletadas amostras de frutos de tangerineiras cv. Montenegrina apresentando sintomas de *G. citricarpa*. O material coletado foi acondicionado em sacos de papel previamente identificados com a localização do pomar, propriedade e município da amostra. As amostras foram colocadas em uma caixa térmica, para o transporte até o laboratório a fim de manter a temperatura constante até o momento da desinfestação do material e do seu plaqueamento. Primeiramente, foi efetuada a retirada de resíduos de poeira e solo com água corrente. Posteriormente, as cascas das amostras foram cortadas em fragmentos de 1 cm², esses fragmentos foram imersos em álcool 70% por 1 minuto. Em seguida, imersas em hipoclorito de sódio (2 – 4 % de cloro ativo) por 4 minutos. Novamente foram imersas em álcool 70% por 1 minuto e em seguida enxaguadas por três vezes em água destilada esterilizada (água de lavagem).

Após a desinfestação superficial, os fragmentos e 1 ml da última água de lavagem foram colocados em placas de Petri contendo meio de cultura batata – dextrose – agar (BDA – 200g de batata, 20 g de dextrose e 15 g de agar em 1000 ml de água destilada). As placas foram incubadas em câmaras de crescimento por 10 dias, com fotoperíodo de 12 horas e $25 \pm 2^\circ\text{C}$. O plaqueamento da água de lavagem se faz necessário para verificar a eficiência da desinfestação superficial. As placas foram avaliadas quanto ao crescimento de colônias fúngicas, as quais após a identificação como sendo *G. citricarpa* foram armazenadas à 4°C .

3.2.2 Obtenção de microrganismos endofíticos

Tecidos, sem sintomas de *G. citricarpa*, de aproximadamente 1 cm^2 de frutos de tangerineiras cv. Montenegrina foram desinfestados através de lavagem em água corrente durante 15 min, seguida de imersão em álcool 70% durante 3 minutos, imersão em hipoclorito de sódio 2% durante 4 minutos e álcool 70% durante 2 minutos. Após a desinfestação, os fragmentos foram lavados três vezes com água destilada esterilizada e transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura BDA. O experimento consistiu de 20 placas de Petri com quatro fragmentos cada. Um ml da última água de lavagem foi plaqueada em placa de Petri contendo meio de cultura BDA. As placas foram mantidas em câmara de crescimento por 10 dias, com fotoperíodo de 12 horas e $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Após esse período os microrganismos foram repicados para placas de Petri contendo meio de cultura BDA e mantidos novamente em câmara de crescimento. Após o desenvolvimento, os microrganismos foram armazenados a 4°C .

3.2.3 Obtenção de microrganismos epifíticos

Folhas e ramos de tangerineiras cv. Montenegrina foram colocados em frascos de 500 mL, com 300 mL de solução salina esterilizada e, posteriormente, submetidos ao ultra-som por 3 segundos. Em seguida, os frascos com as amostras foram transferidos para agitador orbital a 170 rpm, durante 10 minutos. Das suspensões resultantes (água de lavagem), foram retiradas e distribuídas alíquotas de 1 mL, nos meios de cultura próprios para isolamento de fungos filamentosos e leveduras.

Para o isolamento das leveduras, as amostras da água de lavagem foram inoculadas com auxílio da alça de Drigalski, em meio “Yeast Extract Peptone Dextrose” (YEPD - Extrato de levedura 10 g, Peptona 10 g, Dextrose 20 g, Água destilada 1000 mL). Para o desenvolvimento de fungos filamentosos, as amostras foram plaqueadas em meio BDA acrescido de sulfato de estreptomicina (0,04g/L), para inibição de bactérias e nistatina (1500U/L), para inibição de leveduras. Para isolamento de bactérias, as amostras foram plaqueadas em meio de cultura TSA (15g de Triptona, 5 g de Peptona, 15g de ágar). Foram feitas 15 placas para cada meio de cultura. As placas foram incubadas em câmara de crescimento por 10 dias, com fotoperíodo de 12 horas e $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e observadas diariamente. Os microrganismos que apresentaram potencial antagonista, seja por inibição do crescimento, competição e parasitismo de outros microrganismos, foram isolados.

Após o período de aproximadamente duas semanas, os microrganismos foram repicados para placas de Petri contendo meio de cultura específico para cada tipo, e armazenados a 4°C .

3.2.4 Conservação dos microrganismos

O método de conservação utilizado foi o Castellani. Este método consiste em cultivar os microrganismos em BDA por tempo suficiente para permitir a retirada de discos de cultura. Foram utilizados frascos de vidro com capacidade para 10 mL com 5 mL de água destilada esterilizada e 5 discos de meio de cultura contendo o microrganismo. Os vidros foram vedados com tampas de borracha, identificados e armazenados a 10°C (Gonçalves *et al.*, 2007).

3.2.5 Confrontos entre isolados e o fungo *G. citricarpa*

Os confrontos foram realizados utilizando-se 43 microrganismos, sendo estes 16 fungos filamentosos, 20 leveduras e 07 bactérias. Os confrontos foram realizados *in vitro*, em placas de Petri, contendo meio CEU (200g de cenoura; 200 g de folha de eucalipto; 20g de dextrose; 15 g de ágar) (Guimarães, 2008) devidamente esterilizado em autoclave.

Para avaliar o potencial antagônico das leveduras e bactéria, os confrontos foram montados da seguinte maneira: no centro da placa foi colocado um disco de meio de cultura CEU, de 5 mm de diâmetro contendo micélio e esporos de *G. citricarpa*. Os isolados foram inoculados a aproximadamente 1,5 cm do fitopatógeno, com o auxílio da alça de platina. A testemunha consistiu apenas fitopatógeno *G. citricarpa*. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três repetições para cada tratamento. Os tratamentos foram mantidos em câmara de crescimento por 14 dias a 25±2°C e fotoperíodo de 12 horas.

Para avaliar o potencial antagônico dos fungos filamentosos os

confrontos foram montados da seguinte maneira: discos de micélio, de 5 mm de diâmetro dos isolados dos fungos 12 e do isolado de *G. citricarpa* foram inoculados em lados opostos das placas contendo somente meio de cultura CEU. A testemunha consistiu do fungo *G. citricarpa* inoculado sozinho no canto da placa. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 3 repetições para cada tratamento. As placas foram incubadas por 7 dias, com fotoperíodo de 12 horas e a $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

Após o período de incubação foi feita a medição do diâmetro da colônia de *G. citricarpa* no caso dos confrontos com as leveduras e bactérias e do raio da colônia no caso dos confrontos com os fungos filamentosos. Para análise dos dados foi utilizado Teste de Tukey ($p < 0,05$).

3.2.6 Testes de Patogenicidade

Para avaliar a patogenicidade dos microrganismos que apresentaram maior potencial antagônico ao agente causal da pinta preta, foram realizados alguns testes. Os microrganismos testados foram os seguintes: levedura 32 epifítica, obtida na propriedade do agricultor Luiz Laux na região de Faxinal; levedura 54 e bactéria 43, ambas endofíticas e obtidas na propriedade do agricultor João Kranz na região de Faxinal.

3.2.6.1 Testes de hipersensibilidade

Para os testes de hipersensibilidade (Klement *et al.*, 1964) foram utilizadas mudas de fumo (*Nicotiana tabacum* L.). Os microrganismos foram cultivados em meio de cultura BDA. As placas foram mantidas em câmara de crescimento por 72h, fotoperíodo de 12h e a $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Após esse período foram preparadas suspensões para cada um dos três microrganismos. Com auxílio de

uma alça de platina, colônias dos microrganismos foram retiradas da placa de Petri e transferidas para um tubo de ensaio contendo 20 mL de água destilada esterilizada. Os tubos de ensaio foram agitados no vortex por cerca de 1 min. Para as leveduras a concentração das suspensões foram ajustadas para 10^7 células/ml e para a bactéria a concentração foi ajustada para 10^8 células/ml. As suspensões foram infiltradas no limbo foliar com o auxílio de uma seringa. As mudas de fumo foram mantidas em casa de vegetação à $25\pm 2^\circ\text{C}$ e após 24 h observou-se a reação de hipersensibilidade, que é caracterizada por necrose e dessecação do tecido da região infiltrada (Mariano, 2000).

3.2.6.2 Experimento em casa de vegetação

As leveduras 32 e 54 e a bactéria 43 foram testadas em casa de vegetação para verificar sua patogenicidade à plantas de citros, para isso foram utilizadas mudas de laranjeiras cv. Valência. Os microrganismos foram cultivados em BDA, as placas foram mantidas em câmara de crescimento por 72h, fotoperíodo de 12h e a $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Após esse período foram preparadas suspensões para cada um dos três microrganismos. Para cada microrganismo foi feita uma suspensão com concentração ajustada para 10^7 células / mL para as leveduras e 10^8 células / mL para as bactérias. Cada tratamento teve duas repetições e uma testemunha que recebeu água. As mudas foram ensacadas durante 24 horas antes da aplicação. A aplicação das suspensões foi feita com borrifadores até o escorrimento. Após a aplicação as mudas foram novamente ensacadas por mais 3 horas. As suspensões dos microrganismos foram aplicadas nas mudas semanalmente durante 5 semanas. Para a avaliação, foi montada uma

tabela baseada na tabela que os agricultores utilizaram para avaliar as árvores do experimento a campo (Tabela 1).

TABELA 1. Critérios utilizados para avaliação das mudas que receberam aplicação dos microrganismos.

Critério	Muda 1	Muda 2	Testemunha
Pinta preta			
Mancha de alternaria			
Cancro			
Podridão			
Sintoma desconhecido			

3.2.7 Avaliação do potencial antagônico dos microrganismos no controle de podridão causada por *Penicillium* sp, e conservação dos frutos em pós-colheita

Para avaliação do potencial antagônico para conservação pós-colheita de cítricos foram realizados dois experimentos. No primeiro experimento, 28 microrganismos, sendo 20 bactérias, 07 leveduras e o isolado TC01 do fungo *T. koningii* foram testados para controle de podridão de pós-colheita em laranjas cv. Valência. Os isolados foram cultivados em meio de cultura líquido BD, e foram mantidos, por duas semanas, em câmara de crescimento com fotoperíodo de 12h a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$. As suspensões, 10^7 células/mL para as leveduras e 10^8 células/mL para as bactérias, foram aplicadas sobre frutos recém colhidos por aspersão. O tratamento testemunha consistiu de frutos borrifados com água destilada. Os frutos não foram inoculados com o fitopatógeno. Para cada tratamento foram utilizados cinco frutos, os quais foram ensacados e mantidos em câmara de crescimento por sete semanas, com fotoperíodo de 12h e à $25\pm 2^{\circ}\text{C}$. A avaliação dos resultados realizou-se semanalmente e na forma de observação visual.

No segundo experimento, foram avaliados o isolado TC01 e a levedura 32, que apresentaram os melhores resultados no primeiro experimento. A multiplicação dos microrganismos deu-se a partir de culturas puras mantidas em placas contendo meio de cultura BDA, onde colônias foram raspadas com uma alça de platina e transferidas para Erlenmeyers contendo 500 mL de meio BD. Os Erlenmeyers foram mantidos sob agitação de 180 rpm/min por 72 horas à $25\pm 2^{\circ}\text{C}$. Após esse período foi feita a contagem de esporos do isolado TC01 e a concentração ajustada para 1×10^7 conídios/mL. A concentração da levedura 32 foi medida com o auxílio de um espectrofotômetro e posteriormente ajustada para 1×10^7 células/mL.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 4 repetições de 25 frutos por tratamento. As tangerinas foram aspergidas com as suspensões dos microrganismos ou água, no caso da testemunha, e mantidas em duas temperaturas: à $5^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ e a temperatura ambiente $20^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Dez dias após a aplicação dos tratamentos os frutos foram avaliados para: percentual de frutos com sintomas de podridão causada por *Penicillium* sp., acidez titulável (meq de ác./100mL de suco), sólidos solúveis ($^{\circ}\text{Brix}$) e relação entre ambos (SST/ATT). O tratamento mantido em câmara fria foi avaliado da mesma forma após 3 semanas.

A acidez total titulável (ATT) foi avaliada por titulação com hidróxido de sódio (NaOH) 0,08846 N. Empregou-se uma amostra de 10 mL de suco, a qual ficou sob agitação constante até atingir pH 8,1. Utilizou-se um peagâmetro Digimed DM-20, provido de um termo compensador. O cálculo do teor de acidez foi feito de acordo com a fórmula: $\% A = V * N * 0,064 * 100 / G$ na qual: A = acidez total em gramas % de ácido cítrico; N = NaOH (normalidade);

0,064 = fator para expressar a acidez em ácido cítrico, em meq; G = volume da amostra (mL).

O teor de SST foi obtido pingando 2 a 3 gotas de suco, retiradas da amostra homogeneizada, em um refratômetro de bancada, modelo 2WAJ (Abbe Refractometer). A leitura realizada foi expressa em graus Brix.

Realizou-se uma análise de variância e as médias das quatro variáveis foram, posteriormente, comparadas pelo Teste de Duncan ($p=0,05$), quando necessário.

3.3 Resultados e Discussão

3.3.1 Obtenção dos isolados de *G. citricarpa*

Foi obtido um isolado de *G. citricarpa* a partir de cascas de tangerinas cv. Montenegrina. Este denominado GC01, foi cultivado em meio BDA e apresenta cor escura em toda colônia, diferenciando do isolado obtido da mesma área por Guimarães (2008) que apresentava bordas brancas.

Segundo Baayden *et al.* (2002) a morfologia da colônia de *G. citricarpa* é diferente da colônia do endófito *G. mangiferae*. Neste trabalho não foi detectada a mucosidade na parede dos conídios, que caracteriza o isolado de *G. mangiferae*. O fungo *G. citricarpa* não produz peritécios férteis sobre o meio sólido (Kiely, 1948), o isolado obtido (Figura 1) não apresentou o desenvolvimento dessas estruturas confirmando então, ser o isolado fitopatogênico.

Para determinar com precisão que os isolados obtidos neste estudo tratavam-se do fitopatógeno *G. citricarpa*, deveriam ter sido cumpridas todas as etapas relacionadas nos postulados de Koch. Todavia, não foram realizados testes de patogenicidade com os isolados obtidos neste trabalho. Entretanto,

com o isolamento a partir da lesão no fruto, e também pelos caracteres morfológicos, pode-se concluir que os isolados obtidos neste trabalho referem-se à *G. citricarpa*.



FIGURA 1. Isolado de *G. citricarpa* obtido de lesões na casca de tangerinas cv. Montenegrina. Fonte: Pandolfo, J., Porto Alegre, 2010.

3.3.2 Obtenção de microrganismos endofíticos

Dos oitenta fragmentos de casca de frutos de tangerineiras cv. Montenegrina, fungos filamentosos do gênero *Colletotrichum* (Figura 2) foram obtido em 65 fragmentos, totalizando 81,25% dos isolamentos. Quatro fragmentos apresentaram desenvolvimento de uma levedura de coloração alaranjada e sete fragmentos apresentaram desenvolvimento de uma bactéria de coloração bege. A identificação dos isolados do gênero *Colletotrichum* foi feita através da observação morfológica com auxílio de microscopia óptica. A levedura 54 e a bactéria 43 estão em processo de identificação. O restante dos fragmentos não apresentaram desenvolvimento de microrganismos. Corrêa (2008) realizou isolamento de endofíticos de tangerineiras cv. Montenegrina na mesma área no Vale do Rio Caí e isolou o fungo do gênero *Colletotrichum* apenas de folhas, além de obter maior frequência de fungos do gênero *Alternaria* sp, agente causal da mancha de alternaria nos citros. O fungo *Colletotrichum* sp. é o agente causal da podridão floral em citros. O fungo

infecta as pétalas das flores produzindo lesões amarronzadas que resultam na queda do fruto, produção de cálices persistentes e deformações nas folhas (Chung *et al.*, 2003).

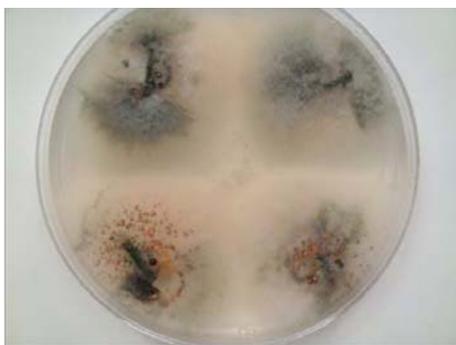


FIGURA 2. Fragmentos de casca de frutos de tangerineiras cv. Montenegrina apresentando desenvolvimento de *Colletotrichum* sp. Fonte: Pandolfo, J., Porto Alegre, 2010.

3.3.3 Obtenção de microrganismos epifíticos

A maioria dos microrganismos epifíticos isolados a partir de folhas da copa e do solo de tangerineiras cv. Montenegrina foram bactérias (Tabela 2). Quanto aos isolados de fungos filamentosos, a maioria obtida foram de gêneros fitopatogênicos aos citros, como *Alternaria* e *Colletotrichum*. No isolamento de microrganismos epifíticos realizado por Guimarães (2008), na mesma área e com a mesma espécie de citros, a predominância foram de fungos dos gêneros *Alternaria*, *Penicillium*, *Aspergillus* e *Fusarium*.

Também foram obtidos três isolados do gênero *Trichoderma*, a partir de folhas de tangerineiras cv. Montenegrina em decomposição no solo. As espécies do gênero *Trichoderma* são importantes fungos habitantes do solo, atuando como saprófitas ou parasitas de outros microrganismos, incluindo fitopatógenos, principalmente aqueles com estruturas de resistência consideradas difíceis de serem atacadas por microrganismos (Melo, 1996).

Guimarães (2008) testou um isolado de *T. koningii* obtido de folhas de tangerineira cv. Montenegrina *in vivo*, em pomar de tangerineiras no Vale do Rio Caí, e obteve redução de 18,85% na incidência e 63,82% na severidade da pinta preta dos citros.

TABELA 2. Microrganismos epifíticos isolados a partir de folhas da copa e do solo de tangerineiras cv. Montenegrina.

Isolados	Folhas da copa	Folhas do solo	Total
<i>Alternaria</i> sp.	03	0	03
<i>Colletotrichum</i> sp.	07	0	07
<i>Trichoderma</i> sp.	0	03	03
Não identificados			
Fungo salmão	03	0	03
Fungo branco	04	02	06
Fungo roxo	02	0	02
Fungo alaranjado	04	0	04
Bactérias	17	02	19
Leveduras	06	0	06
Total			53

3.3.4 Confrontos entre os microrganismos obtidos de tangerineiras cv. Montenegrina e o isolado GC01 de *G. citricarpa*

Os confrontos foram realizados com o objetivo de avaliar o potencial antagônico de 16 fungos filamentosos, de 20 bactérias e de 07 leveduras isolados de folhas de tangerineiras cv. montenegrina.

Através da análise de variância e teste de Tukey os dados referentes ao desenvolvimento do isolado GC01 foram comparados. A Tabela 3 mostra que os tratamentos com diferentes isolados de fungos filamentosos apresentaram diferenças significativas. O isolado 12, correspondente ao fungo do gênero *Trichoderma*, inibiu completamente o desenvolvimento do fitopatógeno *in vitro*. O antagonista se desenvolveu por toda a placa, inclusive por cima do fitopatógeno em, aproximadamente três dias (Figuras 3a e 3 b). Guimarães

(2008) obteve um resultado semelhante quando confrontou o isolado TC01 de *T. koningii* com um isolado *G. citricarpa*. O antagonista apresentou rápido crescimento micelial, e grande produção de conídios, impedindo o desenvolvimento da colônia do fitopatógeno. Com base no rápido desenvolvimento do isolado de *Trichoderma*, é possível sugerir que o mesmo possui capacidade para um rápido estabelecimento quando aplicado sobre o filoplano, o que constitui-se uma vantagem para o controle biológico, principalmente para o controle de fitopatógenos de crescimento lento, como é o caso de *G. citricarpa* (Guimarães, 2008). A produção de conídios e a taxa de crescimento micelial *in vitro* podem, potencialmente, se constituir em importantes características, no que se refere ao desempenho dos antagonistas em condições *in vivo*, tendo em vista que o sucesso de um agente de controle biológico em condições de campo também depende de sua capacidade de colonizar a cultura a ser protegida (Parke, 1991).

Todavia, é importante salientar que o desempenho de um agente de controle biológico *in vitro* não caracteriza sucesso nos resultados *in vivo*, em função das condições adversas que o filoplano apresenta (Bettiol, 1991; Mariano, 1993).

A Tabela 4 se refere aos confrontos entre leveduras e bactérias e *G. citricarpa*. A análise de Tukey indica que os tratamentos apresentaram diferenças significativas quanto ao crescimento do diâmetro do patógeno, sendo possível destacar as leveduras 54 e 32 e a bactéria 43 (em processo de identificação), como os microrganismos de maior potencial antagônico. O fitopatógeno apresentou desenvolvimento médio de 10,6 mm na presença da levedura 54 (Figura 4) em comparação com a testemunha, que apresentou uma

média de 49,3 mm de diâmetro. Kupper *et al.*, (2003) avaliaram o potencial antagônico de isolados de *Bacillus subtilis* a *Colletotrichum acutatum* e verificaram que os isolados de *Bacillus* spp. produziram, *in vitro*, metabólitos capazes de inibir o desenvolvimento do fitopatógeno.

Fialho (2004) avaliou a levedura *S. cerevisiae* no controle de *G. citricarpa* *in vitro* e obteve 73% de redução micelial do fitopatógeno. Além disso, verificou que a levedura *S. cerevisiae* produz compostos voláteis de ação fungistática que inibem o crescimento micelial do patógeno. Reyes *et al.* (2004) avaliaram, *in vitro*, espécies de leveduras epifíticas isoladas de abacaxi e obtiveram de 25 a 50% de inibição do desenvolvimento de *Ceratocystis paradoxa*, agente causal da podridão negra em abacaxi em pós-colheita.

TABELA 3. Média dos diâmetros das colônias do fungo *G. citricarpa* quando confrontados com fungos filamentosos isolados a partir de tangerineiras cv. Montenegrina.

Tratamento	Raio da colônia de <i>G. citricarpa</i> (mm)
12	,0000a
29	7,6667ab
3	14,0000bc
46	14,0000bc
20	16,0000bc
5	16,3333bc
9	16,3333bc
2	17,0000bcd
16	17,3333bcd
26	17,3333bcd
30	19,0000bcd
17	20,0000cd
53	25,3333cde
65	25,3333cde
39	28,6667de
64	28,6667de
Testemunha	32,3333e

*Médias seguidas pela mesma letra não são estatisticamente diferentes (Tukey).

TABELA 4. Média dos diâmetros das colônias do fungo *G. citricarpa* quando confrontados com leveduras e bacterias isoladas a partir de tangerineiras cv. Montenegrina.

Tratamentos	Diâmetro da colônia de <i>G. citricarpa</i> (mm)
54	10,6667a
32	11,3333a
43	24,6667ab
42	25,0000ab
34	27,0000abc
67	28,3333bc
44	28,6667bc
60	29,3333bcd
51	29,6667bcd
58	30,0000bcd
62	30,6667bcd
55	31,3333bcd
57	33,3333bcde
61	34,3333bcde
27	35,0000bcdef
36	35,3333bcdef
56	35,6667bcdef
50	37,0000bcdef
28	37,3333bcdef
31	39,0000bcdef
45	39,6667bcdef
37	43,3333cdefg
52	45,6667defg
35	48,3333efg
40	48,6667efg
Testemunha	49,5000efg
49	51,3333fg
33	58,0000g

*Médias seguidas pela mesma letra não são estatisticamente diferentes (Tukey)

Os ensaios *in vitro* demonstram o potencial dos isolados lev32, lev54, e bac43 no biocontrole de *G. citricarpa*, agente causal da pinta preta dos citros. Desta forma, o trabalho proporciona subsídios para estudos *in vivo* no intuito de se avaliar a efetividade e viabilidade no controle da pinta-preta dos citros.

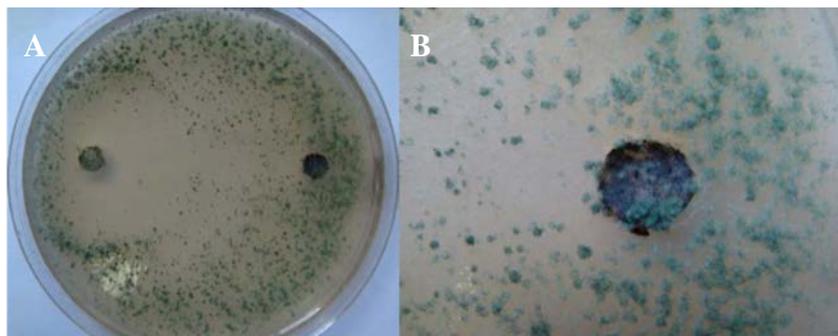


FIGURA 3. Confronto entre isolado 12 de *Trichoderma* sp e *G. citricarpa*. Desenvolvimento do agente de biocontrole sobre o fitopatógeno (A); Detalhe do isolamento 12 desenvolvendo-se sobre o patógeno. Fonte: Pandolfo, J., Porto Alegre, 2010.



FIGURA 4. Confrontos entre o isolado lev54 e o fitopatógeno *G. citricarpa*. Fonte: Pandolfo, J., Porto Alegre, 2010.

3.3.5 Testes de Patogenicidade – Reação de Hipersensibilidade e Experimento em casa de vegetação

A resposta hipersensitiva (HR) ou reação de hipersensibilidade em plantas é um mecanismo de defesa contra fitopatógenos (fungos, vírus, bactérias e nematóides), sendo considerada como um dos principais componentes da resposta de defesa da planta (Agrios, 1997; Fernandes, 2008). O teste de hipersensibilidade foi realizado com o objetivo de avaliar a patogenicidade dos isolados que apresentaram maior potencial antagônico ao fungo *G. citricarpa*). As leveduras 32 e 54 e a bactéria 43 não induziram resposta típica de hipersensibilidade nas folhas de fumo (Figura 5).



FIGURA 5. Teste de hipersensibilidade em folhas de fumo (*Nicotiana tabacum*) para verificar a patogenicidade das leveduras e bactéria com potencial antagonista a *G. citricarpa*. Fonte: Pandolfo, J., Porto Alegre, 2010.

Como nem todos os microrganismos induzem reação de hipersensibilidade em plantas não hospedeira, optou-se por inocular os microrganismos em mudas de citros para avaliar sua patogenicidade. No experimento em casa de vegetação, as mudas tratadas com as leveduras e com a bactéria não diferiram em seu aspecto das mudas tratadas com água. As mudas na casa de vegetação foram avaliadas utilizando a tabela com alguns critérios de avaliação, porém, após 5 semanas, as mudas tratadas com os microrganismos não apresentaram nenhuma diferença quando comparadas às testemunhas (Figura 6). Os resultados dos experimentos indicam que os microrganismos lev32; lev54 e bac43 não apresentam patogenicidade aos citros e podem ser testados a campo.

Os isolados lev32 e lev54 estão em processo de identificação no Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista - UNESP sob responsabilidade do Prof. Fernando Pagnocca. O isolado bac43 está sendo identificado no Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, sob responsabilidade da Profa. Marisa da Costa.



FIGURA 6. Mudas referentes aos tratamentos, após cinco semanas de inoculação com os microrganismos. Fonte: Pandolfo, J., Porto Alegre, 2010.

3.3.6 Avaliação do potencial antagônico dos microrganismos no controle de podridão causada por *Penicillium* sp, e conservação dos frutos em pós-colheita

Dos microrganismos testados no controle de podridão, causada por *Penicillium* sp., em laranjas cv. Valência em pós-colheita, a levedura 32 e o isolado TC01 apresentaram maior eficiência no controle de podridões, com apenas um, dos cinco frutos, inviável para comercialização (Tabela 5). A Testemunha, assim como outros tratamentos, apresentou 100% de podridão, causada por *Penicillium* sp., nos frutos.

No segundo ensaio pós-colheita, avaliou-se a eficiência da lev32 e do isolado TC01 no controle de podridões em tangerinas cv. Montenegrina. Não

foram observadas diferenças significativas para a incidência de frutos com podridão nas duas temperaturas de armazenagem avaliadas (Tabela 6 e 7).

Os tratamentos mantidos em temperatura ambiente por 15 dias também não apresentaram diferenças significativas quanto a ATT e SST (Tabela 6). Os frutos tratados com o isolado TC01 e com a lev32 apresentaram uma relação SST/ATT mais baixa quando comparados à testemunha. A relação SST/ATT é um importante parâmetro para avaliar a qualidade de frutas (Chitarra & Chitarra, 1990) e, durante a maturação, esta relação tende a aumentar devido à diminuição dos ácidos e aumento dos açúcares. Uma relação SST/ATT de 8 a 10 é geralmente aceita como um índice mínimo de maturidade para citros (Baldwin, 1993). Segundo Mattiuz *et al.* (2003), os frutos poderão tornar-se sobremaduros, do ponto de vista do sabor, tanto pelo acúmulo de açúcares quanto pela diminuição da acidez e, assim, se tornarem pouco saborosos. Já os tratamentos mantidos em câmara fria por três semanas não apresentaram diferenças significativas para nenhum dos parâmetros avaliados (Tabela 7).

O sabor dos citros (doce ou azedo) é dependente de quantidades relativas de açúcares (sólidos solúveis totais) e acidez total titulável no suco, sendo que a relação sólidos solúveis totais/acidez total titulável é considerada como um importante índice de maturidade dos frutos, embora uma determinada relação não seja garantia de qualidade a menos que associada à concentração de sólidos solúveis totais (Costa, 1994). O armazenamento, normalmente, reduz os ácidos acumulados convertendo-os a açúcares e $C O_2$ usados na respiração celular (Davies & Albrigo, 1994).

As podridões constituem a principal causa de danos pós-colheita em citros e expressam-se desde a colheita até seu consumo. Os principais agentes

causais de podridões pós-colheitas são: *Penicillium digitatum* (Pers.:Fr.) Sacc., agente causal do bol or verde; *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl. e *Phomopsis citri* Fawcett, agentes causais de podridões pedunculares; *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc. agente causal da antracnose; *P. italicum* Wehmer, agente causal do bolor azul (Fischer *et al.*, 2008).

TABELA 5. Avaliação da incidência de laranjas cv. Valência apresentando podridões pós-colheita tratados com leveduras e com o isolado TC01, após 5 e 7 semanas em câmara de crescimento.

Tratamento	Incidência de podridão após 5 semanas (%)	Incidência de podridão após 7 semanas (%)
Testemunha	40	100
Isolado 64	60	100
Isolado 49	40	100
Isolado 35	60	100
Isolado 37	40	80
Isolado 45	40	100
Isolado 31	80	100
Isolado 28	60	100
Isolado 50	60	100
Isolado 56	40	80
Isolado 36	40	100
Isolado 27	100	100
Isolado 61	80	100
Isolado 57	20	80
Isolado 55	100	100
Isolado 63	60	100
Isolado 62	20	100
Isolado 58	40	80
Isolado 51	100	100
Isolado 60	60	100
Isolado 44	60	100
Isolado 67	80	100
Isolado 34	80	100
Isolado 21	60	100
Isolado 42	60	100
Isolado 43	60	100
Isolado 54	40	80
Isolado 32	0	20
Isolado TC01	20	20

O controle de doenças pós-colheita de frutas ainda baseia-se no uso de fungicidas sintéticos (Castoria *et al.*, 2001). Entretanto, a aplicação indiscriminada de fungicidas sintéticos vem sendo desencorajada por afetar a saúde humana e o ecossistema, aliado ao aumento da resistência antimicrobiana, com surgimento de cepas fúngicas resistentes (Arras *et al.*, 1998).

TABELA 6. Incidência de frutos com sintomas de podridão, sólidos solúveis totais e acidez total titulável em tangerinas cv. Montenegrina armazenadas por 15 dias a $20^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Tratamentos	Frutos com podridão	SST(°BRIX)	ATT(mL)	SST/ATT
Testemunha	8 a *	14,2a	16,32 a	15,37a
Lev 32	5a	13,81a	16,71a	14,60b
TC01	3a	13,78a	16,52a	14,74b

*médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente.

TABELA 7 . Incidência de frutos com sintomas de podridão, sólidos solúveis totais e acidez total titulável em tangerinas cv. Montenegrina armazenadas por 3 semanas a $5^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Tratamentos	Frutos com podridão	SST (°BRIX)	ATT(mL)	SST/ATT
Testemunha	8 a *	14,31a	14,17a	17,92a
Lev 32	6a	14,5a	13,95a	18,01a
TC01	0a	14,34a	14,06a	17,93a

* médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente.

A utilização de leveduras no controle biológico de doenças em pós-colheita vem sendo estudado em diversas frutíferas. Arras *et al.* (1998), utilizando cepas de *Pichia guilliermondi* e *Candida sake*, reduziram a infecção por *Penicillium italicum* de 98 para 86% em frutas cítricas. Blum *et al.* (2004) testaram a levedura *Cryptococcus laurentii* no controle de podridões de maçãs e constataram que, após o armazenamento, o tratamento de maçãs com *C.*

laurentii foi tão eficiente quanto os tratamentos com fungicidas. Arras *et al.* (1996) mostraram resultados satisfatórios contra *Penicillium digitatum* utilizando *Metschnikowia pulcherrima* (cepas 1A e 5A) isolada de figo e *Rhodotorula glutinis* (21A) de tomate, aplicados em laranja e limão artificialmente lesados, com média de inibição de 97,5% (1A), 97,0% (5A) e 92,8% (21A), permanecendo viáveis entre 15 e 60°C e pH 3 a 8.

As leveduras tem a capacidade de colonizar uma superfície por longos períodos dentro de condições secas, produzindo polissacarídeos extra celulares, que permitem sua sobrevivência e restringem o local de colonização e a taxa de germinação dos fungos, usam rapidamente os nutrientes e proliferam-se (Benato *et al.*, 2001).

Quanto aos fungos do gênero *Trichoderma*, Tanaka (1994) utilizou isolados de *Trichoderma* spp. no controle de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* em sementes de algodão, e obteve resultados positivos, pois estes reduziram o inóculo do fitopatógeno e, conseqüentemente, a transmissão do patógeno semente-plântula. Moreira *et al.* (2002), avaliaram três isolados de *Trichoderma* spp. no controle de *Monilinia fructicola* em pêssegos no período pós-colheita e constataram que os isolados foram eficientes no controle de podridões em ferimentos. Aplicações de *T. harzianum*, *T. viride*, *G. roseum* e *P. variotii*, em pós-colheita, resultaram em um melhor controle de *B. cinerea* em morangos e *Alternaria* sp. em limões (Pratella & Mari, 1993).

Diversos modos de ação são sugeridos para explicar a atividade de controle biológico de microrganismos antagonistas. A competição por nutrientes e por espaço entre o patógeno e o antagonista é considerada como o principal modo de ação utilizado por antagonistas no controle de patógenos em

pós-colheita Além disso, a antibiose, o parasitismo direto, e a possibilidade de indução de resistência são outros modos de ação dos microrganismos antagonistas para suprimir a atividade de patógenos em pós-colheita de frutas e vegetais (El-Ghaouth *et al.*, 2004, Sharma *et al.*, 2009)

Os resultados sugerem que o isolado TC01 do fungo *T. koningii* e a lev 32, levedura em processo de identificação, não são eficientes como tratamentos de controle de podridões em pós-colheita para tangerina cv. Montenegrina nas condições estudadas, porém no primeiro experimento realizado, esses microrganismos foram efetivos no controle de podridões em laranja cv Valência. Além disso, ambos isolados foram efetivos em ensaios *in vitro* no controle do fungo *G. citricarpa* e, o isolado TC01, quando pulverizado mensalmente em tangerineiras cv. Montenegrina reduziu a incidência e a severidade da pinta preta (Guimarães, 2008). Portanto, é provável que esses microrganismos, quando aplicados regularmente em pomares de tangerineiras cv. Montenegrina apresentem maior eficiência no controle de podridões e no controle da pinta preta dos citros em pós-colheita. Bettiol e Ghini (1995) afirmam que o controle biológico pode ser realizado durante o ciclo da cultura ou após a colheita. O controle, ainda no campo, tem por objetivo evitar a penetração de patógenos nos tecidos e o seu posterior desenvolvimento no período de armazenamento. Ritzinger (2000) também afirma que o controle de doenças pós-colheita deve ter início ainda no campo, na fase de desenvolvimento dos frutos, para evitar a sua contaminação e posterior aparecimento de podridões.

Outra avaliação pode ser realizada no futuro, misturando-se os dois isolados, ou ainda, utilizando-se metodologias de controle alternativas e

combinadas aos microorganismos, no intuito de se obter um adequado nível de controle similar ao obtido com os fungicidas sintéticos, pois segundo Sharma *et al.*, (2009), microrganismos antagônicos quando aplicados sozinhos, não são eficientes no controle de patógenos de pós-colheita.

4 CAPÍTULO III

AVALIAÇÃO DO ISOLADO TC01 DE *Trichoderma koningii* NO CONTROLE DA PINTA PRETA DOS CITROS (*Guignardia citricarpa*) EM TRÊS MICRO-REGIÕES DO VALE DO CAÍ / RS

4.1 Introdução

No Rio Grande do Sul, a maior parte da produção de citros provém da região do Vale do Rio Caí, onde se destaca o município de Montenegro, considerado a capital gaúcha da citricultura e berço da tangerina cv. Montenegrina. A citricultura no Vale do Caí é desenvolvida, basicamente, pela agricultura familiar e os citicultores são organizados em cooperativas e associações.

A Cooperativa de Citricultores Agroecológicos do Vale do Caí (Ecocitrus), foi formada, inicialmente por 15 agricultores que estavam insatisfeitos com o modelo de agricultura convencional, e tem por objetivo desenvolver uma agricultura sustentável, que viabilize a produção do pequeno agricultor com menores impactos negativos ao ambiente (Dal Soglio *et al.*, 2006).

A citricultura ecológica inclui práticas integradas de manejo com o uso de caldas, fertilizantes orgânicos, movimentação mínima do solo e utilização de

resíduos naturais (Lopes, 1997), entretanto ainda enfrentam dificuldades no manejo de diversas doenças fitopatogênicas, principalmente a pinta preta dos citros.

A pinta preta dos citros tem como agente causal o fungo *Guignardia citricarpa* Kiely, e representa um entrave para comercialização de frutos *in natura*, uma vez que deprecia o aspecto visual e quando em alta severidade, causa queda dos frutos. O manejo desta doença, pela Ecocitrus, tem sido realizado através da aplicação de calda bordaleza (0,5% de sulfato de cobre), entretanto em anos favoráveis a doença, a eficiência do controle é baixa, uma vez que a ação protetora da calda é afetada pela lixiviação do ingrediente ativo pela água das chuvas.

O uso de agentes biológicos para o controle de enfermidades possui menor restrição quanto ao impacto ambiental e o risco de contaminação é reduzido (Bastos, 2003). Para o controle biológico do fungo *G. citricarpa*, diferentes agentes de biocontrole estão sendo descobertos, como a levedura *S. cerevisiae* (Pascholati, 1998) e o fungo *T. koningii* (Guimarães, 2008). Agentes de controle biológico podem ser amplamente encontrados em diferentes ambientes e, por isso, adaptados aos diferentes ambientes. Devido a essa característica, sua utilização deveria ser limitada às condições ecológicas similares as dos ambientes em que são isolados.

Sendo assim, é necessária a utilização de diferentes abordagens metodológicas do desenvolvimento de tecnologias que respondam à necessidade de redução dos problemas fitossanitários de forma ecologicamente responsável. Guimarães (2008) obteve um isolado TC01, através de isolamento de microrganismos epifíticos, de folhas de tangerineiras cv. Montenegrina caídas

no solo e realizou testes *in vitro* e *in vivo* e comprovando o potencial antagônico do isolado contra o fitopatógeno *G. citricarpa*. Como o isolado TC01 se mostrou eficiente no controle da agente causal da pinta preta dos citros na região do Faxinal no Vale do Rio Caí, houve a necessidade de testá-lo por um período mais longo e em outras regiões.

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar um isolado do fungo *T. koningii* no controle do fungo *G. citricarpa* em pomares ecológicos de três micro-regiões de Vale do Caí/RS. Para a geração de uma tecnologia de controle biológico da pinta preta dos citros apropriada para a região e para os agricultores, esse projeto de pesquisa utilizou-se de ferramentas participativas em todo o seu processo.

4.2 Materiais e Métodos

O trabalho foi realizado no Departamento de Fitossanidade da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e em três micro-regiões do Vale do Caí/RS: Faxinal, Santos Reis e Pareci Novo.

4.2.1 Sobre o isolado *Trichoderma koningii* (isolado TC01)

O isolado TC01 de *T. Koningii* utilizado nos experimentos foi obtido no pomar de tangerineiras cv. Montenegrina do agricultor Luiz Laux, localizado na região de Faxinal no município de Montenegro/RS (Guimarães, 2008).

4.2.2 Produção massal do isolado TC01

Mensalmente, o isolado de TC01 era multiplicado em placas de Petri de 15 cm de diâmetro, contendo meio de cultura BDA (batata – dextrose - agar),

incubado por sete dias a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas. Após a incubação, as placas de Petri foram raspadas com auxílio de espátula metálica esterilizada e lavadas com água destilada esterilizada a fim de coletar micélio e esporos do fungo. Das raspagens obtinha-se uma suspensão concentrada de esporos que era armazenada em refrigeração por até quatro dias.

4.2.3 Preparo da suspensão de esporos de TC01 para aplicação no campo

A suspensão de esporos do isolado TC01 aplicada no campo foi obtida pela diluição em água da suspensão concentrada de esporos. Inicialmente, foi determinado o número de UFC/mL da suspensão concentrada de esporos pelo método de diluição serial, com quatro repetições. A concentração foi ajustada para que a suspensão aplicada no campo apresentasse 1×10^7 UFC/mL.

4.2.4 Aplicações do isolado TC01 em pomares de tangerineiras cv. Montenegrina

O experimento foi realizado em três pomares de tangerineiras cv. Montenegrina de três regiões no Vale do Café: Faxinal, Santos Reis e Pareci Novo. Os três pomares têm suas árvores enxertadas sobre *Poncirus trifoliata*, com idade média de 15 anos e altura média de 2,5 m. O pomar na região de Faxinal, latitude $29^\circ 39' 10,3''$ e longitude $51^\circ 29' 37,4''$, pertence ao citricultor João Kranz, membro da Cooperativa Ecocitrus e do Grupo de Citricultura Ecológica – GCE. O pomar na região de Santos Reis, latitude $29^\circ 35' 48,4''$ e longitude $51^\circ 31' 34,8''$, pertence ao citricultor Ademar Henz, membro da Cooperativa Ecocitrus e do Grupo de Citricultura Ecológica – GCE. O pomar da região de Pareci Novo, latitude $29^\circ 37' 55,0''$ e longitude $51^\circ 24'$

10,2'', pertence ao citricultor Antônio Bays, membro da Associação Companheiros da Natureza e do Grupo de Citricultura Ecológica – GCE.

Suspensões de esporos foram preparadas na concentração 1×10^7 /mL (Figura 1). Um volume de 2,5 L de calda foi aplicado mensalmente na copa das tangerineiras com o auxílio de pulverizador costal manual.

Quatro agricultores iniciaram as aplicações em Janeiro de 2009. Os outros sete agricultores começaram as aplicações em Agosto de 2009, a partir de então todos os 11 agricultores participantes da pesquisa aplicaram mensalmente o isolado TC01 até Setembro de 2010. Cada agricultor selecionou seis tangerineiras cv. Montenegrina, aleatoriamente em seu pomar: três para serem pulverizadas com o TC01 e três como testemunhas. Os agricultores escolheram o dia e a hora que acharam mais conveniente para fazer a aplicação e anotaram, numa planilha de observação (Anexo 1), as características meteorológicas desse dia.



FIGURA 1. Garrafa plástica contendo suspensão de esporos do isolado TC01, na concentração 1×10^7 . Fonte: Pandolfo, J., Porto Alegre, 2010.

4.2.5 Desenvolvimento do isolado TC01 em meio de cultura com diferentes concentrações de calda sulfocálcica.

Uma das problemáticas levantadas pelos agricultores era se a calda

sulfocálcica prejudicava o desenvolvimento do isolado TC01, uma vez que a calda é aplicada em pomares orgânicos e o pulverizador utilizado era o mesmo usado para a aplicação do fungo. O produto comercial tem 32% de concentração e é aplicado em pomares de citros a uma concentração de 0,8%.

Foram feitos testes *in vitro* utilizando meio de cultura BDA suplementado com diferentes concentrações de calda sulfocálcica. As concentrações testadas foram: 0,5%, 0,8% e 1%. A calda foi filtrada com auxílio de um filtro de seringa. O filtro e a seringa foram previamente esterilizados a 120°C por 20 min. Os tratamentos consistiram de 200 mL de meio BDA suplementados com as diferentes concentrações de calda sulfocálcica mais a testemunha que consistiu do meio de cultura BDA sem a calda. Cada tratamento teve 10 repetições. As placas foram mantidas a 25±2°C e fotoperíodo de 12 horas por sete dias. Após esse período, os tratamentos foram avaliados quanto ao diâmetro da colônia do fungo.

4.2.6 Recuperação do isolado TC01 de frutos de tangerineiras cv.

Montenegrina.

Em março de 2009, de um dos pomares, foram coletadas 10 frutos verdes de cada árvore onde era feita a aplicação mensal do isolado TC01, e, como testemunha 10 frutos verdes de três árvores sem a aplicação. Os frutos foram acondicionados em sacos de papel e colocados em uma caixa térmica para o transporte até o laboratório.

Os frutos dos dois tratamentos foram lavados em água corrente por 10 minutos. As cascas dos frutos foram cortadas em pequenos pedaços de aproximadamente 1 cm². Os fragmentos foram desinfestados com álcool 70% durante 3 min, hipoclorito 3% durante 4 min, novamente em álcool 70% durante

3 min e três lavagens em água destilada esterilizada. Após a desinfestação, os fragmentos foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura BDA suplementado com o antibiótico tetraciclina (um mL da solução estoque / 1 L de meio de cultura. Solução estoque: 1 cápsula / 10 mL de água). Um mL da água da lavagem foi plaqueada em placa de Petri contendo meio de cultura BDA. Cada tratamento consistiu de 20 placas com quatro fragmentos cada. As placas foram mantidas em câmara de crescimento a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas por uma semana.

4.2.7 Recuperação do isolado TC01 de folhas das tangerineiras cv. Montenegrina.

A partir de janeiro de 2010, coletas bimestrais de folhas das tangerineiras cv. Montenegrina foram feitas nas propriedades dos agricultores Antônio Bays, Luis Laux e A demar Hanz. As folhas foram coletadas das árvores que receberam aplicação do fungo e das árvores testemunhas e eram acondicionadas em sacos de papel identificados e transportadas até o laboratório. No laboratório as folhas eram lavadas em água corrente por cinco minutos e secas em papel filtro. Após a secagem as folhas eram cortadas em fragmentos de $\pm 1\text{ cm}^2$, estes eram colocados em número de 5 em placas de Petri contendo meio de cultura BDA suplementado com tetraciclina (um mL da solução estoque / 1 L de meio de cultura. Solução estoque: 1 cápsula / 10 mL de água). Para cada tratamento eram avaliados 100 fragmentos. As placas foram mantidas em câmara de crescimento a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas por 72 horas. Após esse período foi feita a contagem dos fragmentos que apresentavam desenvolvimento do fungo *Trichoderma* sp.

4.2.8 Avaliação da flutuação sazonal de inóculo de *G. citricarpa*

De Julho a Novembro de 2010 foram realizadas avaliações quinzenais da flutuação sazonal do patógeno. O experimento foi realizado em três propriedades localizadas no Vale do Café: na propriedade do Luiz Laux, localizada em Faxinal, na propriedade do Ademar Henz, localizada em Santos Reis e na propriedade do Antônio Bays, localizada em Pareci Novo.

Para avaliar a fonte de inóculo foram utilizados coletores de esporos. Estes coletores consistiram em um cano de PVC de 10 cm de diâmetro, preso a uma estrutura de madeira. No interior do cano, era acomodada uma placa de Petri com meio de cultura BDA suplementado com estreptomicina. O coletor de esporo foi construído de modo que o cano de PVC girasse conforme o vento (Figura 2).

Em cada propriedade foram colocados seis coletores, três com altura de 1,0 m do chão e três com altura de 0,5 m do chão, para determinação do número de esporos de *G. citricarpa*. Após um período de três horas expostas ao ar, as placas foram removidas do coletor e vedadas com filme plástico, acondicionadas em isopor com gelo e transportadas até o laboratório no Departamento de Fitossanidade, onde foram incubadas a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12h. Após 72 h registrou-se o número de colônias de *G. citricarpa* formadas.

4.2.9 Avaliação da incidência e severidade da pinta preta dos citros nos pomares de tangerineiras cv. Montenegrina

Para a avaliação das tangerineiras cv. Montenegrina tratadas com o isolado TC01, cada árvore foi dividida em face sul e face norte e estas foram divididas em altura superior e inferior. De cada quadrante foram coletados 10

frutos. Estes foram acondicionados em sacos de papel identificados e transportados até o laboratório no Departamento de Fitossanidade da UFRGS. A incidência foi quantificada pela porcentagem de frutos que apresentavam pelo menos uma lesão da doença na superfície da casca, enquanto a severidade dos sintomas foi quantificada com auxílio de uma escala diagramática para o sintoma mancha dura da pinta preta dos citros elaborada por Spósito *et al.* (2004).



FIGURA 2. Caça-esporos nas alturas 1,0m e 0,5m (A). Detalhe da placa de Petri dentro do caça-esporos (B). Fonte: Pandolfo, J., Porto Alegre, 2010.

4.2.10 Avaliação dos agricultores quanto à eficiência do isolado

TC01 no controle da pinta preta dos citros.

Em abril de 2009, foi realizada uma Oficina com os grupos participantes do projeto, e teve como objetivo a discussão dos critérios para a avaliação das árvores que estavam recebendo aplicações mensais do isolado TC01. O grupo, formado por agricultores, extensionistas, pesquisadores e alunos de graduação em Agronomia, elaborou uma tabela contendo diversos itens considerados indispensáveis para a avaliação (Anexo 1 e 2). Após a elaboração da tabela, o

grupo foi até o pomar para uma avaliação prévia das árvores e das testemunhas e para discussão dos critérios escolhidos. Nessa mesma oficina, a partir das discussões entre o grupo, foi gerado um material com fotografias de frutos com diferentes níveis (alto, médio e baixo) de severidade da pinta preta (Anexo 3).

Utilizando a tabela com os critérios, os agricultores avaliaram mensalmente, a partir de agosto de 2009, as três árvores que estavam recebendo aplicações do isolado TC01 e as três árvores testemunhas. Durante o período de maturação do fruto até a colheita, os agricultores também utilizaram a escala de severidade da pinta preta do citros elaborada por eles.

4.2.11 Dados Meteorológicos

Os dados meteorológicos foram obtidos no Centro de Meteorologia Aplicada – Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária – FEPAGRO/SCT (Anexo 4).

4.2.12 Análise estatística dos dados

Os dados da flutuação do inóculo foram analisados através de ANOVA com medidas repetidas do programa SAS 9.2.

Para análise da incidência e severidade entre os tratamentos e propriedades foi utilizado PROC GLIMMIX do SAS 9.2.

4.3 Resultados e discussão

4.3.1 Desenvolvimento do isolado TC01 em meio de cultura com diferentes concentrações de calda sulfocálcica.

O isolado TC01 não apresentou desenvolvimento na presença de nenhuma das concentrações de calda sulfocálcica testadas (Figura 3). Estudos *in vitro* têm a vantagem de expor ao máximo o microrganismo à ação do produto químico, fato que não ocorre em condições de campo, onde vários fatores servem de obstáculo a essa exposição, assim, constatada a inocuidade de um produto em laboratório, espera-se que o mesmo seja seletivo no campo. Por outro lado, a alta toxicidade de um produto *in vitro* nem sempre indica a sua elevada toxicidade no campo, mas sim a possibilidade da ocorrência de danos dessa natureza (Moino Jr. & Alves, 1999). Não há na literatura avaliação da compatibilidade de fungos do gênero *Trichoderma* com a calda sulfocálcica, porém há avaliações com diversos outros fungicidas. Pandolfo (2007) avaliou, *in vitro*, o desenvolvimento de seis isolado de fungos do gênero *Trichoderma*, na presença dos fungicidas Cabrio Top, Captan SC, Comet, Stratego e Vitavax-Thiram 200 SC e estes não se mostraram tóxicos aos isolados. Francisco *et al.*, (2009) avaliaram, *in vitro*, o desenvolvimento de um isolado do fungo *Trichoderma* sp. na presença dos fungicidas Fludioxonil e Metalaxil-M, e estes inibiram o desenvolvimento do isolado. Entre os mecanismos de resistência a fungicidas, pode-se citar: modificação no sítio de ação, resultando em menor afinidade com o fungicida; desvio do sítio bloqueado por uma operação alternativa, redução da absorção ou acúmulo do fungicida, processos de desintoxicação, etc. (Ghini, 1989).

Com base nesse resultado, pode-se concluir que não era recomendado utilizar o mesmo pulverizador para a aplicação da calda sulfocálcica e do agente de biocontrole. Após esse teste foi solicitada a compra de pulverizadores, para

que assim, os agricultores tivessem pulverizadores exclusivos para aplicação do isolado TC01.



FIGURA 3. Desenvolvimento do i solado TC01 em meio de cultura BDA suplementado com calda sulfocálcica a 0,5% (A), 0,8% (B) e 1% (C). Fonte: Pandolfo, J., Porto Alegre, 2010.

4.3.2 Recuperação do isolado TC01 de cascas de frutos e de folhas de tangerinas cv. Montenegrina.

Dos 80 fragmentos de casca de frutos de tangerineiras cv. Montenegrina que receberam a aplicação do agente de biocontrole, 57% apresentaram o desenvolvimento de *Trichoderma* sp. (Figura 4). O restante dos fragmentos desse tratamento apresentou desenvolvimento de outros microrganismos não identificados. No tratamento controle, que consistiu de 80 fragmentos de casca de tangerineiras cv. Montenegrina, não houve desenvolvimento do fungo *Trichoderma* sp., houve apenas o desenvolvimento de fungos filamentosos, leveduras e bactérias não identificadas. Este resultado sugere que a espécie do fungo *Trichoderma* sp. seja o isolado TC01 que foi aplicado mensalmente.

Durante o ano de 2010, foram realizadas coletas bimestrais de folhas das tangerineiras cv. Montenegrina escolhidas pelos agricultores para receber a aplicação do isolado TC01 e das testemunhas. O gênero *Trichoderma* representa fungos habitantes do solo e, fatores como temperatura, umidade, aeração, pH e teor de matéria orgânica influenciam na sobrevivência de *Trichoderma* (Cook &

Baker, 1983). Devido a este fato, foi necessário verificar o desenvolvimento do isolado na copa das árvores. Produtos biológicos são constituídos de organismos vivos e devem sobreviver, colonizar e multiplicar-se na planta ou no ambiente onde são aplicados, a fim de se obterem os resultados esperados (Fischer *et al.*, 2010).

Nas coletas em janeiro, maio, julho, setembro e novembro de 2010, obteve-se 100% de recuperação do isolado TC01 nos fragmentos de folhas das árvores que estavam recebendo as aplicações. Os fragmentos das folhas das árvores Testemunhas não apresentaram o desenvolvimento do isolado. A Figura 5 compara os fragmento de folhas das tangerineiras cv. Montenegrina tratadas: (A) Luiz; (B) Ademar; (C) Antônio, com os fragmentos das tangerineiras var, Montenegrina não tratadas: (D) Luiz; (E) Ademar; (F) Antônio.

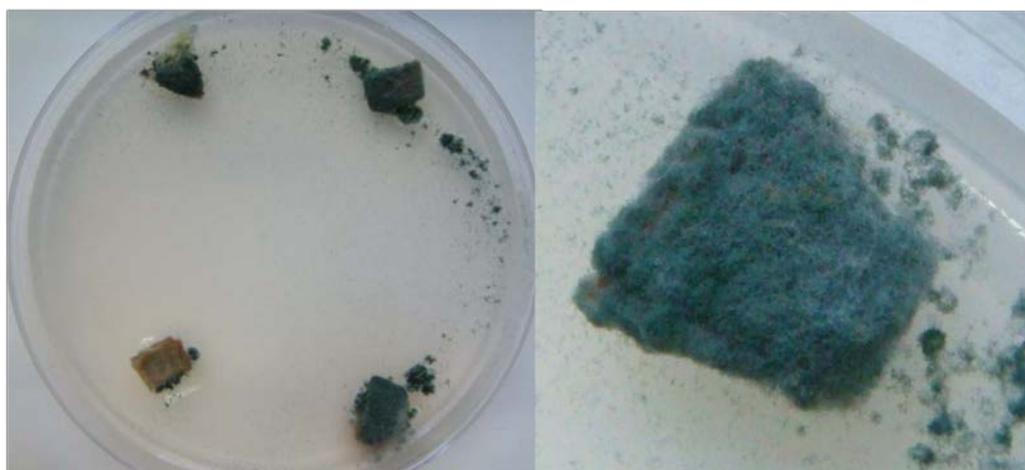


FIGURA 4. Desenvolvimento do fungo *Trichoderma* sp. em fragmentos de casca de frutos de tangerineiras cv. Montenegrina que receberam aplicações do i solado TC01. Fonte: Pandolfo, J., Porto Alegre, 2010.

As populações de fungos do gênero *Trichoderma* no filoplano são demasiado baixas para serem suficientemente efetivas no controle de fitopatógenos de parte aérea, no entanto, os isolados introduzidos para o

controle podem sobreviver por tempo suficiente para exercer a supressão do patógeno. Lo *et al.* (1997) pulverizaram um isolado de *T. harzianum* em gramíneas e este sobreviveu nas folhas por 4 semanas em câmara de crescimento e a sua população foi suficiente para suprimir os sintomas causados por *Pythium graminicola* Subramanian, *Rhizoctonia solani* Kühn, e *Sclerotinia homoeocarpa* F.T. Bennett.

Esse experimento indica que o isolado TC01 é capaz de sobreviver na copa das tangerineiras cv. Montenegrina, mesmo com variações de temperatura e umidade (Anexo 4), porém esse resultado também sugere que o isolado TC01 não está espalhando-se no pomar. Em todos os pomares onde foram coletadas as amostras, as árvores testemunhas ficavam ao lado das árvores pulverizadas com o isolado TC01 e não houve recuperação do isolado nas árvores testemunhas.

Na oficina de Avaliação do Projeto Pinta Preta, realizada em Montenegro em 22 de novembro de 2010, esse resultado foi apresentado aos agricultores-pesquisadores, as discussões a respeito do resultado sugeriram outras avaliações de sobrevivência do antagonista no filoplano. Um método de avaliação sugerido foi o de realizar apenas uma pulverização do isolado TC01 na copa de tangerineiras e avaliar a sua sobrevivência semanalmente, fazendo contagem das unidades formadoras de colônia. O resultado dessa avaliação indicaria quanto tempo o isolado sobrevive na copa, qual o período de aumento da população do antagonista e o período de queda na população. Isso indicaria aos agricultores quantas pulverizações do agente de biocontrole são necessárias por ano.

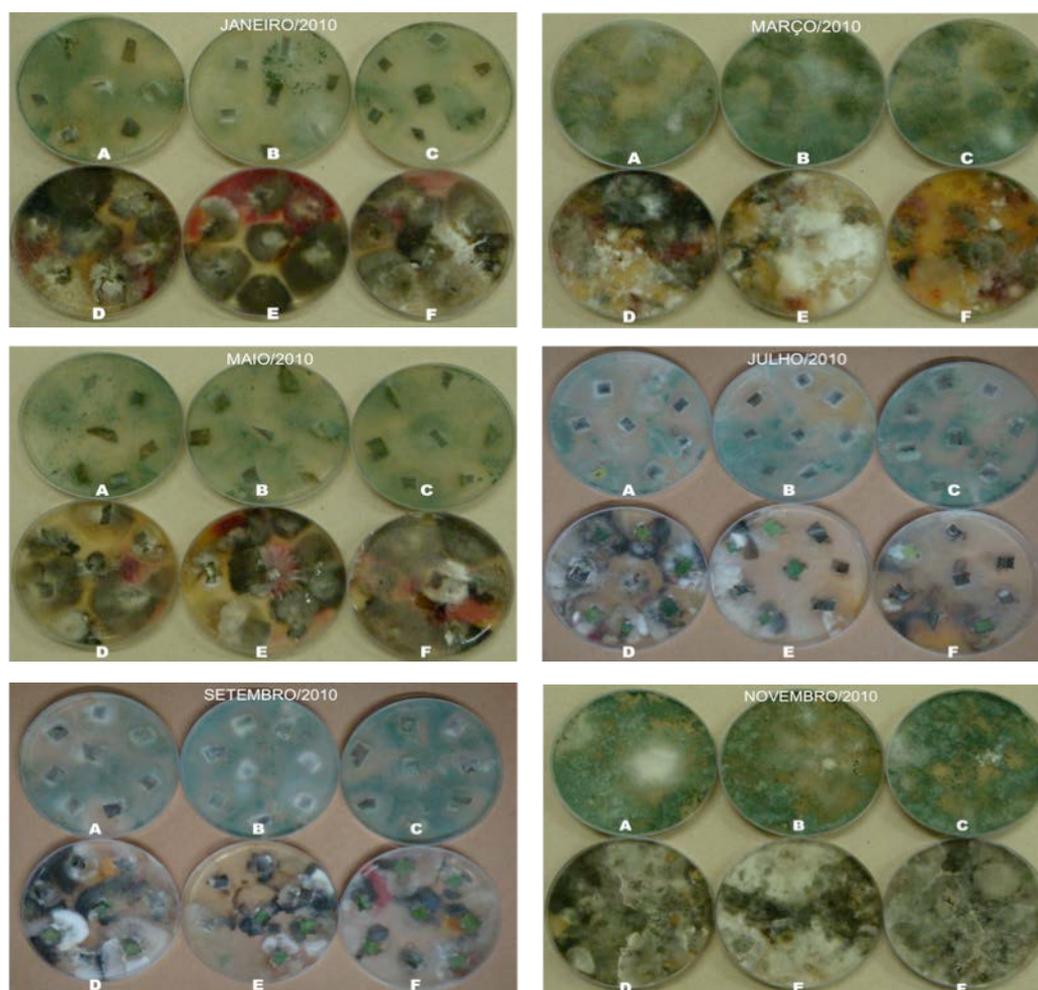


FIGURA 5. Fragmentos de folhas de tangerineiras var. Montenegrina tratadas (A) Luis; (B) Ademar; (C) Antônio, apresentando desenvolvimento de *Trichoderma* sp.; e fragmentos de folhas de tangerineiras var. Montenegrina não tratadas (D) Luis; (E) Ademar; (F) Antônio, não apresentando desenvolvimento de *Trichoderma* sp. Fonte: Pandolfo, J., Porto Alegre, 2010.

4.3.4 Avaliação da flutuação sazonal do inóculo de *G. citricarpa*

A Tabela 1 apresenta os resultados da análise de variância (ANOVA) com medidas repetidas ($p=0,05$). Através da análise constatou-se que as variáveis propriedade, altura, propriedade x altura, data x altura, data x propriedade, não explicam as diferenças encontradas nos valores de inóculo, ou seja, os valores de inóculo não apresentam diferença significativa entre

propriedades e nem entre alturas. Somente a data das coletas apresentou diferença significativa na flutuação de inóculo.

O Box Plot (Figura 6) mostra que, nas amostragens durante o meses de junho e julho, não foram coletados esporos do fungo *G. citricarpa* em nenhuma das propriedades avaliadas e em nenhuma das duas alturas. Nas duas amostragens realizadas no mês de agosto o número de esporos teve um aumento considerável em todas as propriedades avaliadas e nas duas alturas avaliadas. Nos meses de setembro e outubro, houve uma ligeira queda na flutuação de inóculo nas três propriedades e nas duas alturas avaliadas.

Schmidt (2003) avaliou a flutuação do inóculo de *G. citricarpa* em pomar orgânico de tangerineiras cv. Montenegrina no período de fevereiro a setembro de 2002 e obteve resultados semelhantes. Nos meses de junho e julho, não houve captura de esporos de *G. citricarpa* nas parcelas avaliadas e nas alturas 0,5m e 1,0m. No mês de agosto, houve um ligeiro aumento da captura de esporos nas duas alturas testadas, seguido de queda em setembro.

TABELA 1. Análise de variância por medidas repetidas para as variáveis relacionadas à propriedade, altura e data, no período de junho a outubro de 2010.

Efeitos	DF	F	p
Propriedade	2	1,74	0,2042
Altura	1	0,41	0,5276
Data	9	12,73	<.0001
Prop x Altura	2	0,34	0,7185
Prop x Data	18	0,79	0,6919
Altura x Data	9	0,47	0,8743

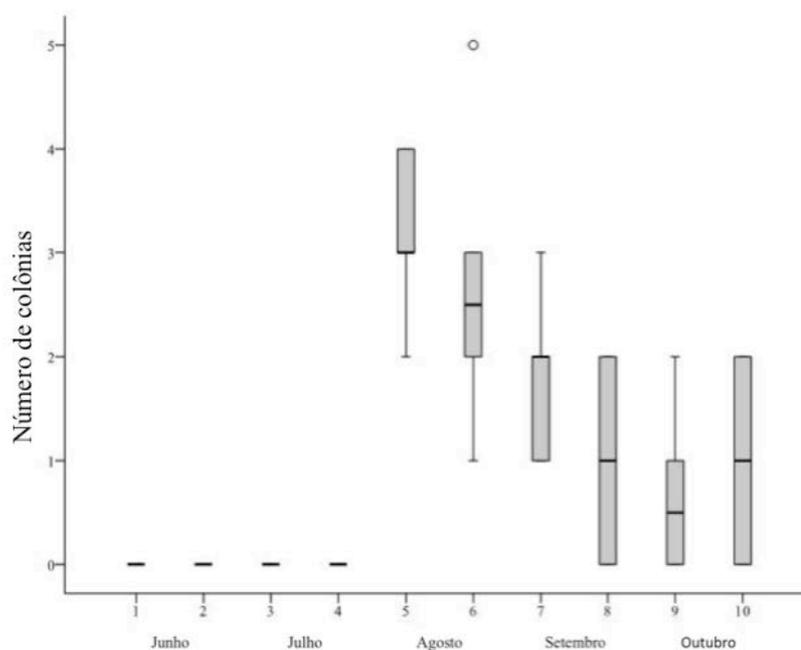


FIGURA 6. Box Splot do número de colônias de *G. citricarpa*, com amostragens quinzenais do período de junho a outubro de 2010. Linha no Box indica o valor da mediana. Linha superior do Box representa o quartil superior (75%). A linha inferior do Box representa o quartil inferior (25%). As linhas externas ao Box representam os percentis superior (95%) e inferior (25%). Os pontos representam os valores extremos da distribuição

Segundo Schmidt (2003), a partir da diminuição da temperatura média, a produção de esporos também é reduzida. Os meses de junho e julho de 2010 apresentaram temperatura média de 16,0°C e 15,5°C, respectivamente. No entanto, o mês de agosto apresentou uma temperatura média de 15,3°C e a captura de esporos aumentou consideravelmente nesse mês em todas as propriedades amostradas e nas duas alturas avaliadas. Bellotte (2006) avaliou a flutuação de inóculo de *G. citricarpa* em pomares de lanranjeira cv. Natal, no período de setembro de 2004 a fevereiro de 2005 e verificou que os maiores picos de liberação de esporos ocorreram em intervalos correspondentes a semanas sem chuvas, precedidas por semanas com picos de precipitação. Esse fato evidencia a importância do molhamento e do secamento das folhas no

processo de liberação dos ascósporos (Kiely, 1949; Kotzé, 1981). Segundo Bellotte (2006), a existência de folhas enxarcadas por um longo período de chuva dificulta a ejeção de esporos.

Devido a baixa quantidade de esporos do fitopatógeno, capturados pelo caça-esporos, não há como relacionar, neste trabalho, as variações meteorológicas com a quantidade de inóculo nos pomares. Pode-se concluir, apenas, que existem esporos de *G. citricarpa* nos pomares avaliados.

4.3.5 Avaliação da eficiência do isolado TC01 no controle da pinta preta dos citros em pomares de tangerineiras cv. Montenegrina.

Apesar da realização de duas Oficinas de Avaliações e dos relatos de um dos pontos positivos da pesquisa ter sido a observação do pomar, os agricultores-pesquisadores não adaptaram-se a fazer as anotações solicitadas para avaliação do experimento.

Os agricultores-pesquisadores deveriam fazer a avaliação mensal dos seus tratamentos e da severidade da pinta preta na época de maturação dos frutos, no período de agosto de 2009 a setembro de 2010, com o auxílio da tabela com critérios de avaliação elaborada pelos grupos. No entanto, essa avaliação não apresentou constância. Dos 11 agricultores-pesquisadores, apenas sete executaram algumas avaliações e em meses alternados, além disso, nenhum agricultor-pesquisador avaliou a severidade da pinta preta com o auxílio da escala de severidade elaborada.

Segundo a avaliação das tabelas preenchidas pelos agricultores-pesquisadores dos três grupos participantes do projeto, não foi observada

diferença entre as árvores que receberam o isolado TC01 e as árvores testemunhas. As avaliações tiveram início no mês de agosto de 2009. Todos os agricultores perceberam a presença de pinta preta nos frutos das árvores dos experimentos, de agosto até outubro de 2009, quando ocorreu a colheita. Segundo os relatos dos agricultores, a doença só foi percebida no pomar novamente, em março de 2010, na época, os frutos estão em fase de maturação. Schmidt (2003) observou o progresso da doença na cv. Montenegrina e verificou que, no ano de 2002, o início dos sintomas ocorreu entre os meses de março e abril. Os agricultores ainda relataram que 2010 foi um ano de pouca incidência e severidade de pinta preta.

Quanto aos critérios nutricionais, os agricultores não perceberam alterações nas árvores do experimento. As árvores que apresentavam um bom estado nutricional no início das aplicações com o antagonista, mantiveram-se saudáveis. Os agricultores que selecionaram árvores mais debilitadas não perceberam melhoras no aspecto nutricional da planta.

Na segunda avaliação da eficiência do isolado TC01, os dados de incidência e severidade de três propriedades amostradas. O local e as repetições foram avaliados como fatores de efeitos aleatórios e os tratamentos (com e sem pulverização de TC01), face (Norte e Sul) e altura (superior e inferior) como efeitos fixos.

Quanto à incidência da pinta preta dos citros houve diferença significativa entre os tratamentos e entre as alturas avaliadas. As interações entre tratamento x altura; tratamento x face; face x altura; tratamento x face x altura, não influenciaram nos resultados encontrados. Embora o tratamento e a

altura afetem a incidência da pinta preta, a interação entre esses fatores não afetou os resultados (Tabela 2).

TABELA 2. Análise de variância mista (PROC GLIMMIX) entre efeitos fixos apresentando diferença significativa entre os efeitos Tratamento e Altura, quando avaliados em relação á incidência da pinta preta dos citros.

EFEITO	G.L.	F	p
Tratamento	1	24,42	< .0001
Altura	1	28,85	< .0001
Face	1	3,21	0,0781
Trat x Altura	1	1,85	0,1784
Trat x Face	1	0,13	0,7215
Face x Altura	1	0,13	0,7215
Trat xFace x Altura	1	0,25	0,6179

No Box Plot podemos observar que os tratamentos (Figura 7A) com aplicação de TC01 e sem aplicação, influenciaram na incidência da pinta preta dos citros. O tratamento com o isolado TC01 apresentou uma pequena redução nos valores de incidência, com a mediana de 80. O tratamento sem aplicação do TC01 apresentou mediana de 95. O fator altura também influenciou nos resultados, o Box Plot (Figura 7B) mostra que a parte superior da copa apresentou maiores valores de incidência, com a mediana de 95, e quanto a parte inferior apresentou a mediana de 78. Assim, com a aplicação do agente de biocontrole, houve uma redução da incidência em 29,9%, 14,8 % e 22,3%, nas propriedades do Ademar (Grupo Santos Reis), Antônio (Grupo Pareci Novo) e João (Grupo Faxinal), respectivamente.

O aumento da incidência da pinta preta na parte superior da copa pode estar relacionada a maior exposição a luz solar e a temperaturas elevadas. Segundo Feichtenberger *et al.*, (1997), os mecanismos envolvidos na

manifestação dos sintomas da pinta preta ainda não são compreendidos, mas podem ser favorecidos por vários fatores dos quais os mais importantes são a luz solar intensa e as altas temperaturas.

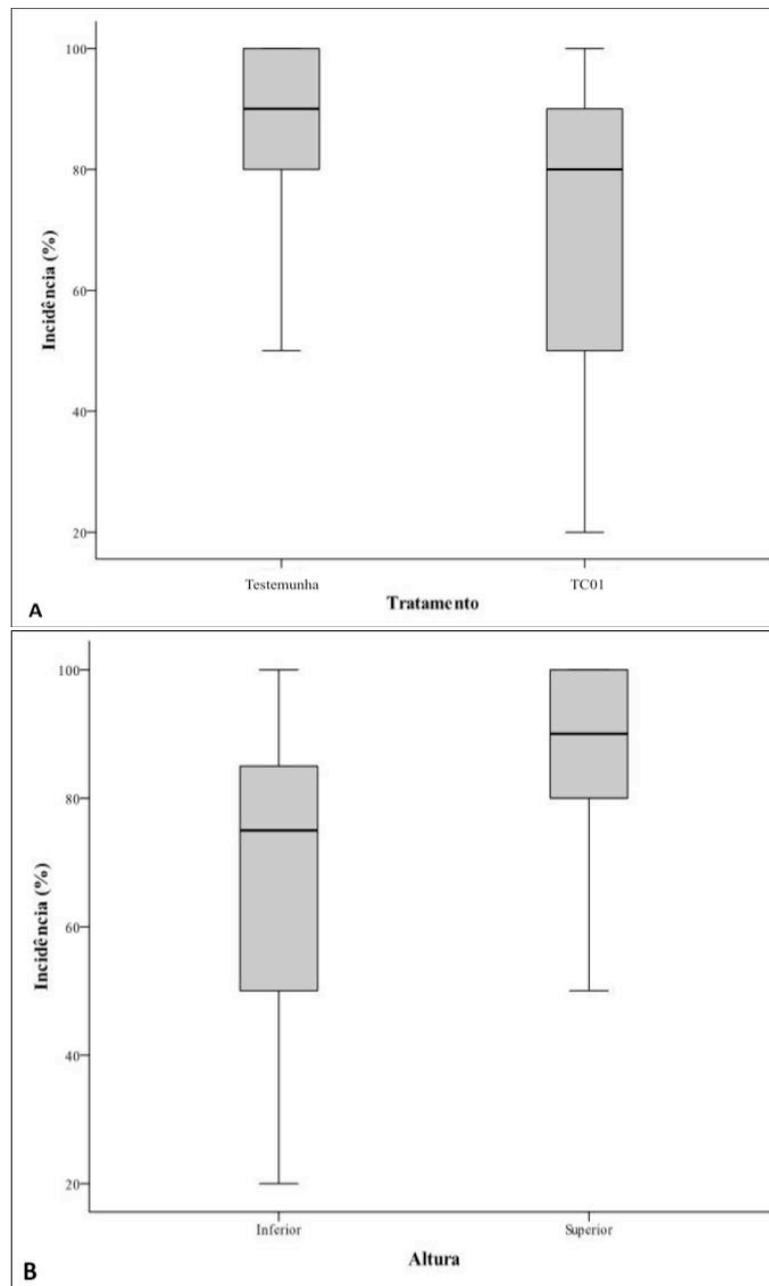


FIGURA 7. Box Plot apresentando as diferenças na incidência da pinta preta dos citros, quando relacionada aos tratamentos (A) e quando relacionada a altura da copa (B). Linha no Box indica o valor da mediana. Linha superior do Box representa o quartil superior (75%). A linha inferior do Box representa o quartil inferior (25%). As linhas externas ao Box representam os percentis superior (95%) e inferior (25%).

A Tabela 3 apresenta os resultados referentes a análise da severidade da pinta preta nos efeitos avaliados. Os tratamentos e as alturas apresentaram diferenças significativas nos valores de severidade. Já, as interações entre tratamento x altura; tratamento x face; face x altura; tratamento x face x altura, também influenciaram nos resultados encontrados (Figura 8).

Os resultados mostram que o isolado TC01 reduziu tanto a incidência quanto a severidade da pinta preta dos citros em tangerineiras cv. Montenegrina.

TABELA 3. Análise de variância mista (PROC GLIMMIX) entre efeitos fixos, não apresentando diferença significativa, quando avaliados em relação a severidade da pinta preta dos citros.

EFEITO	G.L.	<i>F</i>	<i>p</i>
Tratamento	1	6,08	0,0164
Altura	1	12,03	0,0006
Face	1	0,12	0,7296
Trat x Altura	1	3,29	0,0747
Trat x Face	1	0,50	0,4823
Face x Altura	1	1,52	0,2228
Trat xFace x Altura	1	1,93	0,1698

Nas três propriedades avaliadas, o início das pulverizações se deu em janeiro de 2009, portanto os frutos avaliados correspondiam a floração ocorrida de julho a setembro de 2009, essa floração recebeu aplicações do isolado TC01. Segundo a Fundecitrus (2000), o período de suscetibilidade da doença começa no estágio de 2/3 das pétalas caídas e termina cerca de 42 dias após esse evento.

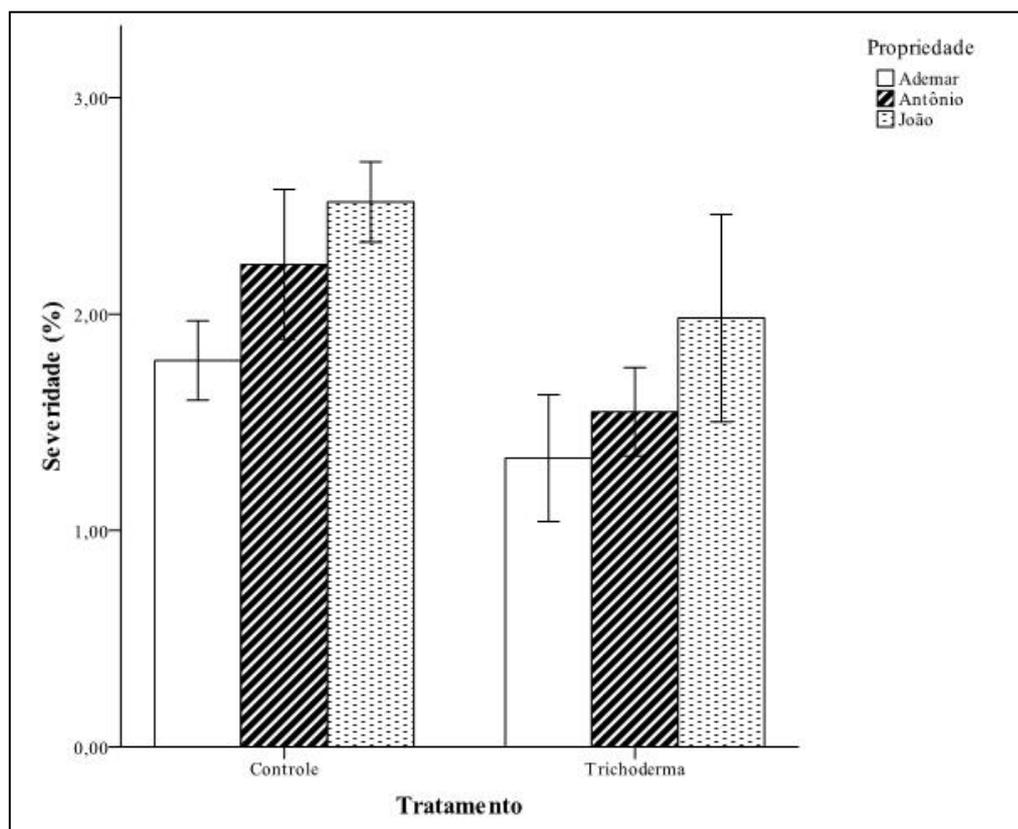


FIGURA 8. Severidade da pinta preta dos citros nas três propriedades amostradas.

A redução de severidade e incidência alcançada foi suficiente para que se considere o isolado TC01 de *T. koningii* um agente de biocontrole eficaz. Porém, segundo relatos dos agricultores-pesquisadores, o ano em questão caracterizou-se por baixa incidência e severidade da pinta preta. Possivelmente em um ano de condições climáticas mais favoráveis a doença, essa diferença seria mais evidente. Guimarães (2008) avaliou a eficiência do mesmo isolado em um pomar orgânico de tangerineiras var. Montenegrina, na região de Faxinal no Vale do Caí/ RS e obteve redução de 18,58 % na incidência e 63,82 % na severidade da pinta preta.

Assim como no trabalho de Guimarães (2008), o isolado TC01 não foi comparado com outros microrganismos com potencial antagonico obtidos do

filoplano de tangerineiras cv. Montenegrina ou de ambientes distintos. Segundo Howell (2004), o melhor método para obtenção de um controle biológico eficaz, é obter o candidato a gente de biocontrole na mesma área em que se espera a função de controle de doenças, pois ele já está adaptado ao ambiente em que vai atuar.

A seleção de microrganismos com potencial antagonico da microflora local, além de apresentar vantagens para o controle biológico de doenças de plantas, apresenta-se como uma importante ferramenta para auxiliar na soberania tecnológica dos citricultores ecológicos do Vale do Cuiabá /RS. A participação dos agricultores, desde o processo de aplicação do isolado TC01, até a avaliação deste no pomar, mesmo que por observações, facilita a apropriação da tecnologia gerada. Uma vez que essa tecnologia possa ser apropriada pelos citricultores, é possível selecionar constantemente novos agentes biocontroladores, não apenas para o manejo da pinta preta dos citros, mas também para outras doenças importantes como a podridão floral causada por *Colletotrichum acutatum* J.H (Guimarães, 2008).

As espécies de *Trichoderma* têm sido extensivamente estudadas, particularmente devido a sua capacidade de atuar como agente de biocontrole (Melo, 1991; Harman, 2000). Esse gênero é conhecido por interagir com outros microrganismos, principalmente fungos, através de diversos mecanismos de ação, como microparasitismo, competição e antibiose. Recentemente foi demonstrado que as espécies de *Trichoderma* também são capazes de induzir resistência sistêmica nas plantas, resultado no controle de infecções bacterianas, fúngicas e virais (Harman, 2004).

Perelló *et al.* (2009) avaliaram a eficiência de quatro isolados de *T.*

harzianum e um isolado de *T. koningii* no controle da mancha do trigo (*Septoria tritici* Rob. ex Desm.) em condições de campo e verificaram que o isolado T4 de *T. koningii* quando pulverizado no trigo, reduziu a incidência e a severidade da doença a valores semelhantes a redução obtida pelo fungicida Folicur®.

O isolado TC01 também pode ser utilizado de forma integrada a outros métodos de manejo. Diversos trabalhos em controle biológico de doenças de plantas têm atingido êxito com a ação conjunta de agentes de biocontrole, podendo resultar em uma ação sinérgica entre os antagonistas, maior plasticidade dos agentes frente às condições climáticas, e levar a um melhor controle de fitopatógenos (Howell, 2003). Dal Soglio (1995) verificou que o controle biológico de *R. solani*, na rizosfera de plantas de Soja (*Glycine max* L.), foi mais efetivo com a combinação do isolado B 153-2-2 de *Bacillus megaterium* com o isolado Th 008 de *T. harzianum*, do que cada antagonista separadamente.

Na oficina de avaliação do projeto, realizada em 22 de novembro de 2010, os agricultores sugeriram que outros processos fossem implementados. Sugeriu-se, novas pesquisas, também de forma participativa, com o emprego de antagonistas, incluindo o *T. koningii* testado e os dois novos microrganismos isolados, em aplicações sobre folhas caídas de citros ao longo do período em que ocorreria a disseminação de esporos sexuais de *G. citricarpa*.

5 CAPÍTULO IV

SUBSTRATOS ALTERNATIVOS PARA A PRODUÇÃO

MASSAL DO ISOLADO TC01 DO FUNGO *Trichoderma koningii*

5.1 Introdução

A agricultura sustentável, produtiva e ambientalmente equilibrada, apóia-se em práticas que promovam a ag robiodiversidade e os processos biológicos naturais, baseando-se no baixo uso de insumos externos. O controle biológico é uma alternativa promissora para o manejo de doenças em sistemas agrícolas sustentáveis, visto constituir-se num processo natural de regulação da população de fitopatógenos (Menezes, 2006).

Dentro do c ontrole biológico, a produção massal do a gente de biocontrole constitui uma das etapas mais importantes (Gomes *et al.*, 2006). Os fungos antagonistas devem ser facilmente cultivados em meios disponíveis e não ser exigentes em seus requerimentos nutricionais, possibilitando que grandes quantidades de inóculo possam ser preparados (Wood & Tveit, 1955). Com a finalidade de obter a produção de conídios de fungos em larga escala, tem se utilizado produtos vegetais de baixo custo, especialmente grãos de arroz (Leite *et al.*, 2003). Tem-se procurado substituir o arroz parboilizado por outro

substrato que apresente o mesmo potencial de cultivo do fitopatógeno e que seja mais barato.

Durante essa pesquisa, os citricultores sugeriram diversos substratos para o desenvolvimento do isolado TC01 do fungo *Trichoderma koningii*. Os substratos sugeridos são produtos de fácil acesso aos agricultores como os compostos utilizados nos cultivos orgânicos ou produtos excedentes da fábrica de sucos da Ecocitrus, como o bagaço de laranja.

Em 1995, a Cooperativa de Citricultores Ecológicos do vale do Caí (Ecocitrus), criou a Usina de Compostagem de Resíduos Agroindustriais, onde o resíduo orgânico de 35 agroindústrias da região são transformados em adubo orgânico. Ao todo, a cooperativa recicla 45 mil toneladas de resíduos industriais por ano e produz 15 mil toneladas de composto (sólido) e 15 mil toneladas de biofertilizante líquido por ano (Fonte: site da Ecocitrus).

Na compostagem biodinâmica são utilizados os chamados preparados biodinâmicos. Com a ajuda dos preparados de composto, são estimulados os processos de formação do solo, ocorrendo a decomposição ordenada da substância orgânica morta e sua transformação em húmus. Os preparados biodinâmicos para compostagem são elaborados com: flores de *Achillea folium*, guardadas em bexiga de cervo macho (502), flores de *Matriarca chamomila*, em intestino delgado de bovino (503), planta inteira de *Urtica dioica* (504), cascas de *Quercus robur* em crânio bovino (505), flores de *Taxacum officinale* em mesentério bovino (506) e suco fermentado de flores de *Valeriana officinalis* (507) (Wistinghausen *et al.*, 2000).

A espécie de cactos *Opuntia* sp. é encontrada facilmente na maioria dos pomares da região do Vale do Caí e é utilizado na alimentação e também como

espalhante adesivo para caldas (sulfocálcica e bordaleza) aplicadas no pomar. O suco de laranja produzido pela Ecocitrus não é fermentado, não tem adição de Açúcar, corantes ou conservantes. O produto final é composto de suco concentrado e água. O bagaço de laranja, é uma mistura de casca, semente e polpa obtida a partir de variedades de laranjas utilizadas na fabricação do suco da Ecocitrus. O bagaço de cana de açúcar é descartado pelos agricultores que produzem cana e utilizam para fabricação de suco.

A batata doce é de fácil cultivo e cultivada pela maioria dos agricultores. Os grãos de arroz quebrados são conhecidos como quirera. Esse produto é muito utilizado como ração animal, tem baixo custo e é facilmente encontrado.

O objetivo deste trabalho foi selecionar um substrato de baixo custo e de grande eficiência no desenvolvimento do isolado TC01 para que os agricultores tenham condições de apropriar-se da tecnologia gerada.

5.2 Materiais e métodos

Dada a necessidade de uma metodologia prática e de baixo custo que possa ser adotada pelos citricultores, foram testados diferentes substratos quanto ao seu potencial para o desenvolvimento do isolado TC01. Todos os substratos são materiais excedentes ou de acesso fácil pelos citricultores. Os substratos foram fornecidos pelos agricultores e as avaliações foram realizadas no Departamento de Fitossanidade da Faculdade de Agronomia da UFRGS.

Para avaliação dos substratos foi utilizada uma escala para análise visual, onde o desenvolvimento do isolado TC01 foi classificado como: 1-BOM (desenvolvimento em toda a placa de Petri, grande esporulação); 2-MEDIO (desenvolvimento em toda a placa de Petri, média esporulação) ; 3-NULO (sem desenvolvimento). Os testes foram realizados em momentos

diferentes, por falta de infraestrutura do laboratório. O padrão de desenvolvimento foi o meio de cultura BDA usualmente utilizado para o cultivo de fungos filamentosos.

5.2.1 Composto Ecocitrus e Composto Biodinâmico

Foram utilizadas duas amostras: composto tradicional, utilizado pelos agricultores associados à Ecocitrus e o composto desenvolvido a partir dos conceitos da Biodinâmica. Foram feitos dois tratamentos com cada amostra de composto: esterilizado e não-esterilizado. Cada tratamento teve três repetições e a Testemunha. Em sacos plásticos com capacidade para 3L foram colocados 400 g do composto. Em cada saco foram inoculados 2 mL do isolado TC01 do fungo *T. koningii* contendo 3×10^8 conídios/mL. A testemunha consistiu de 400 g do composto inoculado com 2 mL de água destilada esterilizada. Os tratamentos foram mantidos em câmara de crescimento por 15 dias, com fotoperíodo de 12 h, a $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

Após esse período, foi feita a avaliação do experimento. Garrafas de vidro com capacidade para 300mL, contendo 90 mL de água destilada foram esterilizadas. Em cada garrafa colocou-se 10g de uma das amostras de composto. A suspensão (10^0) foi agitada por alguns instantes e então foi retirado 1 ml e colocado em um tubo de ensaio contendo 9 ml (10^{-1}) de água destilada esterilizada. Esse tubo foi agitado durante um minuto com o auxílio de um agitador. Foi então retirado 1 ml dessa diluição e colocado em outro tubo contendo 9 ml (10^{-2}). Esse tubo foi agitado por 1 minuto e dele foi retirado três alíquotas de 500 μ l e colocadas em placas de Petri contendo meio de cultura BDA e espalhadas com auxílio da alça de Drigalski. Cada tratamento teve 5 repetições. As placas foram mantidas em BOD, com fotoperíodo de 12h, a $28 \pm$

2°C. Após 72h foi feita a contagem de esporos de cada repetição. Para a contagem de esporos, as placas foram raspadas com 10 mL de água destilada, a suspensão resultante foi colocada em um tubo de ensaio e agitada no vortex por 1min, então foi feita a contagem dos esporos com o auxílio de uma câmara de Neubauer.

5.2.2 Cactos (*Opuntia* sp.)

Em dois litros de água destilada foram submersas 80 g de folhas de cactos. As folhas ficaram na água durante duas semanas, em contato direto com o ar, até que a solução ficasse viscosa. Em erlenmeyers de 500 mL foram colocados 300 mL da suspensão. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 4 tratamentos: substrato com açúcar esterilizado e não esterilizado e substrato sem açúcar esterilizado e não esterilizado. Em cada erlenmeyer foram inoculados 2 discos de 6 mm de diâmetro contendo micélio e esporos de *T. koningii*. Cada tratamento teve seis repetições, três repetições foram mantidas em agitação e três ficaram paradas. Os tratamentos foram mantidos por duas semanas em câmara de crescimento, com fotoperíodo de 12 horas, a $25\pm 2^\circ\text{C}$.

Após esse período o experimento foi avaliado. Foi retirada uma alíquota de 1mL da suspensão final e colocada num tubo de ensaio contendo 9 mL de água destilada esterilizada (10^0). Esse tubo foi agitado por 30 segundos. O mesmo procedimento foi repetido até a concentração 10^{-2} . Foram retirados 5 mL dessa suspensão e espalhados, com auxílio da alça de Drigalski, em placas de Petri de 15 cm de diâmetro contendo meio de cultura BDA. Cada tratamento teve 5 repetições. As placas foram mantidas em câmara de com fotoperíodo de 12 horas, a $25\pm 2^\circ\text{C}$. Após 72h foi feita a contagem de esporos. Para a contagem

de esporos, as placas foram raspadas com 10 mL de água destilada, a suspensão resultante foi colocada em um tubo de ensaio e agitada no vortex por 1min, então foi feita a contagem dos esporos com o auxílio de uma câmara de Neubauer.

5.2.3 Suco de laranja

Para o meio de cultura com suco foi utilizada a laranja cv. Valência de procedência do pomar do agricultor Norton Steffen, localizado na região de Santos Reis no município de Montenegro.

Para o experimento com meio de cultura líquido com suco de laranja foram utilizados erlenmeyers com 200 mL de meio de cultura. Para 200 mL de meio utilizou-se 40 mL de suco de laranja e 4 g de açúcar. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com dois tratamentos, com açúcar e sem açúcar, e três repetições. A testemunha consistiu do isolado TC01 inoculado em meio de cultura BD. Os tratamentos foram esterilizados a 120°C por 20 min. Após a esterilização foi inoculado dois discos de meio BDA contendo micélio e esporos do i solado TC01 em cada erlenmeyer. Os tratamentos foram mantidos sob agitação por sete dias, com fotoperíodo de 12 h, a 25±2°C. Após o período de incubação o micélio foi filtrado e mantido, por três dias, a 60°C, a fim de pesar o micélio seco.

Para 500 mL de meio de cultura sólido utilizou-se: 250 mL de suco de laranja cv. Pêra, 1,5 g de carbonato de cálcio, 10 g de dextrose, 7,5 g de Agar e 250 mL de água destilada. Os componentes forma misturados e esterilizados a 120°C por 20 min. O meio foi vertido em placas de Petri e o isolado TC01 de *T. koningii* foi inoculado com o auxílio de uma alça de platina. O tratamento teve dez repetições e, a t estemunha consistiu do i solado inoculado em meio de

cultura BDA. As placas foram mantidas em câmara de crescimento com fotoperíodo de 12h, a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$. Após 7 dias foi feita a contagem dos esporos. Para a contagem de esporos, as placas foram raspadas com 10 mL de água destilada, a suspensão resultante foi colocada em um tubo de ensaio e agitada no vortex por 1min, então foi feita a contagem dos esporos com o auxílio de uma câmara de Neubauer.

5.2.4 Calda de bagaço de laranja

Duzentos gramas de bagaço de laranja cv. Pêra foram fervidos por 5 minutos em 1L de água destilada. Da calda resultante foram feitos dois tipos de meio de cultura, meio sólido e meio líquido.

Para 200 mL de meio de cultura sólido utilizou-se 40 mL da calda, 3 g de ágar e 4 g de açúcar. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com dois tratamentos, com açúcar e sem açúcar e 10 repetições. O meio de cultura foi esterilizado a 120°C por 20 min. Após a esterilização verteu-se o meio em placas de Petri e inoculou-se o isolado TC0. A testemunha consistiu do isolado TC01 inoculado em meio BDA. As placas foram mantidas em câmara de crescimento por sete dias, com fotoperíodo de 12 horas, a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$. Após esse período foi feita a contagem dos esporos. Para a contagem de esporos, as placas foram raspadas com 10 mL de água destilada, a suspensão resultante foi colocada em um tubo de ensaio e agitada no vortex por 1min, então foi feita a contagem dos esporos com o auxílio de uma câmara de Neubauer.

Para o meio líquido foram utilizados erlenmeyers com 200 mL de meio de cultura. Para 200 mL de meio utilizou-se 40 mL da calda da casca e do

bagaço da laranja e 4 g de açúcar. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com dois tratamentos, com açúcar e sem açúcar e quatro repetições. Os tratamentos foram esterilizados a 120°C por 20 min. Após a esterilização foi inoculado 2 discos de meio BDA contendo micélio e esporos do isolado TC01 em cada erlenmeyer. Os tratamentos foram mantidos sob agitação em câmara de crescimento, por sete dias, com fotoperíodo de 12 horas a 25±2°C. A testemunha consistiu do isolado TC01 inoculado em meio BD. Após o período de incubação o micélio foi filtrado e mantido a 60°C por três dias a fim de pesar o micélio seco.

5.2.5 Bagaço de cana de açúcar

O bagaço de cana de açúcar foi fornecido pelo agricultor Jean Steffen. No laboratório, 200g do bagaço foi fervido em 1L de água destilada por aproximadamente 20 min. O caldo foi separado e nele foram adicionados 20g de dextrose, 15g de Agar e água destilada até completar 1L. O meio foi autoclavado por 20 min a 120°C. Depois de esterilizado, o meio foi vertido em placas de Petri e o isolado TC01 foi inoculado com o auxílio de uma alça de platina. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 10 repetições. A testemunha consistiu do isolado TC01 inoculado em meio BDA. As placas foram mantidas em câmara de crescimento, por sete dias, com fotoperíodo de 12 h, a 25±2°. Após esse período os esporos dos tratamentos foram contados. Para a contagem de esporos, as placas foram raspadas com 10 mL de água destilada, a suspensão resultante foi colocada em um tubo de ensaio e agitada no vortex por 1min, então foi feita a contagem dos esporos com o auxílio de uma câmara de Neubauer.

5.2.6 Batata doce (*Ipomoea batatas*)

Para o meio de cultura com batata doce foram utilizadas 200g de batata, 20 g de dextrose, 15g de Agar e 1 L de água destilada. A batata doce foi cozida em 500 mL de água destilada, após o cozimento o caldo foi separado e nele foram adicionados o Agar, a dextrose e água destilada até completar 1L. O meio de cultura foi autoclavado por 20 min a 120°C. Depois de esterilizado o meio foi vertido em placas de Petri e o isolado TC01 foi inoculado com o auxílio de uma alça de platina. A testemunha consistiu de placas com meio de cultura BDA. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com cinco repetições. As placas foram mantidas em câmara de crescimento, por sete dias, com fotoperíodo de 12h, a 28±2°. Após esse período foram, os esporos foram contados. Para a contagem de esporos, as placas foram raspadas com 10 mL de água destilada, a suspensão resultante foi colocada em um tubo de ensaio e agitada no vortex por 1min, então foi feita a contagem dos esporos com o auxílio de uma câmara de Neubauer.

5.2.7 Arroz Quirera

Sacos plásticos transparentes com capacidade de 2 L com 250 g de grãos de arroz sem casca foram esterilizados em autoclave a 120°C por 30 min. Estes foram inoculados com 50 mL de uma suspensão com 10⁷ esporos/mL do isolado TC01. Após a incubação por 14 dias, a 25±2°C, o substrato colonizado foi seco a 36°C, por aproximadamente 72h. E seguida o substrato foi triturado e passado numa peneira de 40 Mesh. Dez gramas do produto resultante foi dissolvido em 90 ml de água e então os esporos foram contados com auxílio de uma câmara de Neubauer.

5.3 Resultados e discussão

O isolado TC01 apresentou desenvolvimento satisfatório em todos os substratos testados. Após a avaliação visual e à classificação dos substratos quanto ao desenvolvimento do isolado (Tabela 1) foi feita a contagem de esporos do TC01 em cada um dos meios de cultura alternativos (Tabela 2). A análise estatística para o desenvolvimento do isolado TC01 quanto à produção de esporos não foi realizada, pois os experimentos foram realizados em momentos diferentes e com diferentes delineamentos experimentais.

Segundo Alves & Pereira (1998) a produção de fungos em meios sólidos é a forma mais utilizada por não necessitar de tecnologia sofisticada. A seleção de meios de cultura é um aspecto importante a ser considerado na produção massal de um microrganismo para seu uso no controle biológico (Khalil *et al.*, 1985). Dorta *et al.* (1990) avaliaram a produção do fungo *M. anisopliae* em meio de cultura sólido constituído por farelo de arroz, casca de arroz e a mistura de ambos e verificaram que a maior produção de esporos foi obtida no meio composto pela mistura de ambos os substratos. Segundo Grajek (1994), a maior produção de esporos ($3,2 \times 10^9$ conídios g^{-1}) de *L. lecanii* ocorreu quando o fungo foi cultivado em meio contendo a mistura de farelo de trigo e polpa de beterraba, enquanto que para *B. bassiana* a maior produção ($3,4 \times 10^9$ conídios g^{-1}) foi obtida no meio composto pela mistura de casca de batata e bagaço de cana-de-açúcar (Santa *et al.*, 2005). O arroz ainda tem sido um dos substratos mais utilizados para o crescimento e esporulação de fungos agentes de controle biológico. Porém, é imperativa a busca de substratos alternativos que não sejam utilizados em alimentação humana e animal, mas que sejam tão eficientes como o arroz, e de menor custo (Marques *et al.*, 2007).

Tanto o composto preparado pela Ecocitrus quanto o composto preparado segundo a biodinâmica se mostraram eficientes substratos para o desenvolvimento do isolado TC01. Após o período em câmara de crescimento os compostos não apresentaram nenhuma mudança na sua aparência, não sendo possível identificar a olho nu o desenvolvimento do agente de biocontrole, porém após a suspensão com o composto ser inoculada em meio de cultura BDA, foi verificado o desenvolvimento do isolado TC01 (Figura 1). Todas as repetições apresentaram desenvolvimento do isolado em todo o diâmetro da placa em menos de 48 horas. Os compostos seriam uma alternativa para os agricultores se apropriarem da tecnologia de controle biológico da pinta preta dos citros e produzirem massalmente o isolado, já que eles são produzidos pelos próprios agricultores e tem baixo custo, porém a metodologia de uso necessita ser avaliada, pois o composto é aplicado no solo e o isolado TC01 foi aplicado na copa das árvores. O fungo *G. citricarpa*, durante o seu ciclo de vida, pode atingir folhas e frutos de duas formas: pelos seus esporos assexuais (picnidiósporos) que se desenvolvem nas lesões, principalmente em frutos, folhas, no pedúnculo e também em folhas mortas; ou pelos seus esporos sexuais (ascósporos) que se desenvolvem nas folhas em decomposição no solo (Feichtenberger, 1996; Robbs, 1990). O composto incrementado com o isolado TC01 e espalhado no solo, poderia diminuir o inóculo do fitopatógeno nas folhas em decomposição.

Nos meios de cultura elaborados com o *Cactus Opuntia* sp., não esterilizados houve o predomínio de desenvolvimentos de leveduras e pouco desenvolvimento do isolado TC01. Nos meios de cultura esterilizados, o isolado TC01 apresentou desenvolvimento, sendo que nas repetições não agitadas, a

esporulação foi maior (Figura 2). Não houve diferença entre o tratamento suplementado com açúcar e o não suplementado. Os resultados indicam que é viável o desenvolvimento do isolado TC01 (Tabelas 2 e 3) para posterior utilização no controle de pragas, em meio de cultura de folhas de cactos.

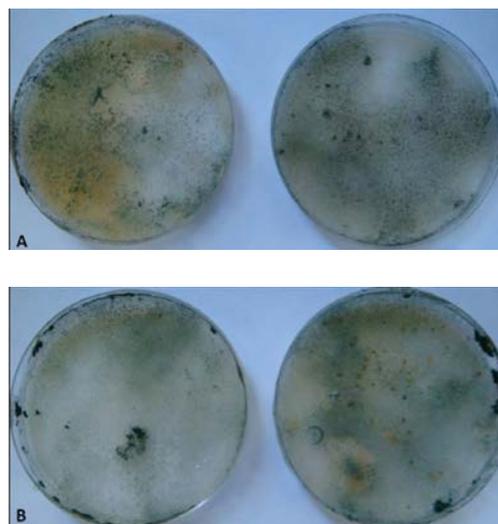


FIGURA 1. Desenvolvimento do isolado TC01 no composto Ecocitrus (A); Desenvolvimento do isolado TC01 no composto preparado segundo a biodinâmica (B). Fonte: Pandolfo, J., Porto Alegre, 2010.

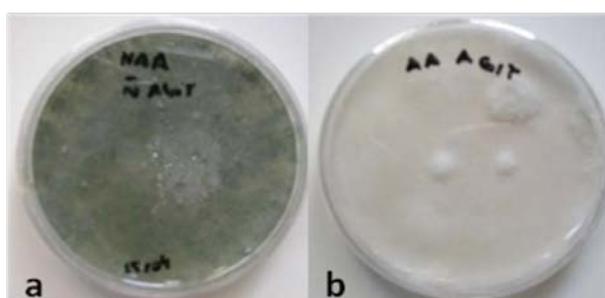


FIGURA 2. Desenvolvimento do isolado TC01 em meio BDA. Tratamento esterilizado suplementado com açúcar e não agitado (a); Tratamento esterilizado suplementado com açúcar e agitado (b). Fonte: Pandolfo, J., Porto Alegre, 2010.

Para a avaliação dos meios de cultura líquido com suco de laranja e com calda de bagaço, foram feitas lâminas do micélio desenvolvido no meio para

observação no microscópio óptico e medido o peso do micélio seco dos tratamentos (Tabela 1). O isolado TC01 não apresentou esporulação, apenas crescimento micelial, quando cultivado em meio de cultura a base de suco de laranja e à base de bagaço de laranja. Não houve diferença no resultado quanto à suplementação de açúcar no meio (Figura 3 e 4). A testemunha, isolado TC01 cultivado em meio líquido BD, apresentou esporulação de $2,4 \times 10^8$ conídios/mL e 4,130 g de micélio seco.

A partir desses resultados, pode-se concluir que os meios de cultura líquidos contendo suco de laranja e calda de bagaço de laranja não são uma opção eficiente para o cultivo do isolado TC01, pois o isolado não apresentou desenvolvimento das estruturas de reprodução. As funções dos esporos são a produção de novos indivíduos, a dispersão a um novo local e a sobrevivência do organismo até o retorno das condições favoráveis (Leite & Espósito, 2004).

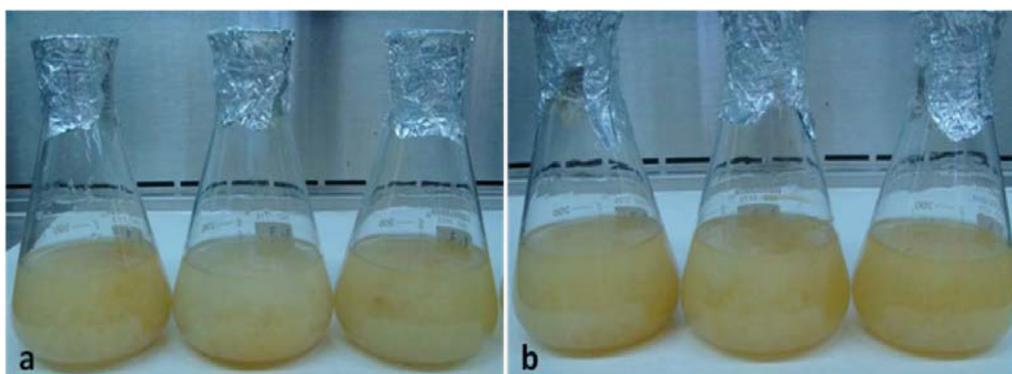


FIGURA 3. Desenvolvimento micelial do isolado TC01 em meio de cultura a base de suco de laranja suplementado com açúcar (a) e não suplementado (b). Fonte: Pandolfo, J., Porto Alegre, 2010.

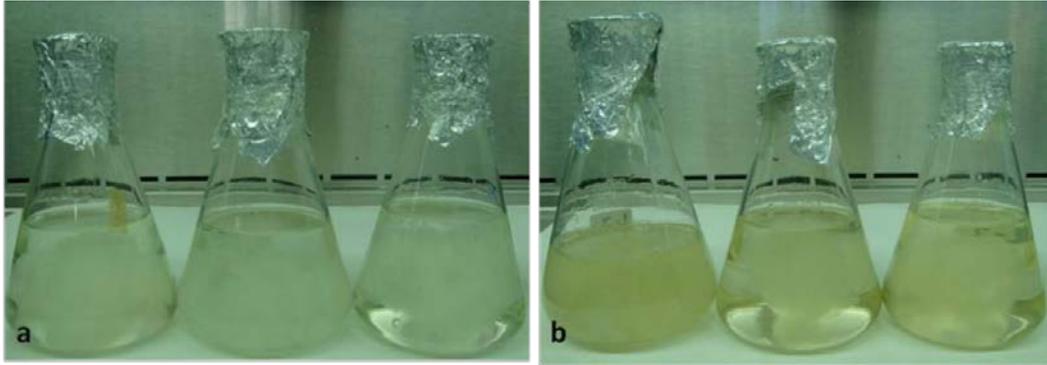


FIGURA 4. Desenvolvimento micelial do isolado TC01 em meio de calda de casca e bagaço de laranja não suplementado com açúcar (a) e suplementado com açúcar (b). Fonte: Pandolfo, J., Porto Alegre, 2010.

TABELA 1. Peso do micélio seco dos tratamentos com suco e calda de laranja

Tratamentos	Peso micélio seco (g)
BD - Testemunha	4,130
Meio calda de laranja sem açúcar	0,200
Meio calda de laranja com açúcar	1,055
Suco de laranja sem açúcar	1,700
Suco de laranja com açúcar	2,260

No meio sólido de calda de bagaço de laranja, o i solado TC01 apresentou fraco desenvolvimento. A colônia do fungo ocupou todo diâmetro da placa, porém houve pouca esporulação. Não houve diferença entre o meio suplementado com açúcar e o meio não suplementado (Figura 5).

Outras alternativas seriam a utilização de meios de cultura com suco de laranja ou com batata doce. Esses meios de cultura são de baixo custo para os agricultores, devido a produção local dos substratos. A Figura 6 mostra o desenvolvimento do isolado TC01 em meio de cultura contendo suco de laranja (A) e meio de cultura elaborado com batata doce (B).

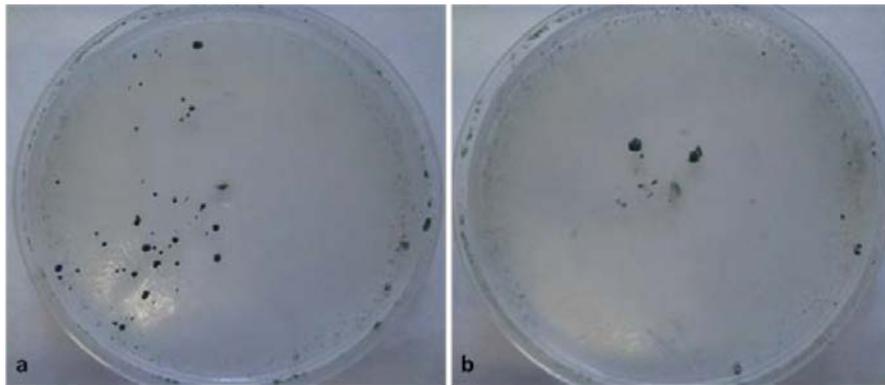


FIGURA 5. Desenvolvimento do isolado TC01 em meio de calda de casca e bagaço de laranja suplementado com açúcar (a) e não suplementado (b). Fonte: Pandolfo, J., Porto Alegre, 2010

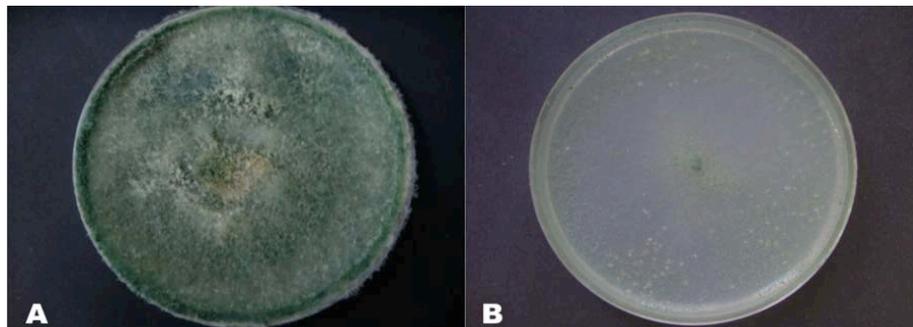


FIGURA 6. Desenvolvimento do isolado TC01 em meio de cultura com suco de laranja (A) e em meio de cultura com batata doce (B). Fonte: Pandolfo, J., Porto Alegre, 2010.

TABELA 2. Avaliação do desenvolvimento do isolado TC01 em diferentes substratos, utilizando uma escala de notas para análise visual.

Substrato	Nota para o desenvolvimento do isolado TC01
Composto Ecocitros esterilizado	Bom
Composto Ecocitrus não esterilizado	Bom
Composto biodinâmico esterilizado	Bom
Composto biodinâmico não esterilizado	Bom
Cactus <i>Opuntia</i> sp.	Médio
Calda e bagaço de laranja	Médio
Cana de açúcar	Médio
Batata doce	Medio
Suco de laranja	Bom
Arroz quirera	Bom

TABELA 3. Contagem de esporos do isolado TC01 quando cultivado em substratos alternativos.

Tratamento	Esporos /mL
BDA - Testemunha	$2,4 \times 10^8$
Composto Ecocitrus esterilizado	$6,26 \times 10^7$
Composto Ecocitrus não esterilizado	$1,0 \times 10^8$
Composto biodinâmico esterilizado	$6,22 \times 10^7$
Composto biodinâmico não esterilizado	$7,15 \times 10^7$
Cactus <i>Opuntia</i> sp.	$2,65 \times 10^7$
Calda e bagaço de laranja	$1,45 \times 10^7$
Cana de açúcar	$2,0 \times 10^7$
Batata doce	$2,6 \times 10^7$
Arroz quirera	$2,8 \times 10^8$
Suco de laranja	$3,6 \times 10^8$

Apesar deste estudo ter sido realizado em escala de bancada, os resultados obtidos servem como um ponto de partida para o escalonamento do processo. Esse processo em escala industrial poderá vir a gerar um impacto bastante representativo no controle biológico da pinta preta dos citros, pois está diretamente relacionado à viabilização de uma rota tecnológica que permite o aproveitamento de materiais normalmente descartados e de produtos cultivados pelos agricultores, tornando possível a diversificação das fontes de matéria-prima para a produção massal do isolado TC01, agente de biocontrole da pinta preta dos citros.

6 CAPÍTULO V

UTILIZAÇÃO DE MÉTODOS PARTICIPATIVOS NO CONTROLE BIOLÓGICO DA PINTA PRETA DOS CITROS

6.1 Introdução

A citricultura representa um importante segmento econômico para o Brasil. No Estado do Rio Grande do Sul – RS, a citricultura além de apresentar importância econômica, exerce importante papel social e cultural nas regiões onde está concentrada, pois é desenvolvida, basicamente pela agricultura familiar. A região do Vale do Rio Caí- RS é a principal região produtora de citros do Rio Grande do Sul e é caracterizada por pomares de, em média, 5 ha e com diversas espécies de citros cultivadas na mesma área, a mão de obra é quase que exclusivamente familiar e, ao longo das últimas décadas esses agricultores enfrentam dificuldades de toda ordem, em especial de aumento de custos e problemas fitossanitários, que os levaram a buscar soluções organizativas e produtivas, como de geração de tecnologias (Pacífico & Dal Soglio, 2008).

A agricultura familiar alavanca grande parte da agricultura brasileira, caracterizando um importante fator no desenvolvimento das comunidades

rurais. Práticas de agricultura orgânica ou ecológica, que tenham uma visão sistêmica, constituem meios de garantir a sustentabilidade destas comunidades. No entanto, este setor necessita que a pesquisa forneça subsídios para o desenvolvimento de tecnologias adequadas para a produção de frutos de qualidade e representatividade no Mercado (Dal Soglio *et al.*, 2007).

De modo geral, as tecnologias são tradicionalmente desenvolvidas com um viés reduzido, presumindo-se que todos os ambientes são iguais e que resultados obtidos em uma estação experimental podem ser aplicados de forma generalizada, isso acontece devido à visão cartesiana de pesquisa e desenvolvimento tecnológico, amplificada pela divisão de tarefas entre pesquisadores, extensionistas e agricultores. Desta forma, muitas vezes, e em especial quando tratamos de sistemas ecológicos, a tecnologia gerada em um modelo cartesiano não está adaptada às condições locais, sejam essas ecológicas, econômicas ou culturais (Petersen *et al.*, 2009).

A mudança de perspectiva no desenvolvimento de tecnologias, com base em metodologias participativas, inclui os atores e conhecimentos locais, favorecendo a adaptação às condições ecológicas e sociais prevalentes em cada agroecossistema, além de permitir a apropriação pelos agricultores das tecnologias geradas. Neste contexto, as “metodologias participativas” têm sido valorizadas e, via de regra, inseridas no processo de operacionalização do desenvolvimento rural. Assim, um dos traços característicos dos novos discursos sobre a promoção do desenvolvimento é a ênfase auferida à participação e, associada a ela, ao planejamento participativo (Bandeira, 2000).

A pesquisa participativa procura estabelecer um diálogo entre os saberes dos diferentes atores (agricultores, técnicos, extensionistas, pesquisadores) e

uma visão sistêmicas nas interfaces, sendo mediadas em uma abordagem construtivista. Essa mudança, que aparenta ser uma questão simples de inversão de posições, depende, no entanto, de uma ruptura paradigmática considerável, que obriga os atores a se exporem a novas formas de pensar, e a revisar completamente seus conhecimentos e práticas cotidianas.

Diante disto, desenvolveu-se uma pesquisa com o objetivo de testar, estudar e desenvolver métodos alternativos para o controle biológico da pinta preta dos citros, bem como despertar e capacitar os citricultores para as atividades de pesquisas locais.

6.2 Grupo de Citricultura Ecológica

A transição Agroecológica depende de mudanças em diferentes níveis de manejo dos agroecossistemas, desde a integração da agricultura com os ecossistemas naturais e com as sociedades que dela dependem, até a reconexão do agricultor à agricultura e aos aspectos de produção sustentável. No momento, a transição agroecológica tem sido baseada, de forma geral, em experiências de grupos de agricultores e comunidades agrícolas. Porém, são necessárias políticas públicas que possibilitem uma mudança generalizada nas interfaces entre instituições públicas, agricultores e comunidades locais, valorizando, assim, aspectos dos conhecimentos locais e possibilitando a geração de tecnologias contextualizadas. Além disso, a mudança na agricultura, visando a sustentabilidade, depende de uma renovação na formação de pesquisadores e extensionistas, os quais devem assumir funções de mediação nos processos participativos de geração de tecnologias, na perspectiva construtivista segundo Chambers (1994).

Foram exatamente estas as considerações que aproximaram a Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e a Cooperativa dos Citricultores Ecológicos do Vale do Cói (ECOCITRUS). Motivados pela necessidade de ter tecnologias adequadas e que gerassem autonomia nos agricultores, além do desenvolvimento de estratégias de pesquisa participativa e formação de profissionais com visão sistêmica e capazes de operar métodos de pesquisa participativa, em 2001 iniciou-se um projeto de validação e geração de tecnologias para a citricultura de base ecológica. À partir das primeiras experiências, o projeto evoluiu para um Programa de Pesquisa em Citricultura Ecológica, e passou a envolver diversas entidades e organizações, como a EMATER/RS, a Associação Companheiros da Natureza, e outras associações de citricultores, inclusive de citricultores convencionais. Este grupo adotou o nome de Grupo de Citricultura Ecológica (GCE), e em 2004 foi elaborado o primeiro convênio institucional, já incorporando a EMBRAPA – Clima Temperado. Esse grupo realiza diversos encontros e seminários desde então, com participação ampla da comunidade de agricultores, pesquisadores e técnicos ligados à extensão rural, que buscam, de forma contínua e participativa, diagnosticar novas necessidades de pesquisa, acompanhar os trabalhos em andamento e avaliar os processos e metodologias que estão sendo utilizados nesses trabalhos. Foi a partir desses diagnósticos que foram elaborados projetos submetidos a editais públicos de financiamento de pesquisa, e que ao longo dos últimos anos permitem que sejam realizados diferentes projetos nas mais diferentes áreas prioritárias determinadas pelo GCE (Pacífico & Dal Soglio, 2008).

Entre os aspectos produtivos apontados como prioritários, destacaram-se necessidades de estudos sobre o manejo de coberturas vegetais, a avaliação de sistemas agroflorestais, a avaliação de variedades melhor adaptadas ao manejo ecológico, e a busca de soluções para diversos problemas fitossanitários, especialmente a ocorrência de perdas devido ataque da mosca-das-frutas (*Anastrepha fraterculus* Wiedemann), manejo do cancro cítrico, cujo o agente causal é a bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, e manejo da pinta preta dos citros, doença causada pelo fungo *Guignardia citricarpa* Kiely.

Foram implementados, assim, pelos diversos parceiros, inúmeros trabalhos de pesquisa caracterizados pela participação dos agricultores em diferentes níveis, buscando-se, sempre, a inclusão do conhecimento local, a adequação às condições ambientais da região, e a apropriação das tecnologias pelos agricultores. Entretanto, ao longo do tempo, verificou-se que haviam dificuldades de diferentes ordens para a integração total dos agricultores aos projetos de pesquisa. Na maioria das vezes os agricultores participavam da definição dos temas de pesquisa, cediam seus pomares, e participavam da discussão sobre os resultados obtidos nas pesquisas, que de fato eram realizadas pelos pesquisadores. Em parte, em função da cultura predominante da especialização das funções de cada participante, pesquisadores, extensionistas e agricultores não conseguiam implementar projetos que fossem desenhados com base em metodologias participativas em todas as suas etapas, incluindo planejamento, execução e avaliação dos resultados.

Foi com o objetivo de aprofundar a experiência em pesquisa participativa de fato, com envolvimento de agricultores em todas as etapas, que, em 2007, iniciou-se o projeto “Desenvolvimento Participativo do Manejo

Agroecológico da Pinta Preta dos Citros em comunidades do Vale do Rio Caí, no Rio Grande do Sul” ou “Projeto Pinta Preta” (Figura 1).

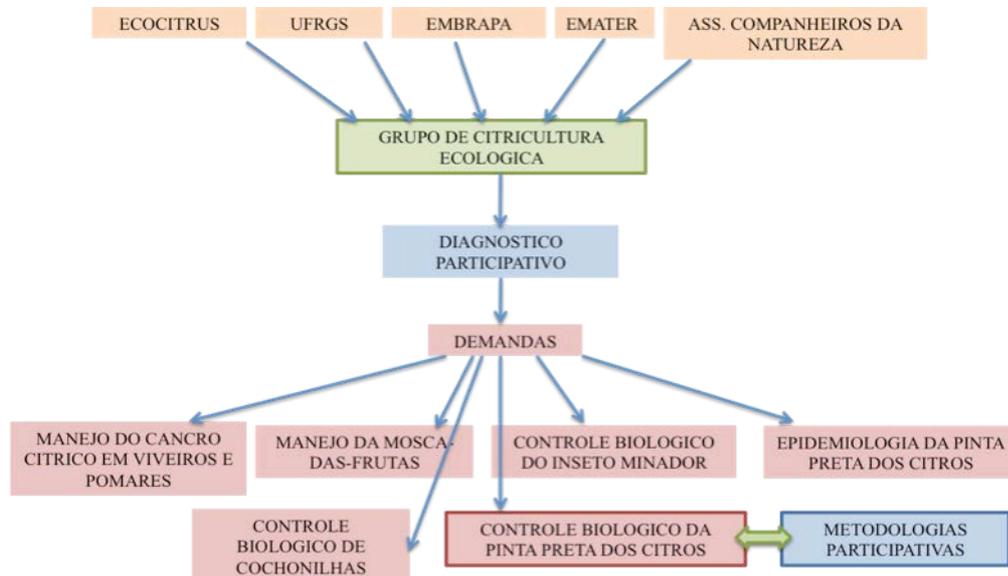


FIGURA 1. Esquema ilustrativo do processo, até a formação do Grupo de Pesquisa Participativa.

6.3 Desenvolvimento participativo do manejo agroecológico da pinta preta dos citros em comunidades do Vale do Caí/ RS - Projeto Pinta Preta.

A adoção de metodologias participativas, pela Fitopatologia, que incorporem a participação de comunidades, dos agricultores e da sociedade em geral, no desenvolvimento de métodos de controle de doenças pode aproximar esta ciência da perspectiva do desenvolvimento sustentável e contribuir para a construção do conhecimento agroecológico da localidade de pesquisa em questão (Pacífico & Dal Soglio, 2008). O termo Desenvolvimento Participativo de Tecnologias (Participatory Technology Development – PTD) tem sido utilizado com esforços de agentes de desenvolvimento (ligados à pesquisa, extensão, ONGs, etc.) a colaborar com agricultores e comunidades rurais para o desenvolvimento e disseminação de novas metodologias práticas agropecuárias

que, especialmente, valorizam o envolvimento dos agricultores nos programas e projetos, ainda fortemente controlados por instituições de pesquisa e de extensão rural (Veldhuizen *et al.*, 1997).

O projeto “Desenvolvimento Participativo do Manejo Agroecológico da Pinta Preta dos Citros em Comunidades do Vale do Rio Caí, no Rio Grande do Sul” foi financiado pelo CNPq, no Edital MCT/CNPq/MDA/SAF/MDS/SESAN 36/2007- Agricultura Familiar, e teve como objetivo desenvolver, participativamente, uma tecnologia de base agroecológica para o manejo da pinta preta dos citros, além do desenvolvimento de metodologias participativas que estimulassem o envolvimento de agricultores, pesquisadores e estudantes, na geração desta tecnologia.

Uma das demandas do Grupo de Citricultura Ecológica era desenvolver um manejo adequado para a pinta preta dos citros, que segundo os agricultores, em anos favoráveis ao patógeno, pode causar até 40% de perda na produção. Sendo assim, em estudos realizados previamente (Guimarães, 2008; Corrêa, 2008) foi determinado o potencial do controle biológico da pinta preta dos citros com microrganismos antagônicos obtidos de pomares ecológicos de tangerineiras cv. Montenegrina da região. Um fungo da espécie *Trichoderma koningii* (Guimarães, 2008), obtido epifiticamente de folhas de tangerineiras cv. Montenegrina do pomar do citricultor Luis Laux, apresentou resultados satisfatórios no controle do fungo *G. citricarpa*, tanto em ensaios *in vitro*, quanto em testes *in vivo* realizados no mesmo pomar de onde foi isolado. Portanto, o isolamento, a produção massal e a aplicação (controle biológico por inundação) de microrganismos com potencial antagônico, obtidos localmente seriam alternativas para o manejo da pinta preta pelos citricultores. O

desenvolvimento de tecnologias envolvidas no controle biológico, no entanto, só tem validade, com o envolvimento dos atores.

A partir desse resultado foi delineado o projeto de pesquisa participativa. O projeto teve início em Fevereiro de 2008. Durante todo o ano de 2008 foram realizadas diversas reuniões com os agricultores pra definição dos participantes e do método de pesquisa. Onze citricultores ecológicos aceitaram participar do projeto como agricultores-pesquisadores. Formaram-se, então três grupos de pesquisa, onde os agricultores foram agrupados por proximidade das suas propriedades: Grupo Faxinal com os agricultores Luis Laux, João Kranz, Ildo e Maique; Grupo Pareci Novo com Antônio Bays, Eduardo Schroder e William Rocha; Grupo Santos Reis com Ademar Hentz, Martin, Norton Steffen e Jean Steffen.

A equipe de pesquisadores da UFRGS foi formada por: o coordenador do projeto; um coordenador das atividades de laboratório; um bolsista do CNPq, responsável pelos registros, organização de encontros e reuniões, e cinco alunos de graduação, bolsistas de iniciação científica, de iniciação tecnológica, e de extensão, executando diferentes funções e partes do projeto, em especial na realização das oficinas com métodos participativos, nas atividades em laboratório, e realizando pesquisas complementares, como desenvolvimento de meios de culturas, avaliação de antagonistas, realização de bioensaios e de testes de patogenicidade. Ao longo dos três anos, houve algumas trocas no grupo de pesquisa da UFRGS, especialmente quanto ao articulador junto aos agricultores. A Figura 2 ilustra os diferentes grupos participantes da pesquisa e as atividades realizadas.

6.4 Oficinas e reuniões realizadas durante a pesquisa

O Projeto de Pesquisa Pinta Preta (PPP) iniciou suas atividades em março de 2008. Durante os primeiros meses da pesquisa, ocorreram encontros esporádicos para apresentação de todos os envolvidos (agricultores, alunos de graduação, extensionistas e pesquisadores), para discussão da demanda e para definição dos agricultores interessados em participar do projeto. Definidos os agricultores – pesquisadores, foram formados os três grupos de pesquisa apresentados anteriormente.

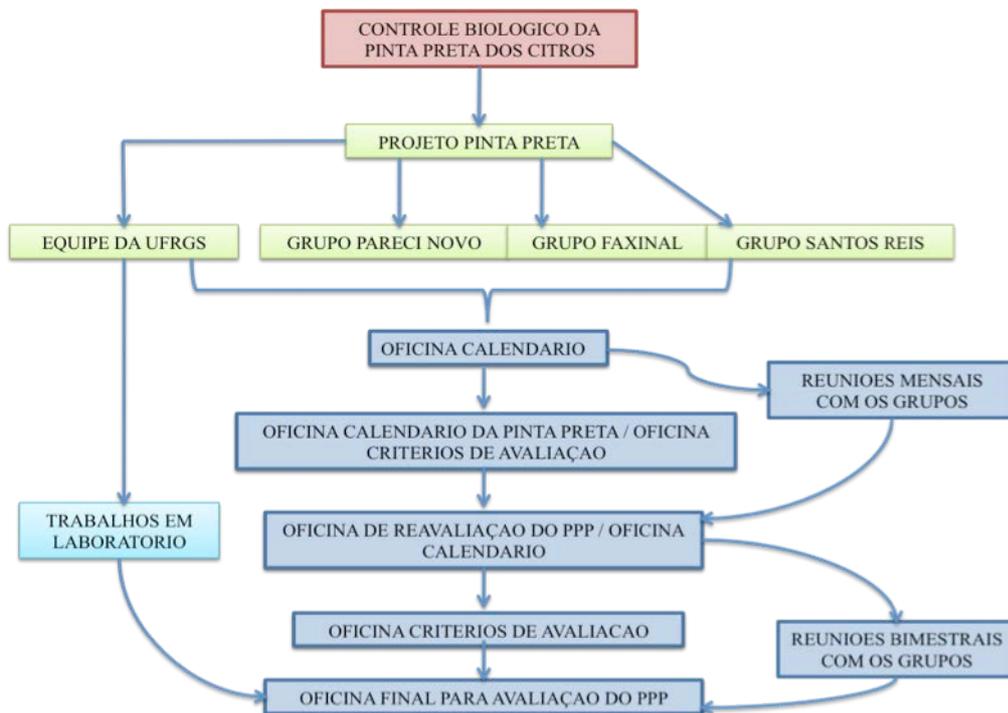


FIGURA 2. Esquema ilustrativo do processo durante o Projeto Pinta Preta.

Com o grupo de participantes melhor estruturado, surgiu a necessidade de planejar o ano de 2009, com atividades regulares e encontros semanais. Sendo assim, em novembro de 2008 foi realizada a primeira oficina com os três grupos de agricultores-pesquisadores e com a equipe da UFRGS. A oficina foi realizada na propriedade do agricultor João Kranz e teve como objetivo

determinar um plano de ação, incluindo decidir as práticas a serem testadas e construir um calendário de encontros para o primeiro semestre de 2009. Para alcançar tal objetivo, tentou-se planejar a atividade de construção do calendário de forma que ela fosse o mais participativa possível (Figuras 3 e 4), para assim o calendário refletir a disponibilidade dos agricultores, e as necessidades que uma pesquisa desse porte demanda. Buscou-se no conjunto de técnicas de metodologias participativas uma ferramenta que pudesse auxiliar-nos na construção de um calendário coletivamente.

O método de realizações de oficinas e reuniões sempre foi discutido pela equipe da UFRGS, uma vez que o “Como Fazer” era a questão central nesse projeto. Para a elaboração do calendário foi utilizado papel pardo, pincéis atômicos e tarjetas de várias cores e tamanhos. Determinou-se reuniões mensais com cada grupo separadamente e uma reunião mensal com os três grupos de agricultores-pesquisadores. Assim, cada segunda-feira do mês era dedicada a reunião com um grupo para discutir as percepções dos agricultores e para entregar as suspensões de *T. koningii* e a última segunda-feira do mês era dedicada para a reunião dos três grupos juntos, para a troca de informações entre eles.

A produção do calendário organizou a agenda dos participantes para os seis meses seguintes. O grupo pôde, então, programar suas atividades e começar a se apropriar das etapas do projeto de pesquisa. Somente quando entende-se a lógica das atividades e da pesquisa que se está inserido é que consegue-se opinar e participar dela. Planejar detalhadamente as atividades, as reuniões e os encontros foi fundamental para o desenrolar do projeto de pesquisa.

Na mesma oficina determinou-se os primeiros passos para o manejo da

pinta preta. Determinou-se que quatro agricultores (Luis Laux, João Kranz, Eduardo Schroder e Ademar Henz) iniciariam as aplicações do fungo *T. koningii* em dezembro de 2008, mesmo sabendo-se não ser uma época ideal para proteção dos frutos contra a infecção por *G. citricarpa*. Os outros agricultores-pesquisadores iniciariam as aplicações em Agosto de 2009. Essa decisão foi tomada para adaptação da metodologia, caso fosse necessário, outro ponto era a produção massal do fungo no laboratório, pois a equipe da UFRGS teria que se adaptar ao ritmo de produção massal, além de adaptar-se a infraestrutura oferecida pelo Departamento de Fitossanidade.

Cada agricultor deveria escolher três árvores do seu pomar, com a única condição de todas serem Tangerineiras cv. Montenegrina. Isso foi decidido devido aos relatos dos agricultores de que a pinta preta normalmente é mais severa em tangerineiras desta cultivar. Determinou-se, então, que o manejo de cada agricultor seria respeitado, assim como a escolha do dia e o horário da pulverização do antagonista.



FIGURAS 3 e 4. Oficina para elaboração do calendário de atividades para o primeiro semestre de 2009. Fonte: Pandolfo, J., Montenegro/RS, 2010.

Nos primeiros encontros com os grupos de pesquisa verificou-se haver a necessidade de um melhor entendimento das diferentes perspectivas sobre a doença e suas conseqüências. Buscamos, então, no Guia Prático de DRPs (Expósito, 2006) uma ferramenta que nos auxiliasse na construção de um

fluxograma com a percepção dos agricultores sobre o inóculo do fungo *G. citricarpa*, a distribuição e infecção deste no pomar, em diferentes épocas do ano. A ferramenta conhecida no Guia Prático como “ciclo de vida do peixe” era a que mais se adequava ao nosso objetivo, sendo assim, a adaptamos para atingir o objetivo proposto. A Oficina para elaboração do calendário do patógeno ocorreu em abril de 2009, na reunião mensal com todos os grupos e, para sua elaboração foi utilizado papel pardo, cola, targetas coloridas e pincéis atômicos. Na parte superior do papel foram coladas tarjetas com os meses do ano e na parte lateral do papel, tarjetas com o manejo utilizado. Os agricultores, então escreveram nas tarjetas a quantidade de pinta preta percebida no pomar em cada mês e fase de manejo (Figura 5). Em outro papel pardo foi elaborado o ciclo de vida do patógeno e onde o inóculo do patógeno está localizado no pomar durante o ano (figura 6).

A elaboração do calendário de vida do patógeno foi de extrema importância, tanto para os agricultores, quanto para a equipe da UFRGS. Durante a elaboração do calendário houve muita discussão devido a complexidade de fatores, principalmente climáticos, que podem interferir na expressão dos sintomas da pinta preta nos frutos e devido aos diferentes pontos de vista a respeito das épocas de manifestações dos sintomas. Depois de pronto, o calendário ilustrou com clareza, as épocas do ano que havia maior quantidade de inóculo, a época de infecção, e a época quando não era percebida a expressão de sintomas da doença, e quais os manejos que são utilizados em cada um desses períodos.

No segundo momento da reunião, deu-se o início da discussão do método de avaliação das árvores tratadas com o fungo *T. koningii*. A idéia era

que os agricultores-pesquisadores avaliassem o experimento e aprendessem a observar as suas árvores. Determinou-se, então, a construção de uma tabela de avaliação com alguns critérios fundamentais como: estado nutricional da planta; quantidade de folhas; quantidade e tamanho dos frutos; ocorrência de pinta preta; ocorrência de mancha de alternaria, gomose, cancro, antracnose, inseto minador, podridão causada por *Penicillium* sp. e broca.

A tabela de avaliação deveria ser utilizada da seguinte forma: mensalmente, após a pulverização com o *T. koningii*, os agricultores fariam a avaliação das três árvores tratadas e de três árvores escolhidas como testemunhas. Cada árvore foi dividida em “lado com sol” e “lado com sombra”, isso devido a relatos dos agricultores-pesquisadores de que os sintomas da pinta preta se manifestam menos quando as árvores são sombreadas. Para os critérios sobre o estado da árvore e ocorrência da pinta preta, os agricultores deveriam marcar uma numeração de 0 a 5, sendo 0 – ausente; 1-pouco; 3-médio e 5-muito. Para os outros critérios, deveria ser marcado um X para representar a presença da doença ou do inseto (Anexo 1). Além disso, os agricultores deveriam descrever o manejo realizado no pomar no mês em questão (Anexo 2).

Outra tabela foi elaborada para descrições de informações fixas, como idade, altura e posição solar de cada árvore do experimento, inclusive as testemunhas. O histórico do pomar também deveria ser descrito, quando as árvores foram plantadas, quando o manejo ecológico foi adotado, quantas vezes por ano são utilizadas as caldas sulfocálcica e bordaleza; quais as outras formas de manejo utilizadas (Anexo 3).

Ainda nesta reunião, levantou-se uma questão importante: se o *T. koningii* desenvolvia-se na presença de calda sulfocálcica, já que a calda era

aplicada com o mesmo pulverizador utilizado para pulverizar o antagonista. A partir dessa questão foi feito um experimento *in vitro* onde diferentes concentrações de calda sulfocálcica foram misturadas ao meio de cultura BDA e o *T. koningii* foi inoculado. O resultado mostrou que a calda sulfocálcica impedia o desenvolvimento do fungo. Decidiu-se então, que o melhor seria comprar pulverizadores para o uso exclusivo do fungo *T. koningii*.

Com a Tabela de avaliação pronta, outra oficina foi realizada no mês de maio de 2009 na propriedade do citricultor João Kranz. Essa oficina teve como objetivo avaliar a utilização da Tabela elaborada.

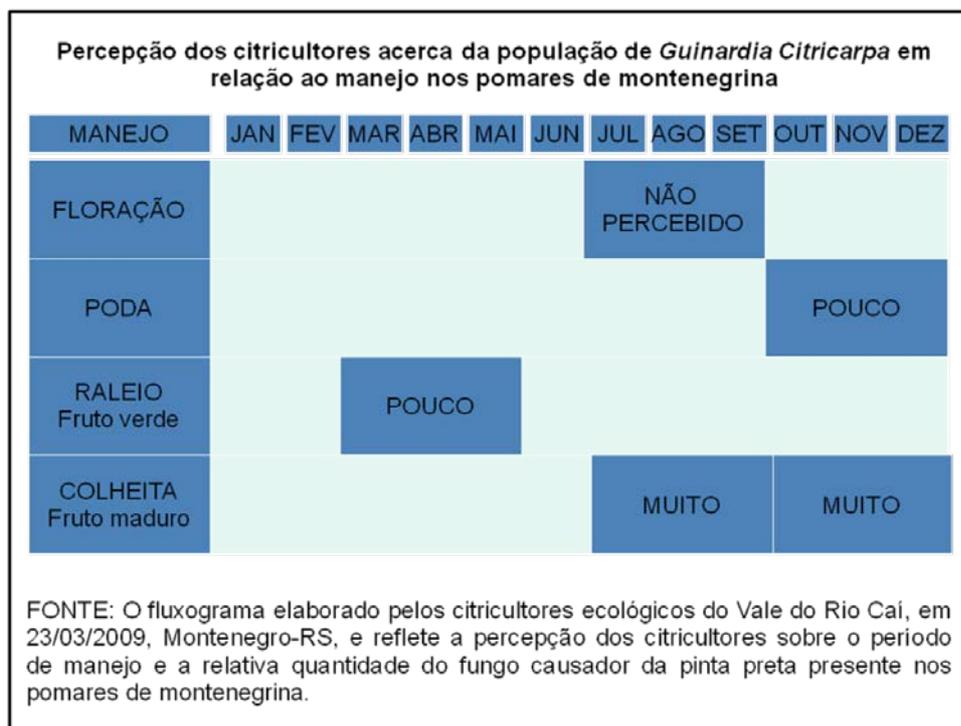


FIGURA 5. Fluxograma que reflete a percepção dos citricultores quanto ao ciclo de vida do fungo *G. citricarpa*.

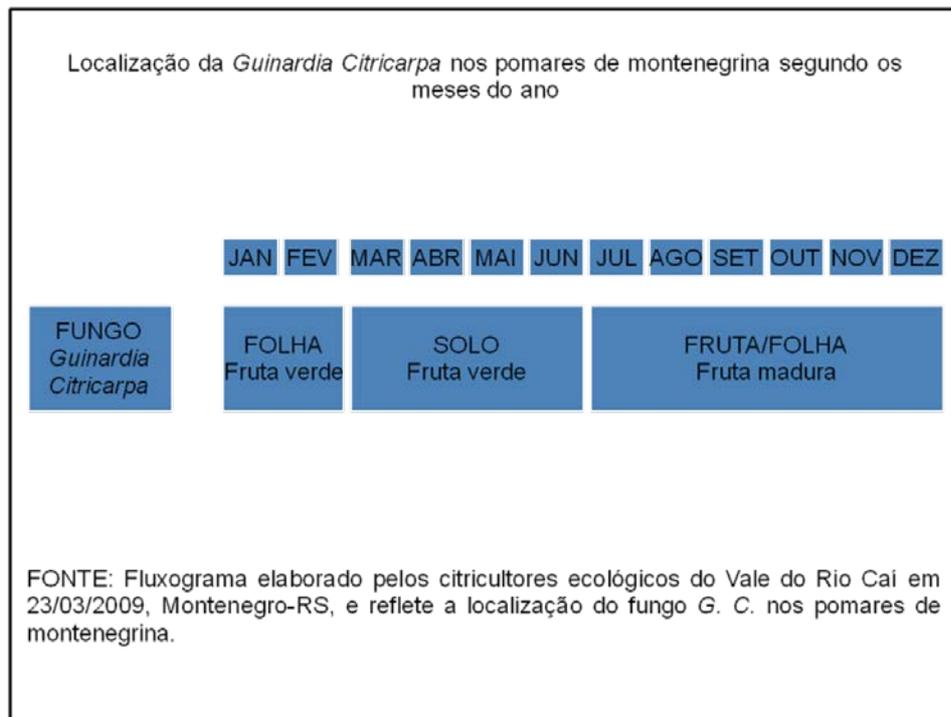


FIGURA 6. Fluxograma que reflete a percepção dos citricultores quanto ao ciclo de vida do fungo *G. citricarpa*.

Os três grupos de agricultores-pesquisadores e a equipe da UFRGS foram ao pomar e, com a tabela em mãos, fizeram a avaliação das três árvores tratadas e das três árvores testemunhas. Essa Oficina de Avaliação do experimento no pomar foi necessária para que os agricultores-pesquisadores tirassem suas dúvidas a respeito da forma de avaliação das árvores, discutissem os critérios selecionados e padronizassem a avaliação (Figuras 7 e 8). Representantes de todos os grupos estavam presentes e todos estavam muito interessados na proposta da Oficina. A construção, em conjunto, da tabela tornou o processo de avaliação mais interessante, pois foram critérios sugeridos pelos próprios agricultores, critérios que eles acham importante observar nas árvores dos seus pomares e problemas fitossanitários que os preocupam. Aprender a observar as unidades do pomar e identificar cada um desses critérios selecionados, contribuiu para a percepção geral da sanidade do pomar e escolha

do manejo adequado.



FIGURAS 7 e 8. Equipe da UFRGS e grupos de agricultores-pesquisadores discutindo os critérios de avaliação no pomar. Fonte: Pandolfo, J., Montenegro/RS, 2010.

Durante essa oficina, também discutimos a severidade da pinta preta visando à construção de uma escala de severidade da doença nos frutos. Os agricultores-pesquisadores determinaram três níveis de sintomas: com poucas manchas; com número médio de manchas; e com muitas manchas. Assim, a escala desenvolvida determinou o que foi visualizado pelos agricultores em termos de níveis de danos com correspondência aos prejuízos que percebiam pela desvalorização do produto no mercado. Diversos frutos foram fotografados e então elaborou-se uma escala de avaliação da severidade da pinta preta dos citros. Essa escala foi plastificada e distribuída para que os agricultores-pesquisadores avaliassem os frutos (Anexo 4).

Em agosto de 2009, após um semestre intenso de reuniões para discussões e tomadas de decisões, como a definição do método de avaliação pelos agricultores, foi realizada uma Oficina de Reavaliação do projeto e elaboração de um novo calendário de atividades para o segundo semestre de 2009 e início de 2010, na propriedade do agricultor Luis Laux. Para a reavaliação do projeto era necessário uma ferramenta que apontasse os pontos positivos e pontos a melhorar do grupo de pesquisa. No Guia Prático de DRPs

(Expósito, 2006), o Diagrama de Venn foi o que mais se aproximou do tipo de ferramenta que procurávamos. O Diagrama de Venn identifica os grupos organizados da comunidade e as relações que estes têm entre si e com outras instituições locais e regionais fora da comunidade. O objetivo dessa ferramenta é colocar em evidência as relações que se estabelecem entre os membros da comunidade e as instituições para reconhecer a importância destes fatores nos processos de decisão e desenvolvimento comunitário (Expósito, 2006). Essa ferramenta foi adaptada para estabelecermos as relações dentro do grupo e foi executada da seguinte maneira: um círculo colorido identificado como “Nosso Grupo” (representando todos os grupos participantes do projeto) foi colado no centro de um papel pardo. Todos os grupos receberam tarjetas coloridas e canetas, as tarjetas com os pontos positivos foram coladas próximas ao círculo e as tarjetas com os pontos a melhorar foram coladas distantes do círculo, quanto mais distante, maior a necessidade de trabalho naquele ponto.

A elaboração dessa ferramenta influenciou diretamente na construção do calendário de atividades, pois um dos pontos a melhorar relatados pelos agricultores foi a quantidade de reuniões no primeiro semestre de 2009.



FIGURAS 9 e 10. Elaboração da ferramenta de avaliação pela equipe da UFRGS e pelos grupos dos agricultores. Fonte: Pandolfo, J., Montenegro/RS, 2010.

Segundo os agricultores, não havia necessidade de tantas reuniões e que muitas vezes, as mesmas atrapalhavam o andamento dos trabalhos nos pomares.

Houve unanimidade pela continuação e aperfeiçoamento dos trabalhos, ao mesmo tempo que se verificou haver uma crescente intimidade dos agricultores-pesquisadores nos procedimentos de pesquisa, inclusive pela indicação que já estariam encaminhando alguns novos experimentos sobre diferentes métodos de manejo dos pomares por conta própria. Este resultado é considerado um subproduto dos métodos participativos de pesquisa, pois à medida que os agricultores se envolvem com processos de geração de novidades de forma mais organizada, passam a aplicar o mesmo método em outras técnicas que gostariam de testar, e passam a comparar resultados com seus vizinhos e conhecidos.

A construção do calendário (Figura 11) para o segundo semestre de 2009 e início de 2010, foi feita após a elaboração do Diagrama de Venn adaptado. As reuniões mensais passaram a ser bimentrais e com todos os grupos reunidos. Também foi agendada as reuniões do Grupo de Citricultura Ecológica e um seminário de discussões dos resultados das pesquisas realizadas na Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

A partir do mês de Agosto de 2009, todos os agricultores-pesquisadores passaram a pulverizar o fungo *T. koningii* em três tangerineiras cv. Montenegrina em seus pomares. Nesse ponto do projeto de pesquisa, a equipe da UFRGS já estava melhor familiarizada com o processo de produção massal do fungo e já tinha o conhecimento da infraestrutura disponível para essa produção dentro do Departamento de Fitossanidade. Até o final de 2009 e ao longo de todo o primeiro semestre de 2010, foi mantido o novo calendário de encontros a cada dois meses, e os agricultores mantiveram suas aplicações mensais de suspensão de *T. koningii*. Também decidiu-se que, por não haver uma identificação consistente de novos microrganismos isolados em

laboratório, que os trabalhos de campo iriam continuar apenas com o isolado de *T. koningii*. Mesmo com as reuniões bimestrais, a equipe da UFRGS entregava a suspensão de *T. koningii* mensalmente para os agricultores.



FIGURA 11. Construção do calendário de atividades para o segundo semestre de 2009 e início de 2010. Fonte: Pandolfo, J., Montenegro/RS, 2010.

No início de 2010, os agricultores-pesquisadores sentiram a necessidade de outra Oficina de Avaliação das árvores do experimento. Foi marcada, então, uma oficina no dia 17 de maio de 2010 na propriedade dos irmãos Maique e Darwin. Os agricultores estavam com dúvidas, principalmente, quanto aos itens que diziam respeito ao estado nutricional da planta. Após uma breve reunião (Figura 12), nos dirigimos ao pomar e os agricultores sugeriram duas formas de avaliação. Na primeira, cada item da tabela foi discutido coletivamente. Cada agricultor dava a nota que achava apropriada para determinada planta e os demais concordavam ou não. As diferentes interpretações foram amplamente discutidas, detalhando todos os aspectos a serem considerados. Em seguida, após intensa discussão sobre os critérios, uma árvore foi escolhida e os agricultores fizeram a avaliação individualmente, em seguida, compararam seus resultados (Figura 13). O objetivo era verificar se a compatibilização realizada

na técnica anterior havia sido bem sucedida, ou seja, se as “notas” estariam próximas.



FIGURAS 12 e 13. Reunião dos grupos participantes do projeto de pesquisa. Oficina de avaliação no pomar do M ai que. Fonte: Pandolfo, J., Montenegro/RS, 2010.

No dia 22 de novembro realizou-se a Oficina de Fechamento do projeto de pesquisa na propriedade do agricultor Jean Steffen. Estavam presentes a equipe da UFRGS, representantes dos três grupos de agricultores-pesquisadores e representantes da EMATER de Montenegro e dos municípios de Maratá, Harmonia e Estrela (Figura 14). Três ferramentas metodológicas foram escolhidas para essa Oficina. No primeiro momento, foi utilizada uma ferramenta para que os agricultores-pesquisadores dividissem com os grupos as suas percepções do projeto de pesquisa. Para isso foi montado um painel com três questões. A primeira questão era a respeito das aplicações do fungo *T. koningii* nos pomares. O objetivo dessa questão era que os agricultores compartilhassem, com o grande grupo, como fizeram as aplicações do agente de controle biológico, se teve uma regularidade ou não, se perceberam alterações em suas árvores e nos frutos, etc. A segunda questão era a respeito do método utilizado no projeto de pesquisa, o objetivo era sintetizar o que acharam de participar do projeto, se mudariam algo, se participariam de pesquisas nesse formato novamente. A terceira questão falava sobre as lições aprendidas durante

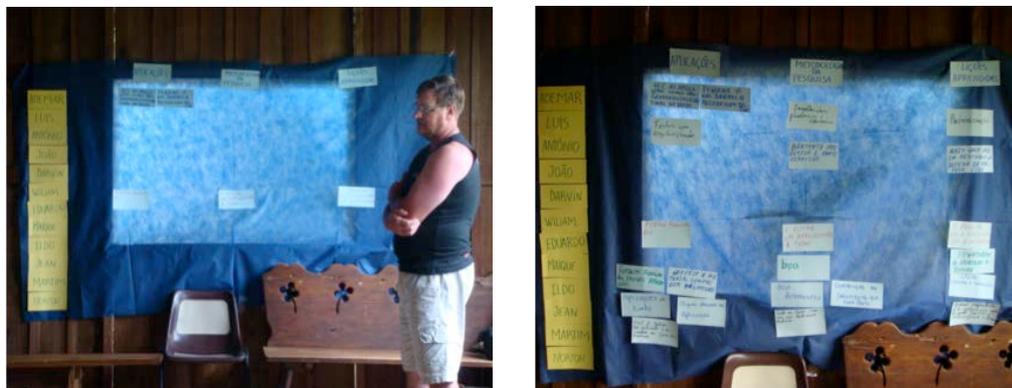
o processo; o que um projeto de pesquisa com métodos participativos trouxe de útil para o cotidiano; o que aprenderam. Assim, cada agricultor recebeu tarjetas coloridas e caneta, onde escreveram palavras-chave a respeito de suas percepções e colaram no quadro enquanto davam um breve relato sobre a experiência (Figuras 14 e 15). Além dos agricultores-pesquisadores, também deram seus relatos o Engenheiro Agrônomo da Ecocitrus e o Técnico da EMATER de Montenegro.

Com base nos relatos feitos, pode-se perceber que os agricultores tentaram manter uma certa regularidade nas aplicações do *T. koningii*, mas muitos confessaram que esqueceram de aplicar em algum mês, pelo menos. A maioria procurou fazer as aplicações no final da tarde quando a temperatura está mais baixa. O agricultor Luis Laux relatou que misturava à suspensão de *T. koningii* a goma do Cactus *Opuntia* sp. que é utilizado como espalhante adesivo em outras caldas. O Agricultor Ademar Henz aplicou a sobra da calda em uma árvore de tangerina cv. Pareci e notou que esta melhorou seu aspecto nutricional. De modo geral, os agricultores não perceberam diferenças entre as árvores pulverizadas com o *T. koningii* e as árvores testemunhas.

Quanto a metodologia utilizada no projeto, os agricultores relataram que foi muito importante ter um calendário de encontros e o cumprimento dessa agenda. Todas as reuniões realizadas foram importantes para troca de informações entre a equipe da UFRGS e os grupos. As conversas durante as reuniões possibilitavam a discussão das dúvidas e as possibilidades para resolvê-las, além disso, todos os participantes tomavam conhecimento a respeito dos pomares dos seus vizinhos, além dos diferentes pontos de vista a respeito do projeto de pesquisa e das demandas geradas.

Quanto as lições aprendidas, um dos principais pontos relatados pelos agricultores foi a observação do pomar. Os agricultores, no papel de pesquisadores, começaram a observar melhor cada unidade do seu pomar: observaram quais árvores apresentavam melhor e pior estado nutricional, qual região do pomar apresentava maior incidência ou severidade da pinta preta dos citros, quais outras moléstias estavam presentes em seus pomares, etc. Essa melhor observação acarreta na escolha do manejo mais adequado, fazendo com que o pomar restabeleça seu equilíbrio e, conseqüentemente, sua sanidade.

O segundo momento da reunião foi dedicado a apresentação dos resultados da avaliação feita pela equipe da UFRGS quanto à eficiência do isolado de *T. koningii*. Para essa apresentação, duas árvores foram desenhadas em um papel pardo, uma representando as árvores tratadas e a outra representando as árvores testemunhas.



FIGURAS 14 e 15. Ferramenta de avaliação do Projeto Pinta Preta. Percepções dos agricultores-pesquisadores. Fonte: Pandolfo, J., Montenegro/RS, 2010.

Nesses desenhos foram colocadas as porcentagem de incidência e severidade encontrado em cada tratamento nas três propriedades avaliadas (Figura 17). Em um outro painel, foi ilustrado dois gráficos com o mesmo resultado, esses gráficos possibilitaram a melhor visualização dos resultados

obtidos (Figura 18). Essa avaliação mais rigorosa do experimento realizado nos pomares, é necessária para validação da pesquisa. Os resultados apresentados eram muito esperados pelos agricultores, que queriam saber se o antagonista aplicado durante um ano e meio por alguns, controlava ou não a pinta preta dos citros. Os resultados mostraram que houve diferença significativa entre os tratamentos e as testemunhas. Os agricultores relataram que o ano de 2010 foi de pouca severidade de pinta preta.

O terceiro momento da reunião foi dedicado a definição dos próximos passos do grupo de pesquisa. A ferramenta escolhida foi a matriz F.O.F.A. Essa ferramenta é um cruzamento de cenários para definir os objetivos estratégicos do grupo, com menor chance de falha.



FIGURAS 16 e 17. Painéis elaborados para ilustrar os resultados da avaliação realizada pela equipe da UFRGS. Fonte: Pandolfo, J., Montenegro/RS, 2010.

Os cenários são reflexões sistemáticas que definem futuros possíveis, sendo separados da seguinte forma: **internos** (situações influenciáveis pelo grupo): *fraquezas* - inconformidades, pontos que devem ser melhorados; *forças* - elementos considerados vantajosos; **externos** (situações não influenciáveis pelo grupo): *oportunidades* e *ameaças*. O nome da matriz é F.O.F.A. devido ao

cruzamento feito baseado nas Forças, Oportunidades, Fraquezas e Ameaças com as quais o grupo terá que lidar (Expósito, 2006) (Figura 19 e 20).

Os agricultores relataram como *forças*: a aplicação prática da tecnologia gerada; a organização dos grupos envolvidos; participação dos diversos atores envolvidos; aprendizagem; consciência ambiental; produção orgânica; baixo custo do projeto; continuidade do grupo. Quanto as *fraquezas* os agricultores citaram a dificuldade do isolado *T. koningii* de espalhar pelo pomar, devido a essa característica os agricultores teriam que aplicar o isolado em todas as árvores do pomar; dificuldades de participação nas reuniões devido a demanda de trabalho; outras demandas não atendidas; descontinuidade do trabalho; manutenção do fungo antagonista obtido na propriedade. Quanto as *oportunidades*, os agricultores citaram o envolvimento das instituições parceiras; trabalhos em estações experimentais; trabalho em conjunto (EMBRAPA, UCS, Prefeituras, etc.); biofábrica; recursos para pesquisa; aumentar a autonomia dos agricultores; utilização de métodos participativos em outras demandas; divulgação do trabalho a partir da sistematização da experiência; maior articulação de conhecimentos universidade/agricultor; preservação ambiental na gestão das propriedades; crescimento da demanda/mercado de orgânicos – aumento da oferta; realização de uma reunião geral dos citricultores ecológicos para troca de experiências. Como ameaças, foram consideradas a falta de financiamento para futuros projetos; dificuldades de obter investimentos; pensamento cartesiano na pesquisa e na agricultura.

A aplicação de três ferramentas metodológicas com diferentes objetivos na mesma tarde prejudicou o andamento da última. A idéia inicial da aplicação da ferramenta era dividir os agricultores-pesquisadores nos seus grupos de

origem, e com a utilização de tarjetas com palavras-chaves, cada grupo elaboraria a sua matriz, para depois discutirmos e montarmos uma matriz final. Porém, no final da tarde, todos já estavam cansados e a ferramenta acabou sendo improvisada. Apenas uma matriz foi construída com o grande grupo e, ao invés de tarjetas, as idéias foram sendo escritas direto no papel pardo pelo mediador da ferramenta. O resultado foi um painel dividido em quadrantes com muitas idéias escritas e nenhum encaminhamento. Essa ferramenta foi pensada e aplicada por mediadores externos. Talvez, o fato dos agricultores não conhecerem os mediadores da ferramenta, tenha atrapalhado a participação nesse momento.



FIGURAS 18 e 19. Participantes do Projeto Pinta Preta executando ferramenta F.O.F.A. Painel gerado no final da ferramenta. Fonte: Pandolfo, J., Montenegro/RS, 2010.

6.5 Resultados e Discussão

Durante todo o processo, a pesquisa foi discutida com os agricultores-pesquisadores nas reuniões, primeiro mensais e depois bimestrais. A maioria dos experimentos realizados no laboratório foram executados com o objetivo de sanar dúvidas dos agricultores. Uma das questões levantadas era se o *T. koningii* desenvolvia-se na presença de

calda sulfocálcica, já que ambos eram aplicados com o mesmo pulverizador. A partir dessa questão foi feito um experimento *in vitro* onde diferentes concentrações de calda sulfocálcica foram misturadas ao meio de cultura BDA onde o *T. Koningii* fora inoculado. O resultado mostrou que a calda sulfocálcica impedia o desenvolvimento do fungo. Decidiu-se então comprar pulverizadores para o uso exclusivo para aplicação da suspensão de *T. koningii*.

Outra dúvida levantada pelos agricultores-pesquisadores foi se o *T. koningii* realmente estava se desenvolvendo na parte aérea das árvores tratadas. Para resolver essa questão, a equipe da UFRGS passou a fazer coletas bimestrais, a partir de janeiro de 2010, de folhas das árvores tratadas e das árvores testemunhas. As folhas eram cortadas em pequenos fragmentos e colocadas em placas de Petri contendo meio de cultura BDA suplementado com o antibiótico estreptomicina. Após 3 dias de incubação das placas, era possível identificar quais fragmentos apresentavam o desenvolvimento de *T. koningii*. Todos os fragmentos de folhas das árvores tratadas apresentaram, em todos os experimentos para recuperação, o desenvolvimento do fungo antagonista. Por outro lado, não houve desenvolvimento de *T. koningii* nas folhas amostradas das árvores testemunhas, respondendo a uma dúvida dos agricultores-pesquisadores se o isolado que estava sendo pulverizado por eles mensalmente, estaria se desenvolvendo na copa das árvores. Porém, informou também, que o isolado de *T. koningii* aplicado não se

espalhava no pomar sem ser diretamente pulverizado como eles gostariam, sendo necessária a aplicação total do pomar. Ficaram, no entanto, dúvidas sobre se a aplicação total no pomar, em algumas épocas, poderia garantir uma população de *T. koningii* suficiente para reduzir os processos de infecção pelo patógeno na própria planta e entre plantas (respectivamente, autoinfecção e aloinfecção).

Um dos objetivos da pesquisa era selecionar microrganismos nativos, nos pomares ecológicos de tangerineiras cv. Montenegrina, e avaliar seu potencial antagônico ao fungo *G. citricarpa*. Para isso, folhas e frutos de tangerineiras cv. montenegrina eram amostrados mensalmente e, a partir deles, eram isolados microrganismos endofíticos e epifíticos. Esses microrganismos foram então confrontados *in vitro* com o fungo *G. citricarpa*. Quatro microrganismos apresentaram grande potencial antagônico ao fitopatógeno, um deles identificado como um isolado do gênero *Trichoderma*. Em função da reconhecida eficiência de fungos do gênero *Trichoderma* no biocontrole de fitopatógenos, e ausência de patogenicidade, optou-se por testar-se apenas as leveduras denominadas 32, 54 e a bactéria denominada 43 quanto a patogenicidade a citros. Para isso, foram realizados testes de hipersensibilidade em mudas de fumo e testes em casa de vegetação com mudas de laranjeiras cv. Valência. Os resultados indicaram que os microrganismos não são fitopatogênicos aos citros e podem ser testados em pomares para a verificação do seu potencial antagônico à pinta preta. As leveduras 32, 54 e a bactéria 43 estão em processo de identificação.

Também foram realizados testes pós-colheita com 26 microrganismos, sendo 19 bactérias, 06 leveduras e o isolado do fungo *T. koningii* que foi

aplicado pelos agricultores. Após sete semanas em câmara de crescimento os frutos inoculados com o isolado 32 e o fungo *T. koningii* apresentaram menor incidência de podridões, com apenas um dos cinco frutos inviáveis para comercialização. Foi realizado, então, um segundo teste pós-colheita com a levedura 32 e o *T. koningii* testando duas temperaturas: temperatura ambiente e câmara fria. Após 15 dias em temperatura ambiente e 3 semanas em câmara fria, os tratamentos não apresentaram diferenças significativas. Esses resultados apresentam 3 microrganismos que podem ser utilizados pelos agricultores no controle biológico da pinta preta, em conjunto com o *T. koningii*. Além disso, a levedura 32 e o *T. koningii* também podem ser usados no controle de podridões pós-colheita.

Uma preocupação durante toda pesquisa foi a de testar diferentes substratos para o cultivo massal do fungo *T. koningii*, isso porque, para que agricultores possam apropriar-se da tecnologia de controle biológico da pinta preta dos citros é necessário que a produção massal do *T. koningii* seja feita em um substrato de fácil acesso, baixo custo e alta eficiência. Para isso foram testados sete substratos: composto de resíduos de agroindústrias (Ecocitrus), composto biodinâmico, cactus *Opuntia* sp., suco de laranja, bagaço de laranja, bagaço de cana de açúcar, batata doce e arroz “quirera”. Todos os substratos testados foram sugeridos e fornecidos pelos agricultores-pesquisadores. Para a inoculação do *T. koningii*, foram feitos meios de cultura sólidos e líquidos. O antagonista desenvolveu-se em todos os substratos testados. Os compostos se mostraram excelentes meios de cultivo para o isolado, porém esse resultado requer outros tipos de experimentos para testar sua eficiência, já que o produto final do agente de biocontrole foi elaborado em forma de calda para ser aplicada

na copa das árvores e os compostos são aplicados no solo. O meio de cultura utilizando suco de laranja e o meio utilizando batata doce são os mais promissores, pois além de apresentarem um baixo custo para os agricultores, foram eficientes para o cultivo do *T. koningii*.

Para avaliar a eficiência do *T. koningii* no controle da pinta preta dos citros, os agricultores-pesquisadores avaliaram os frutos durante o período de maturação até a colheita e, segundo a maioria dos relatos, não perceberam maiores diferenças entre os frutos das árvores que estavam recebendo as pulverizações do antagonista e os frutos das árvores testemunhas. Entretanto, consideraram, ao mesmo tempo, que o ano em que o experimento foi realizado caracterizou-se por uma baixa incidência de pinta preta nos seus pomares. Essa capacidade de comparar o ano em curso com os anos anteriores dependeu da experiência dos agricultores que, de maneira geral, observam de forma mais completa os problemas que ocorrem nos seus pomares, e em especial, costumam fazer comparações entre as safras de cada ano, ao menos nos anos imediatamente anteriores ao presente. Em alguns casos, os agricultores lembraram que mantiveram o tratamento que normalmente aplicam em seus pomares nas árvores testemunhas, incluindo a aplicação de calda sulfocálcica, que muitos utilizam como repelente para a mosca-das-frutas (*A. fraterculus*), e outros para controle de algumas doenças. Assim, concluíram que a aplicação de *T. koningii* seria, ao menos, igualmente eficiente no controle da pinta preta. Um agricultor verificou que havia uma diferença considerável entre as árvores que receberam e as que não receberam *T. koningii*, sendo que não havia aplicado qualquer calda nas árvores testemunhas, e que a comparação era favorável à aplicação de *T. koningii*, reduzindo a ocorrência de sintomas do fitopatógeno

nos frutos, visualizando isso muito bem, pois as árvores testemunhas eram sempre ao lado das árvores tratadas.

A avaliação feita pela equipe da UFRGS, no entanto, foi mais quantitativa, e analisou a incidência e severidade de 40 frutos por árvore, e por tratamento em três pomares (um pomar por grupo de agricultores-pesquisadores). As análises mostraram que houve uma diferença, embora pequena, e que o *T. koningii* reduziu tanto a incidência quanto a severidade da pinta preta nos frutos. Possivelmente em um ano com condições climáticas mais favoráveis à doença, essa diferença seria mais evidente. Por outro lado, a redução alcançada não seria suficiente para que se considerasse *T. koningii* um controlador eficaz por si só, indicando que no manejo ecológico da pinta preta dos citros seria necessário que diversos métodos fossem aplicados. Foram sugeridos, pelos agricultores, na oficina de avaliação do projeto, que outros processos fossem implementados. Sugeriu-se, inclusive, novas pesquisas, também de forma participativa, com o emprego de antagonistas, incluindo o *T. koningii* testado, e os novos antagonistas isolados, em aplicações sobre folhas caídas de citros ao longo dos períodos em que ocorreria a disseminação de esporos sexuais de *G. citricarpa*, bem como na aplicação dos antagonistas na preparação e/ou aplicação de biofertilizantes, procedimento usado de forma regular por muitos citricultores ecológicos.

Um importante resultado foi a intenção, ou mais propriamente dito, a convicção dos agricultores-pesquisadores, de que era necessário dar sequência aos trabalhos. Em muitas das reuniões do Grupo de Citricultura Ecológica, havia uma certa cobrança dos agricultores para resultados imediatos das pesquisas sendo realizadas, e mesmo um certo desconforto quando os resultados

aparentemente não possuíam uma aplicação prática definitiva. No caso do projeto de pesquisa da pinta preta, a participação mostrou a necessidade de uma sequência de trabalhos de pesquisa, pois em ciência, os resultados em geral levam a mais perguntas, e a mais necessidade de investigação. A avaliação positiva do ciclo fechado e, da necessidade de continuidade, com presença de todos os que já faziam parte dos grupos, surpreendeu e demonstrou que os agricultores não apenas podem participar, mas que também podem retomar às suas práticas de busca de alternativas e soluções para seus problemas, contribuindo efetivamente no desenvolvimento de tecnologias apropriadas, e em especial, de soluções para uma agricultura de base ecológica.

6.6 Conclusões

Tem sido cada vez mais presente o desenvolvimento de estilos de agricultura menos agressivos ao ambiente, capazes de proteger os recursos naturais e que sejam sustentáveis, fugindo do estilo convencional de agricultura (Caporal & Costabeber, 2004). Assim, surge a necessidade de projetos de desenvolvimento agrícola com base ecológica, que sejam elaborados e testados através de metodologias participativas envolvendo entidades de pesquisa, extensionistas e agricultores (Silva, 2005).

O processo de construção de uma agricultura sustentável, não se resume à substituição de insumos, ele deve passar, necessariamente, pelo fortalecimento da agricultura de base familiar, por modificações na estrutura fundiária do país, por políticas públicas consistentes e coerentes com a emancipação de milhões de brasileiros da miséria e pela revisão de pressupostos epistemológicos e metodológicos que guiam ações de pesquisa e desenvolvimento (Moreira &

Carmo, 2004). Para se alcançar a sustentabilidade, as transformações não devem apenas ocorrer quanto ao conjunto tecnológico adotado para esta ou aquela produção. Mas devem considerar a democratização do uso da terra, a erradicação da fome e da miséria e a promoção de melhoria da vida de toda a humanidade (Ehlers, 1994).

O conceito de desenvolvimento rural sustentável baseia-se no descobrimento, sistematização, análise e fortalecimento dos elementos de resistência específica de cada identidade local ao processo modernizador agrário, fortalecendo as formas de ação social coletiva que possuam um potencial endógeno transformador. Portanto, não se trata de levar soluções prontas para a localidade, mas de se detectar as que ali existem (a exemplo de manejo ecológico dos recursos naturais) e de “acompanhar os processos de transformação” numa dinâmica participativa (Casado *et al.*, 2000)

Conforme Fukuda (2004), para que os projetos de desenvolvimento com base agroecológica tenham êxito, as tecnologias devem ser desenvolvidas pelos próprios agricultores, dentro de suas propriedades, através de medidas participativas, com o suporte de agências de pesquisa e o aporte de recursos financeiros.

Um ponto fundamental apontado por Altieri (2002) é que as tecnologias geradas a partir da pesquisa agroecológica não podem ser transferidas de um local para outro. Essas tecnologias são geradas a partir de interações ecológicas de determinados locais ou regiões e podem não produzir os mesmos resultados em regiões diferentes, residindo aí, a questão de elaboração de projetos participativos de pesquisa baseados no conhecimento local.

Constitui-se numa ferramenta fundamental da estratégia agroecológica de desenvolvimento rural sustentável a construção participativa de tecnologias agrárias, o que permite “...*fortalecer a capacidade local de experimentação e inovação dos agricultores com os recursos naturais específicos de seus agroecossistemas*” (Casado *et al.*, 2000).

As metodologias participativas de pesquisa, conduzidas em conjunto por agricultores, pesquisadores e extensionistas, têm demonstrado grande potencial para apreender a complexidade inerente a esses sistemas. Isso porque integram conhecimentos das famílias e comunidades nas dinâmicas de inovação agroecológica, permitindo que as influências sociais, ecológicas e culturais sobre as práticas de manejo também sejam consideradas (Dal Soglio *et al.*, 2006).

Em seu projeto de pesquisa, Nelson *et al.* (2001) tiveram como objetivo levar o agricultor a té o conhecimento, através de métodos participativos, visando o manejo da brusone do arroz no Vietnã e o manejo da requeima da batata no Peru. No Vietnã Central devido ao prévio conhecimento dos agricultores a respeito das influências ambientais no desenvolvimento da doença, foram utilizados exercícios de simulação manual para mostrar o espalhamento da doença e jogos de cartas para entendimento da relação resistência-virulência. Esses exercícios tiveram o papel de estimular os agricultores a darem um uso prático aos seus conhecimentos e desenvolverem estratégias de manejo. Como resultados, os agricultores se mostraram excelentes investigadores e tomadores de decisões além de observarem que seus cultivos ficaram mais saudáveis. No Peru, os agricultores possuíam pouca ou nenhuma percepção sobre o processo da requeima da batata. Sendo assim,

experimentos, como a utilização de mini-microscópios e câmaras úmidas para auxiliar na visualização concreta do agente causal da doença, foram realizados com objetivo de criar essa percepção. Uma vez estabelecido esse conhecimento, foram testadas variedades de batatas com diferentes níveis de resistência à requeima. A participação na pesquisa, permitiu aos agricultores aprenderem sobre o processo de desenvolvimento da doença, o que fez com que eles começassem a tomar melhores decisões de manejo de seus cultivos.

Pande *et al.* (2005), utilizaram métodos participativos para desenvolver e validar o manejo integrado para mofo cinzento em grão-de-bico causado por *Botrytis* sp., além de identificar outros problemas bióticos e abióticos na produção de grão-de-bico, integrar as suas opções de manejo com as do mofo cinzento e ampliar a produção de grão-de-bico em parceria com os agricultores. Para atingir tal objetivo, escolas de orientação foram conduzidas durante a estação de cultivo. Nesses encontros, os agricultores dividiam suas percepções sobre os problemas na produção e as opções de manejo foram explicadas. Ao final de três anos, 883 agricultores haviam participado da pesquisa. Os resultados gerados foram: o aumento de consumo de proteína em 40%; aumento de 22% das casas feitas com tijolos; aumento de 20% nos trabalhos na agricultura e empregos não agrícolas; aumento de 45% nas despesas familiares; pecuária aumentou 30%.

A fitopatologia clássica utiliza métodos de pesquisa tradicionais nos quais o pesquisador é o detentor do conhecimento e o transfere para o agricultor. Porém, a colaboração entre agricultores e pesquisadores de forma participativa gera um conjunto de resultados substanciais, como abordagens inovadoras para resoluções de problemas e outros tipos de capital intelectual.

Para os agricultores a colaboração com o setor de investigação formal oferece oportunidades para educação contínua sobre manejo da cultura, bem como acesso rápido a novas tecnologias. O envolvimento dos agricultores na pesquisa aumenta a chance de desenvolvimento de uma tecnologia apropriada, além de oferecer ao pesquisador um mecanismo para garantir que seu trabalho é relevante a necessidade e condições dos agricultores (Nelson *et al.*, 2001).

O processo participativo, deve proporcionar a oportunidade de auto-avaliação de si e da cultura do grupo a que pertence, capacidade reflexiva sobre os efeitos de vida cotidianos, capacidade de criar e recriar não somente objetivos materiais, mas, também criar e recriar formas novas de vida e convivência social. As técnicas de planejamento participativo devem valorizar o processo de obtenção de informações. É importante que este processo seja, ele mesmo, um fator de formação e discussão política no seio da comunidade. Os dados devem ser utilizados, principalmente, pela própria comunidade. Dentro deste contexto descrito por Souza (2009), pode-se afirmar que o planejamento participativo delineado no Projeto Pinta Preta, atingiu seus objetivos.

6.7 Considerações sobre a pesquisa participativa em Fitopatologia

6.7.1 Um breve relato da experiência

Na Fitopatologia, o método clássico de pesquisa utilizado resulta, na maioria das vezes, na geração de um conhecimento acadêmico que, muitas vezes, se encerra na produção de dissertações e teses que são depositadas na estantes das bibliotecas, com limitada aplicação direta, prática. Esta produção acadêmica pode, eventualmente, servir de referência teórica para processos de transferência de tecnologia, na forma de pacotes tecnológicos que são

desenvolvidos sem muita consideração às condições do sistema onde os resultados das pesquisas foram obtidos.

Quando iniciei o doutorado no Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, na Faculdade de Agronomia da UFRGS, minha idéia para o projeto de pesquisa era, justamente, fazer o contrário da maioria das pesquisas realizadas nessa área. Queria que meu trabalho tivesse uma aplicação prática efetiva, porém, não sabia como fazê-lo.

No primeiro ano de doutorado cursei a disciplina de Epistemologia da Ciência, indicada pelo meu orientador. Confesso, que no início, não enxerguei o propósito prático desta disciplina no meu projeto de pesquisa. Achava as aulas extremamente cansativas, e sentia grande dificuldade em entender os textos filosóficos, pois buscava racionalizar todas as expressões metafóricas. Quando o professor pediu, como trabalho final da disciplina, para escrevermos nossos projetos de pesquisa sob o paradigma sistêmico, tive convicção que aquela era a tarefa mais difícil que já havia realizado em toda minha caminhada acadêmica.

Hoje, percebo a importância de adicionarmos novas estruturas ao paradigma cartesiano sob o qual as instituições de ensino e pesquisa são sustentadas. Tanto a Biologia, onde obtive minha graduação, quanto a Agronomia, onde realizei estudos de pós-graduação, formam profissionais com uma visão fragmentada do todo. No entanto, atualmente é preciso considerar que as partes não refletem o todo. A consequência disso reflete-se na dificuldade que os profissionais formados têm de trocar conhecimentos, de incluir outros pontos de vista em seus trabalhos, e de aceitar o conhecimento empírico, muitas vezes chamado de “lugar comum”, como válido.

Durante os primeiros dois anos de doutorado, fui muito resistente em sair do laboratório, não entendia o porque de tantas reuniões e Oficinas com os agricultores participantes do projeto. Assumi a posição de coordenar as atividades do projeto de dentro do laboratório e pensava que minha presença nesses encontros não era, realmente, importante, afinal, haviam outras pessoas mais aptas à parte social do trabalho. Minha tarefa era realizar experimentos para responder às dúvidas relacionadas aos microrganismos, isolar outros microrganismos com potencial antagônico para utilização no controle biológico, produzir o agente de biocontrole que estávamos utilizando e me certificar de que os agricultores iriam receber esses resultados. Pensava que, assim, estava fazendo a minha parte, o que era suficiente para o fim prático que eu gostaria de alcançar.

Em março de 2009 foi realizada uma Oficina de Metodologias Participativas, como uma das demandas do grupo de estudantes participantes do Projeto Pinta Preta. Na época, falávamos muito em métodos participativos, porém, com exceção do coordenador do projeto, nenhum componente do grupo tinha um real conhecimento a respeito do conceito e das ferramentas utilizadas em uma pesquisa participativa. A Oficina teve carga horária de 12 horas. Estive presente durante 4 horas e contra minha vontade. Meu pensamento era que aquilo não me dizia respeito, já que meus limites eram as atividades de laboratório.

Somente em setembro de 2009, comecei a ter outra visão do trabalho que estava realizando e da importância da minha participação nas reuniões e oficinas com os grupos de pesquisa. Na época, estava em fase de qualificar meu projeto de pesquisa, e era necessário a apresentação dos resultados parciais. A

dificuldade que tive em descrever o que acontecia nas reuniões com os grupos de agricultores e qual a importância da participação desses agricultores como pesquisadores em um projeto de Fitopatologia, me fez perceber que era preciso me envolver mais com as pessoas e sair do laboratório. Não era mais possível separar “parte técnica” e “parte social” da pesquisa, muito menos, escolher uma delas para participar. A partir daí, compreendi, que parte da minha resistência em me envolver com o lado “social” do projeto era devido a minha formação acadêmica. Durante os anos dedicados a formação profissional não aprendemos a ouvir as pessoas, a trocar informações, a considerar como válidos todos os tipos de conhecimento.

6.7.2 Uma nova formação de profissionais

Dentro da Fitopatologia ainda prevalece a “transferência de conhecimento” dos pesquisadores e extensionistas para os agricultores. A Fitopatologia clássica pouco se preocupa com questões sociais, não raro sendo os exemplos de métodos de manejo de doenças que desconhecem totalmente as realidades culturais e a organização social em diferentes agroecossistemas. Os profissionais precisam considerar que a recomendação de pacotes tecnológicos uniformes, baseados em monoculturas e, com controle distante das comunidades, causa perda da identidade cultural e da capacidade de reprodução social. Este modelo, fortemente exógeno, dependente de tecnologias não adaptadas aos agroecossistemas, já demonstrou não levar à sustentabilidade. Incorporando-se o princípio da equidade, numa visão dos sistemas alimentares, é possível visualizar a Fitopatologia à serviço de modelos sustentáveis de agricultura, acompanhando formas de construção do conhecimento agroecológico (Pacífico & Dal Soglio, 2008). Para que isso aconteça é

necessário uma nova abordagem na formação dos futuros profissionais ligados às Ciências agrárias.

Segundo Chambers (1994), para que ocorram mudanças sustentáveis, é necessário desenvolver um “novo profissionalismo”. Uma das deformações geradas pelo modelo de desenvolvimento agrícola ainda vigente foi a transformação imposta aos modelos de educação e formação de profissionais das Ciências Agrária (Díaz Bordenave, 1977). Ao invés de formar profissionais que entendam das condições específicas e totalizadoras inerentes aos processos agrícolas e do desenvolvimento rural, o ensino nas universidades e escolas agrícolas adotou um modelo que privilegia a divisão disciplinar, a especialização e, conseqüentemente, a difusão de receitas técnicas e pacotes tecnológicos. Assim, os profissionais egressos, em geral, não tiveram a oportunidade de chegar a uma compreensão da agricultura como um processo que implica uma relação do homem e o ecossistema no qual vive e trabalha, e são condicionados a não considerar que, para muitos agricultores, essa atividade se confunde com seu modo de vida. Essa carência na formação limita a capacidade do profissional de ter uma visão holística da realidade na qual vai atuar e uma ação sistêmica, o que reduz sua possibilidade de compreender a agricultura partindo dos princípios básicos dos processos naturais e como uma resultante da coevolução sociedade/ambiente, processo muitas vezes conhecido como coprodução (Caporal, 2003).

Em geral, estuda-se muito sobre as máquinas e os insumos, mas não se estuda sobre os atores sociais e o papel decisivo que esses assumem na agricultura e no manejo dos recursos naturais. As disciplinas que tratam dos aspectos da vida, dos indivíduos, de suas inter-relações, da sociedade em que

vivem, trabalham e atuam, costumam ser desviadas de sua importância e receber um menor peso no conjunto do programa de formação. Esse é o caso da Sociologia, mas também o da Extensão Rural que, quando está presente nos currículos, está destinada a cumprir a tarefa de oferecer aos futuros profissionais instrumentos por meio dos quais podem impor seus conhecimentos diante dos agricultores, para garantir, mediante o uso de uma metodologia específica, a reprodução do modelo no qual e para qual foi preparado (Caporal & Fialho, 1989; Caporal, 2003).

O “novo profissionalismo” deveria caracterizar-se pela capacidade de ver as pessoas antes das coisas e reconhecer que nem sempre o que pensamos e estabelecemos como necessidades dos indivíduos corresponde às reais necessidades sentidas por eles mesmos, de modo que o profissional deveria estar, cotidianamente, buscando perceber, entender, os valores próprios dos atores. Ao contrário do enfoque reducionista e cartesiano da formação profissional convencional, deveria ser adotada uma formação multidisciplinar ou, pelo menos, que se ampliasse aspectos formativos que levassem a uma maior capacidade de dialogar com outras profissões e de interação com outras disciplinas e outros conhecimentos (Caporal, 2003).

O Projeto Pinta Preta acrescentou à minha formação, um pouco da visão holística que falta para a maioria dos profissionais, atualmente. Considerar o conhecimento e a necessidade dos agricultores, aprender a ouvir e a construir junto novos conhecimentos, ao invés de limitar-me a transferir o meu conhecimento, são dimensões que a universidade ainda pouco favorece, e que precisam ser aprendidas e praticadas. A introdução da disciplina de Agroecologia nas Faculdades de Agronomia, os programas em

Desenvolvimento Rural, o incentivo para que alunos se envolvam, cada vez mais, em projetos de extensão, são algumas mudanças que começam a ocorrer dentro das universidades, visando o entendimento do meio ambiente como um todo.

Esse aprendizado levarei no meu caminho como profissional, no meu caminho dentro da Fitopatologia. E espero continuar aprendendo, pois como disse Paulo Freire (1989), "Ninguém ignora tudo. Ninguém sabe tudo. Todos nós sabemos alguma coisa. Todos nós ignoramos alguma coisa, por isso aprendemos sempre".

7 CONCLUSOES

Baseado nos resultados obtidos, pode-se concluir que:

7.1 É possível a utilização de métodos participativos em projetos de pesquisa com ênfase em Fitopatologia.

7.2 O uso de metodologias participativas facilita a apropriação da tecnologia gerada, pelos agricultores.

7.3 Existem microrganismos nativos da microflora de tangerineiras cv. Montenegrina que podem ser utilizados como agentes de biocontrole ao fitopatógeno *Guignardia citricarpa*.

7.5 Há inóculo de *G. citricarpa* nos pomares avaliados.

7.6 O isolado TC01 de *T. koningii* sobrevive no f iloplano de tangerineiras cv. Montenegrina, quando pulverizado regularmente.

7.7 O isolado TC01 de *T. koningii* foi eficiente no controle do fungo *G. citricarpa*.

7.8 O isolado TC01 desenvolve-se em substratos alternativos, como compostos e meio de cultura com suco de laranja.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**. 4.ed. Academic Press: San Diego, 1997. 635 p.

AGUIAR-MENEZES, E.L. Controle Biológico: na busca pela sustentabilidade da agricultura brasileira. **Campo e Negócios**, Uberlândia, v.4, n.42, p. 66 -67, 2006.

AGUILAR-VILDOSO, C. I. (Coord.). **Manual técnico de procedimentos da mancha preta dos citros**. Brasília: MAPA/DAS/DDIV, 2002. 72p.

ALCOBA, N.J.; VIGIANI, A.R.; BEJARANO, N.V.; SLVAREZ, S.E.; SERRANO, M.A.; BONILLO, M.C. **Mancha negra de los citros: epidemiología y control**. San Salvador de Jujuy: Universidad Nacional de Jujuy, 2000. 56p.

ALMEIDA, J. Da ideologia do progresso à idéia de desenvolvimento (rural) sustentável. **Revista Educação Agrícola Superior**, Brasília, v. 15, n. E special, p. 51-85, 1997.

ALTIERI, M. **Agroecologia: as bases científicas da agricultura alternativa**. Rio de Janeiro: PTA/FASE, 1989. 240p.

ALTIERI, M. **Agroecologia: bases científicas para uma agricultura sustentável**. Guaíba-RS: Agropecuária, 2002, 592 p.

ALTIERI, M. **Agroecologia: a dinâmica produtiva da agricultura sustentável**. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2009. 110p

ALTIERI, M.; ROSSET, P.; THRUPP, L. A. **El potencial de la agroecología para combatir el hambre en el mundo en desarrollo**. Washington DC: IFPRI, 1998. Disponível em: www.ifpri.org Acesso em: 14 dez. 2010.

ARRAS, G.; DEMONTIS, S.; SUSSARELLU, L. Characterization of yeasts (*Pichia guilliermondii* and *Rhodotorula glutinis*) antagonistic to *Penicillium*

digitatum. **Annali di Microbiologia ed Enzimologia**, Milano, v.46, n.2, p.285-298, 1996.

ARRAS, G.; DE CICCO, V.; ARRU, S.; LIMA, G. Biocontrol by yeasts of blue mould of citrus fruits and the mode of action of an isolate of *Pichia guilliermondii*. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, Kent, v.73, n.3, p.413-418, 1998.

ASSIS, R.L. Desenvolvimento Rural Sustentável no Brasil: Perspectivas a Partir da Integração de Ações Públicas e Privadas com Base na Agroecologia. **Economia Aplicada**, Campinas, p.75-89, 2005.

AVERNA-SACCÁ, R. Pústulas pretas sobre laranjas doces produzidas pelo *Phoma citricarpa*. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v.15, p.668-674. 1940.

AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI Jr. W.; ARAÚJO, W.L.; PEREIRA, J.O. Microrganismos endofíticos e seu papel em plantas tropicais. In: SERAFINI, L.A.; BARROS, N.M.; AZEVEDO, J.L. (Ed.). **Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria**. Caxias do Sul: EDUCS, 2002. p.233-268.

BANDEIRA, P. S. Participação, articulação de atores sociais e desenvolvimento regional. In: BECKER, D. F. ; BANDEIRA, P. S. (Org.) **Desenvolvimento local-regional: determinantes e desafios contemporâneos**. Santa Cruz do Sul: EDUNISC, 2000. p.1-22

BASTOS, C. N. Estratégias de controle biológico de fitopatógenos do cacaueteiro. REUNIÃO DE CONTROLE BIOLÓGICO DE FITOPATÓGENOS, 7., 2003, Ilhéus. **Anais...** [Ilhéus], 2003. p. 25-27.

BENATO, E.A.; CIA, P.; SOUZA, N.L. Manejo de doenças de frutas pós-colheita. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.9, p.403-440, 2001.

BETTIOL, W. Controle biológico de doenças do filoplano. In: BETTIOL, W. (Ed.) **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA, 1991. p. 33-52.

BETTIOL, W. Biocontrole na filosfera: problemas e perspectivas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.5, p. 59-97, 1997.

BETTIOL, W.; GHINI, R. Controle biológico In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v.1, cap.36, p.717-728.

BALDASSARI, R.B.; GÓES, A. de; SANTOS, J.M. dos; TIMOSSI, A.J. Microscopia eletrônica de varredura de isolados de *Guignardia citricarpa* obtidos de plantas cítricas. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 27. n. 1, p. 88-92, 2001.

BELLOTTE, J.A.M. **Controle biológico da mancha preta dos frutos cítricos mediante manejo cultural**. 2006. 63 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de pós-Graduação em Agronomia, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

BLAKEMAN, J.P. 1985. Ecological succession on leaf surface microorganisms in relation to biological control. In: **Biological control on the phylloplane**. St Paul, Minnesota : The American Phytopathological Society, 1985. p.6 – 30.

BLUM, L.E.B.; AMARANTE, C.V.T.; VALDEBENITO-DANHUEZA, R.M.; GUIMARÃES, L.S.; DEZANET, A.; HACK NETO, P. *Cryptococcus laurentiis* aplicado no pós-colheita reduz podridões em maçãs. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.29, n.4, p.433-436, 2004.

BODDY, L.; WIMPENNY, J. W. T. Ecological concepts in food microbiology. **Journal of Applied Bacteriology**, Cardiff, v. 73, n. 2, p. 23-38, 1992.

CAPORAL, F. R. Bases para uma nova Ater pública. **Revista Extensão Rural**, Santa Maria, p. 85-117, 2003.

CAPORAL, F.R.; FIALHO, J.R.D. **A disciplina de Extensão Rural no Curso de Agronomia da UFSM: análise geral e sugestão de um novo programa**. Santa Maria/RS: CPGER/UFSM, 1989. p.41.

CAPORAL F.R.; COSTABEBER, J.A. Agroecologia: aproximando conceitos com a noção de sustentabilidade. In: RUSCHEINSKY, A. **Sustentabilidade: uma paixão em movimento**. Porto Alegre: Sulina, 2004. p. 46-61.

CAPORAL, F.R.; COSTABEBER, J.A. Análise multidimensional da sustentabilidade uma proposta metodológica a partir da agroecologia. **Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável**, Porto Alegre, v.3, n.3, p.70-85, 2002.

CAPORAL, F.R.; COSTABEBER, J.A.; PAULUS, G. **Agroecologia Novo Paradigma: matriz disciplinar ou novo paradigma para o desenvolvimento rural sustentável**. Brasília. 2006 Disponível em: <http://www.Pronaf.gov.br/dater/index.php?sccid=450> Acesso em: 23 out. 2010.

COSTABEBER, J.A.; CAPORAL, F.R. Possibilidades e alternativas do desenvolvimento rural sustentável. In: VELA, H. (Org.) **Agricultura Familiar e Desenvolvimento Rural Sustentável no Mercosul**. Santa Maria: Editora da UFSM : Pallotti, 2003. p.157-194.

CASTORIA, R.; DE CURTIS, F.; LIMA, G.; CAPUTO, L.; PACIFICO, S.; DE CICCIO, V. *Aureobasidium pullulans* (LS-30) an antagonist of postharvest pathogens of fruits: study on its modes of action. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.22, p.7-17, 2001.

CHAMBERS, R. **Rural development: putting the last first**. Londres: Longman, 1983.

CHAMBERS, R. **Challenging the professions: frontiers for rural development.** London: Intermediate Technology Publications, 1994.

CHET, I.; BAKER, R. Induction of suppressives to *Rhizoctonia solani* in soil. **Phytopathology**, St. Paul, v. 70, n.5, p.994-998, 1980.

CHET, I.; BAKER, R. Isolation and biocontrol potencial of *Trichoderma hamatum* from soil naturally suppressive to *Rhizoctonia solani*. **Phytopathology**, St. Paul, v.71, n.3, p.286-290, 1981.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-Colheita de Frutos e Hortaliças: Fisiologia e Manuseio.** Lavras: ESAL.FAEPE, 1990. 320p.

CHUNG, K.R.; SHILTS, T.; ERTURK, U.; TIMMER L.W. ; UENG, P.P. Indole derivatives produced by the fungus *Colletotrichum acutatum* causing lime anthracnose and postbloom fruit drop of citrus. **FEMS Microbiology Letters**, Lake Alfred, v.12, n.1, p.23- 30, 2003.

COOK , R.J.; BAKER, K.F. **The nature and practice of biological control of plant pathogens.** St. Paul: The American Phytopathological Society, 1983. 539p.

CORRÊA, A.S. **Avaliação da microbiota endofítica de citros com potencial antagônico no controle biológico de *Guignardia citricarpa*.** 2008. 46 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

COSTA, L. Qualidade pós-colheita de citros. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.17, n.80, p.45-51, 1994.

DAL SOGLIO, F. K. **Effect of soil pH and temperatute on the biological control of *Rhizoctonia solani* by *Bacillus megaterium* and *Trichoderma harzianum*.** 1995. 165 f. Thesis (Doctor of Philosophy) – University of Illinois, [Chicago], 1995.

DAL SOGLIO, F.K.; ABIB, E.N.; BONINE, D.P. O Grupo de Citricultura Ecológica: Aprendendo com a Participação. **Agriculturas**, Rio de Janeiro, v.3, n.4, p.11-14, 2006.

DAVIES, F. S.; ALBRIGO, L. O. **Citrus.** London,UK: CAB International, 1994. 254p.

DIAZ BORDENAVE, J. **La Transferencia de Tecnologia y la Teoria General de los Sistemas.** Costa Rica: IICA, 1977.

DOIDGE, E.M. Some diseases of citrus prevalent in South Africa. **South Africa Journal Science**, Stanford, v.26, p.320-325, 1929.

DORTA, B.; BOSCH, A.; ARCAS, J. A.; ERTOLA, R. J. High level of sporulation of *Metarhizium anisopliae* in a medium containing by products. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 33, n. 6, p. 712-715, 1990.

EI-GHAOUTH, A.; WILSON, C.L.; WISNIEWSKI, M.E. Biologically based alternatives to synthetic fungicides for the postharvest diseases of fruit and vegetables. In: NAQVI, S.A.M.H. (Ed.) **Diseases of Fruit and Vegetables**. The Netherlands : Kluwer Academic, 2004. p. 511–535, v. 2.

EHLERS, E.M. **O que se entende por agricultura sustentável?** 1994. 161f. Dissertação (Mestrado - Ciência Ambiental) – Programa de Pós-Graduação em Ciência Ambiental, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1994.

ELAD, Y.; KAPAT, A. The role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea*. **European Journal of Plant Pathology**, Bet Dagan, v. 105, n. 2, p. 177–189, 1999.

EXPOSITO, M.V. **Diagnóstico Rural Participativo: Guia Prático**. Brasília: MDA. Secretaria da Agricultura Familiar, 2006. 62p.

FEICHTENBERGER, E.; GOES, A. **Manual Técnico Sobre Pinta Preta**. Araraquara: Fundecitrus, 1998.

FEICHTENBERGER, E.; MÜLLER, G.W.; GUIRADO, N. Doenças dos citros (*Citrus* spp.). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. (Ed.) **Manual de fitopatologia**. 3.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. v. 2., p. 261- 296p.

FERNANDES, C. F. **Resposta Hipersensitiva em Plantas**. EMBRAPA, Rondônia, Disponível em: <http://www.agrosoft.org.br/agropag/103588.htm>
Acesso em: 20 nov. 2010.

FIALHO, M.B. **Efeito *in vitro* de *Saccharomyces cerevisiae* sobre *Guignardia citricarpa*, agente causal da pinta preta dos citros**. 2004. 60f. Dissertação (Mestrado em Agronomia - Microbiologia agrícola) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

FISCHER, I. H. et al. Caracterização dos danos pós-colheita em citros procedentes de ‘packinghouse’. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.32, n.4, p.304-310, 2007.

FISCHER, I. H. et al. Avaliação de passifloraceas, fungicidas e *Trichoderma* para o manejo de podridão-do-colo do maracujazeiro, casada por *Nectria haematococa*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.32, n.3, p.709-717, 2010.

FRANCISCO, E.A.; SILVA, A.; MATIUSSE, B.F.; MERIRELLES, H.T.; HERRMANN, G.R. Compatibilidade de Fludioxonil e Metalaxil-M a *Trichoderma* sp. In: SIMPROT – SEMINÁRIO DE PROTEÇÃO DE

PLANTAS, 2009, Botucatu, SP. [Anais...] Botucatu, SP., 2009. Disponível em: <http://www.fca.unesp.br/simprot> Acesso em: 13 dez. 2010.

FREIRE, P. **A importância do ato de ler:** em três artigos que se completam, São Paulo : Autores Associados : Cortez, 1989. p. 39

FUKUDA, W.M.G. **Pesquisa participativa, com variedades de mandioca.** Disponível em: www.embrapa.br Acesso em: 08 set. 2009.

FUNDECITRUS. **Manual técnico sobre Pinta Preta.** Araraquara: Fundo Paulista de Defesa da Agricultura, 2000. 10p. (Boletim Técnico. Edição especial).

GHINI, R. **Resistência de fungos a fungicidas do grupo dos benzimidazóis e dicarboximidas:** uma revisão. Jaguariúna: EMBRAPA/CNPDA, 1989. 21 p.

GLIESSMAN, S. R. **Agroecologia:** Processos Ecológicos em Agricultura Sustentável. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2000. 653p.

GOMES, M.A.O.; SOUZA, A.V.A.; CARVALHO, R.S. Diagnóstico Rápido Participativo (DRP) como mitigador de impactos socioeconômicos negativos em empreendimentos agropecuários. In: BROSE, M. **Metodologia Participativa:** uma introdução a 29 instrumentos. Porto Alegre: Tomo Editorial, 2001. p.63-78.

GONÇALVES, R.C.; ALFENAS, A.C.; MAFIA, R.G. Armazenamento de microrganismos em cultura com ênfase em fungos fitopatogênicos. In: ALFENAS, A.C.; MAFIA, R.G. (Ed.) **Métodos em Fitopatologia.** Viçosa: Ed. UFV, 2007. 382p.

GRAJEK, W. Sporogenesis of the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii* in solid- state cultures. **Folia Microbiologica**, Prague, v. 39, n. 1, p. 29-32, 1994.

GUIMARÃES, A. **Bioprospeção de microrganismos epifíticos de tangerineira cv Montenegrina para o manejo da mancha preta do citros causada por *Guignardia citricarpa* KIELY.** 2008. 91 f . Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

GULLINO, M.L.; KUIJPERS, L.A.M. Social and political implications of managing plant diseases with restricted fungicides in Europe. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.32, p. 559-579, 1994.

GUZMÁN, E.S.; MOLINA,G.S. Sobre la agroecologia: algunas reflexiones en torno a la agricultura familiar en España. In: GARCIA DE LEÓN, M.A. **El campo y la ciudad.** Madrid: [s.n.], 1996.

GOES, A. de. Controle da mancha-preta dos frutos cítricos. **Laranja**, São Paulo, v. 9, p.293-304, 1998.

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W.F; KLOPPER, J.W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.43, p. 895-914, 1997.

HARMAN, G. E.; CHET, I.; BAKER, R. *Trichoderma hamatum* effects on seed and seedling disease induced in radish and pea by *Pythium* spp. or *Rhizoctonia solani*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 70, n.5, p.1167-1172, 1980.

HARMAN, G.E. Myths and dogmas of biocontrol-changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. **Plant Disease**, Geneva, v. 84, n. 4, p. 377-393, 2000.

HARMAN, G.E.; HOWELL, C.R.; VITERBO, A.; CHET, I.; LORITO, M. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews**, Geneva, v.2, p. 3-56, 2004.

HOWELL, C.R. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 87, p. 4-10, 2003.

IBGE. **Produção Agrícola Estadual**: Lavoura Permanente 2009. Disponível em:

<http://www.ibge.gov.br/estadosat/temas.php?sigla=rs&tema=lavourapermanente2009> Acesso em: 13 dez. 2010.

JANISIEWICZ, W. J.; PETERSON, D. L.; BORS, R. Control of storage decay of apples with *Sporobolomyces roseus*. **Plant Disease**, Saint Paul, v.78, n.5, p.466- 470, 1994.

KHALIL, S. K.; SHAN, M. A.; NAEEM, M. Laboratory on the compatibility of the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii* with certain pesticides. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 13, p. 329-334, 1985.

KIELY, T.B. **Control and epiphytology of Black spot of citrus on the central coast PF New South Wales**. New South Wales: Departamento of Agriculture Science Bulletin, 1948a. 88p.

KIELY, T.B. Preliminary studies on *Guignardia citricarpa* spp.: the ascigenous stage of *Phoma citricarpa* McAlp. and its relation to black spot of citrus. **Proceedings of the Linnean Society of New South Wales**, New South Wales, v.73, p.249-292, 1948b.

KIELY, T. B. Black spot of citrus. **Agricultural Gazette**, Pretória, v.1, p.17-19, 1949.

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

KOTZÉ, J. M. Epidemiology and control of citrus blackspot in South África.

Plant Disease, Saint Paul, v. 65, p. 945-950, 1981.

KOTZÉ, J. M. History and epidemiology of citrus. **Proceedings of International Society of Citriculture**, Saint Paul, v. 2, p. 1296-1299, 1996.

KOTZÉ, J.M. Black spot. In: WHITESIDE, J.O.; GARNSEY, S.M.; TIMMER, L.W. (Ed.) **Compendium of citrus diseases**. Saint Paul: APS Press, 1988. p. 10-12.

KUMMER, L. **Metodologia Participativa no Meio Rural: uma visão interdisciplinar, conceitos, ferramentas e vivências**. Salvador: GTZ, 2007. 155p.

KUPPER, K.C.; GIMENES-FERNANDES, N.; DE GOES, A. Controle biológico de *Colletotricum acutatum*, agente causal da queda prematura em frutos cítricos. **Fitopatologia Brasileira**, Jaboticabal, v.3, n. 28. p.251 -257, 2003.

LANGVAD, F. A simple and rapid method for qualitative and quantitative study of the fungal flora of leaves. **Canadian Journal Microbiology**, Ottawa, v. 26, p.666-670, 1980.

LEE, O. H. K.; HYDE, K. D. Phylloplane fungi in Hong Kong mangroves: evaluation of study methods. **Mycologia**, Hong Kong, v.94, p.596-606. 2002.

LEFF, E. **Epistemologia ambiental**. 3. ed. São Paulo: Cortez, 2002. 240p.

LEITE, L. G.; BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J. E. M.; ALVES, S. B. **Produção de fungos entomopatogênicos**. Ribeirão Preto: OESP, 2003. 92 p.

LINDOW, S. E.; BRANDL, M. T. Microbiology of the phyllosphere. **Applied and Environmental Microbiology**, Albany, v.69, n. 4, p. 1875-1883, 2003.

LIU, S.; BAKER, R. Mechanism of biological control in soil suppressive to *Rhizoctonia solani*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 70, n.5, p.404-412, 1980.

LUTZENBERGER, J. **Ecologia: do jardim ao poder**. Porto Alegre: L&PM, 1985. 102p.

LO, C.-T.; NELSON, E. B.; HARMAN, G. E. Improved biocontrol efficacy of *Trichoderma harzianum* 1295-22 for foliar phases of turf diseases by use of spray applications. **Plant Disease**, Geneva, NY, v.81, n.10, p.1132-1138, 1997.

LOPES, S. Ecocitrus Transforma Lixo em Adubo. **Correio do Povo**, Porto Alegre, 31 de março, p.14, 1997. Suplemento Rural.

MARIANO, R.L.R. Métodos de seleção *in vitro* para o controle microbiológico de patógenos de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.1, p.369-409, 1993.

MATTOS Jr., D.; DE NEGRI, J.D.; FIGUEIREDO, J.O.; POMPEU Jr., J. **Citros**: principais informações e recomendações de cultivo. Disponível em: <http://www.iac.sp.gov.br/Tecnologias/Citros/Citros.htm> Acesso em: 24 jan. 2008.

MATTIUZ, B.-H. et al. Processamento mínimo em goiabas 'Paluma' e 'Pedro Sato': 2. Avaliação química, sensorial e microbiológica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.23, n.3, 2003.

McLAUGHLIN, R.J.; WISNIEWSKI, M.E.; WILSON, C.L.; CHALUTZ, E. Effect of inoculum concentration and salt solutions on biological control of postharvest diseases of apple with *Candida* sp. **Phytopathology**, Wenatchee, v.80, p.456-461, 1990.

McCONIE, K. C. The latent occurrence in citrus and others hosts of a *Guignardia* easily confused with *G. citricarpa*, the citrus black spot pathogens. **Phytopathology**, Beltsville, v. 54, p. 40-43, 1964.

McONIE, K.C. Germination and infection of citrus by ascospores of *Guignardia citricarpa* in relation to control of black spot. **Phytopathology**, Beltsville, v.57, p.743-746, 1967.

MELO, I. S.; Potencialidades de utilização de *Trichoderma* spp. no controle biológico de doenças de Plantas. In: BETTIOL, W. (Org.) **Controle Biológico de Doenças de Plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA – CNPDA, 1991. p. 7-23.

MELO, I. S.; *Trichoderma* e *Gliocadium* como bioprotetores de plantas. In: LUZ, W. C. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 4, p. 261 – 295, 1996.

MELO, I. S. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: MELO, I. S. de.; AZEVEDO, J. L. de. **Controle Biológico**. Jaguariúna: EMBRAPA, 1998.

MOINO Jr., A.; ALVES, S.B. Efeito de imidacloprid e fipronil sobre *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. E *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e no comportamento de limpeza de *Heterotermes tenuis* (Hagen.). **Anais da Sociedade de Entomologia**, Piracicaba, v.27, p.611-620, 1998.

MOREIRA, L.M.; MAY-DE MIO, L.L.; VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M.; LIMA, M.L.R.Z.C.; POSSAMAI, J.C.; Controle em pós-colheita de *Monilinia fructicola* em pêssegos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.27, n.4, 2002.

MOREIRA, R.M.; DO CARMO, M.S. Agroecologia na construção do desenvolvimento rural sustentável. **Agricultura em São Paulo**, São Paulo, v.51, n.2, p. 37-56, 2004.

MORRIS, C. G.; ROUSSE, D. I. Role of nutrients in regulating epiphytic bacterial populations. In: WINDELS, C. E.; LINDOW, S. E. **Biological control on the phylloplane**. St Paul : The American Phytopathological Society, 1985.

p. 63-82.

NELSON, R.; ORREGO, R.; ORTIZ, O.; TENORIO, J.; MUNDT, C.; FREDRIX, M.; VIEN, N.V. Working with resource-poor farmer to manage plant diseases. **Plant Disease**, Lima, v.85, n.7, p. 684-695, 2001

NORGAARD, R.B. As bases epistemológicas da Agroecologia. In: ALTIERE, M. **Agroecologia**: as bases científicas da agricultura alternativa. Rio de Janeiro: PTA/FASE, 1989. p. 42-48.

PACIFICO, D.; DAL SOGLIO, F.K. Desenvolvimento Participativo no Manejo Agroecológico da Pinta Preta dos Citros em Comunidades do Vale do Rio Caí, RS. In: FÓRUM DAS TECNOLOGIAS SOCIAIS DO NÚCLEO DE ESTUDOS AGRÁRIOS E DESENVOLVIMENTO RURAL - MDA, 2008, Brasília. Disponível em: http://www6.ufrgs.br/pgdr/textos_para_discussao.php?menu=4&cod=23&cod_docente=0&ord=1 Acesso em: 23 ago. 2010.

PANDE, S.; STEVENSON, P.; NARAYANA RAO, J.; NEUPANE, R.K.; CHAUDHARY, R.N.; GRZYWACZ, D.; BOURAL, V.A.; KRISHNA KISHORE, G. Reviving Chikpea Production in Nepal Through Integrated Crop Management, with Emphasis on Botrytis Gray Mold. **Plant Disease**, Andhra Pradesh, v.89, n.12, p. 1252-1262, 2005.

PANDOLFO, J. D. **Associação de *Trichoderma* sp. e fungicidas no controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli***. 2007. 67 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

PAPAVIZAS, G.C. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology and potencial for biocontrol. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v.23, p.23-54, 1985.

PARKE, J.L. Root colonization by indigenous and introduced microorganisms. In: KEISTER, D.L.; GREGAN, P.B. **The rhizosphere and plant growth**. Boston: Kluwer Academic, 1991. p.33-42.

PASCHOLATI, S. F. **Potencial de *Saccharomyces cerevisiae* e outros agentes bióticos na proteção de plantas contra patógenos**. 1998. 123 f. Tese (Livre Docência) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1998.

PAULUS, G. Agroecologia: uma proposta de desenvolvimento sustentável. **Jornal Ibiá**, Montenegro, 24 de maio 2001. 17 p.

PERELLO, A. E. et al. Biological Control of Septoria tritici blotch on wheat by *Trichoderma* spp. under field conditions in Argentina. **BioControl**, Argentina, v.54, p.113-122, 2009

PETERSEN, P; DAL SOGLIO, F.K.; CAPORAL, F.R. A construção de uma

ciência a serviço do campesinato. In: PETERSEN, P. (Ed.) **Agricultura Familiar Camponesa na Construção do Futuro**. Rio de Janeiro:AS-PTA, 2009. p.85- 103.

PRATELLA, G.C.; MARI, M. Effectiveness of *Trichoderma*, *Gliocladium* and *Paecilomyces* in postharvest fruit Protection. **Postharvest Biology and Technology**, Bologna, v.3, p.49–56, 1993.

PRETTY J.N.; VODOUCHE, S.D. Using Rapid Participatory Rural Appraisal. In: SWANSON, B.E.; BENTZ, R.P.; SOFRANKO, A.J. (Eds.) **Improving Agricultural Extension: a reference manual**. Roma: FAO, 1997. p. 47-55.

PUNJA, Z.K.; UTKHEDE, R.S. Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. **Trends in Biotechnology**, Burnaby, v. 21, n. 9, p. 400-407, 2003.

RIBEIRO, S.S.; SOUZA, D.D.L.; FARIA, M.S. Educação popular e metodologias participativas: contribuições para a participação ativa dos sujeitos. In: ENCONTRO NACIONAL DE PESQUISA EM EDUCAÇÃO NO CAMPO, 3., 2010, Brasília. Disponível em: <http://www.encontroobservatorio.unb.br/> Acesso em: 18 nov. 2010.

RITZINGER, C.H.S.P. et al. **Mamão Fitossanidade**. Cruz das almas, BA : EMBRAPA Mandioca e Fruticultura, 2000. 91 p.

ROBBS, C.F. A mancha preta dos frutos cítricos (*Phyllosticta citricarpa*): ameaça à citricultura paulista. **Laranja**, Cordeirópolis, v.11, p.87-95, 1990.

ROBBS, C.F.; PIMENTEL, J.P.; RIBEIRO, R.L. A mancha preta dos citros: identificação da forma perfeita *Guignardia citricarpa* no Estado do Rio de Janeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 18., 1985, Fortaleza. **Resumos...** Fortaleza, 1985. p. 248.

RODOV, V.; BEN-YEHOSHUA, S.; FANG, D.; D'HALLEWIN, G.; CASTIA, T. Accumulation of phytoalexins scoparone and scopoletin in citrus fruits subjected to various postharvest treatments. **Acta Horticulturae, Natural Phenols in Plant Resistance**, [S.l], Israel, v.381, p.517-523, 1994.

RODRIGUES, M.B.C. **Controle de *Guignardia citricarpa*, agente causal de mancha preta dos citros**. 2006. 68 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

ROIGER, T.C.; JEFFERS S. N.; CALDWELL, R. W. Occurrence of *Trichoderma* species in apple orchard and woodland soil. **Soil Biology and Biochemistry**, Britain, v.43, n.4, p. 353 – 359, 1991.

ROMEIRO, A. R. Agricultura Sustentável, Tecnologia e Desenvolvimento Rural. **Agricultura Sustentável**, Jaguariúna, v.3, n.1/2, p.34-42, 1996.

REYES, M.E.Q.; ROHRBACH, K.G.; PAULL, R.E. Microbial antagonists control postharvest black rot of pineapple fruit. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.33, p.193-203, 2004.

SALGADO, C.H.G.; LARRAMENDI, L.R.; ARJONA, C.; PUERTAS, A. FONSECA, M. Efecto de la aplicacion de *Trichoderma harzianum* R. sobre la composicion cuantitativa de bacterias, hongos y actinomicetos de la rizosfera de solanaceaea y su influencia em el crecimiento vegetativo. **Investigaciones Agropecuárias: Produccion Produto Vegetal**, Bayamo, v.14, n. 1-2, 1999.

SANTA, H. S. D.; SANTA, O. R. D.; BRAND, D.; VANDENBERGHE, L. P. S.; SOCCOL, C. R. Spore production of *Beauveria bassiana* from agro-industrial residues. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 48, p. 51-60, 2005.

SCHMIDT, J. **Ocorrência de pinta preta causada por *Guignardia citricarpa* kiely em pomares de citros sob manejo orgânico, no município de Montenegro, RS.** 2003. 77f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

SILVA, F.F. **Espécies de moscas frugíveras (Diptera: Tephritidae e Lonchaeidae) quantificação de danos e avaliação de medidas para o seu manejo em pomares orgânicos de citros.** 2005. 152 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

SILVA-PINHATI, A.C.O.; GOES, A.; WICKERT, E.; ALMEIDA, T.F.; MACHADO, M.A. Mancha Preta dos Citros: Epidemiologia e Manejo. **Laranja**, Cordeirópolis, v.30, n. 1-2, p.45-64, 2009.

SHARMA, R.R.; SINGH, D.; SINGH, R. Biological control of postharvest disease of fruits and vegetables by microbial antagonist: a review. **Biological Control**, Pusa Delhi, India, v.50, p.205-221, 2009.

SMITH, J.H. A study of the effect of various disease control programs on spore releases of the citrus black spot pathogen *Guignardia citricarpa* Kiely. In: INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS, Sun City, 1996. **Proceedings...** Sun City: International Society of Citriculture, 1996. p.351-352.

SOUZA, M.M.O. A utilização de metodologias de diagnóstico e planejamento participativo em assentamentos rurais: o Diagnóstico Rural/Rápido Participativo (DRP). **Em Extensão**, Uberlândia, v.08, n.1, p.34-47, 2009.

STROBEL, G.A. Endophytes as sources of bioactive products. **Microbes and Infection**, Paris, v.5, p. 534-535, 2003.

SUTTON, B.C.; WATERSON, J.M. ***Guignardia citricarpa* Descriptions of pathogenic fungi and bacteria.** Surrey, England, Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1966. n.85, 2p.

TANAKA, M.A.S. Patógenos causadores de tombamento do algodoeiro e seus efeitos sobre a germinação das sementes em diferentes temperaturas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.19, n.1, p.29-33, 1994.

VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M.V. Leveduras para o biocontrole de fitopatógenos. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Ed.). **Controle biológico**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. v.3, p.41-56.

VELDHUIZEN, L.V.; WATERS-BAYER, A.; RAMIREZ, R.; JOHNSON, D.A.; THOMPSON, J. (Eds.). **Farmer's Research in Practice: Lessons from the Field**. London : Intermediate Technology Publications, 1997.

WALKER, G.; MCLEOD, A.; HODGSON, V. Interactions between killer yeast and pathogenic fungi. **FEMS Microbiology**, Amsterdam, v.127, n. 3, p.213 - 222, 1995.

WILSON, C.L.; WISNIEWSKI, M.E. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: an emerging technology. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.27, p.425-441, 1989.

WISNIEWSKI, M.; BILES, C.; DROBY, S.; MCLAUGHLIN, R.; WILSON, C.; CHALUTZ, E. Mode of action of the postharvest biocontrol yeast *Pichia guilliermondii* I. Characterization of attachment to *Botrytis cinerea*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, West Virginia, v. 39, n. 4, p. 245-258, 1991

WISTINGHAUSEN, C.V.; SCHEIBE, W.; HEILMAN, H.; WISTINGHAUSEN, E.V.; KONING, U.J. **Manual para o uso dos preparados biodinâmicos**. Botucatu, SP: Associação Brasileira de Agricultura Biodinâmica : Antroposófica, 2000. 77p.

WOOD, R. K. S.; TVEIT, M. Control of plant diseases by use of antagonistic organisms. **Botanical Review**, Bronx, v. 21, p. 441-492, 1955.

YOUNG, T. W. The properties of brewing performance of brewing yeasts possessing killer character. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, Saint Paul, v.42, p. 1-4, 1982.

ANEXO 1

Quadro dos agricultores participantes da pesquisa

Grupo	Agricultor-pesquisador	Cooperativa e Associação
Santos Reis	Ademar Henz	ECOCITRUS
	Jean Steffen	Associação Companheiros da Natureza
	Martin Maurer	ECOCITRUS
	Norton Steffen	Associação Companheiros da Natureza
Faxinal	Ildo ketterman	ECOCITRUS
	João Kranz	ECOCITRUS
	Luis Laux	ECOCITRUS
	Maique Kochenborger	ECOCITRUS
Pareci Novo	Antônio Bays	Associação Companheiros da Natureza
	Eduardo Schröder	Associação Companheiros da Natureza
	William Rocha	Associação Companheiros da Natureza

ANEXO 2

Critérios	Árvore 1		Testemunha		Árvore 2		Testemunha		Árvore 3		Testemunha	
	Sol	Sombra	Sol	Sombra	Sol	Sombra	Sol	Sombra	Sol	Sombra	Sol	Sombra
Idade da planta												
Altura da planta												
Estado nutricional												
Quantidade de folhas												
Quantidade de frutos												
Tamanho do fruto												
Condições climáticas												
Pinta preta												
Mancha de altermaria												
Lepreose												
Gomose												
Cancro												
Antracnose												
Minador												

TABELA . Tabela para avaliação das bergamoteiras que estão recebendo o tratamento com o isolado TC01 do agente de biocontrole *Trichoderma* sp.

ANEXO 3
Verso da Tabela de avaliação

BREVE DESCRIÇÃO DO MANEJO REALIZADO NO POMAR NESSE MÊS

Indicadores de avaliação para os critérios até a pinta preta

0 – AUSENTE

1 – POUCO

2 –

3 – MÉDIO

4 –

5 – MUITO

OBS. PARA PINTA PRETA SEGUIR A ESCALA COM AS FOTOS

**PARA O RESTANTE DAS DOENÇAS,
MARCAR UM X QUANDO PRESENTE**

ANEXO 4
ESCALA DE NOTAS PARA SEVERIDADE DA PINTA PRETA DOS
CITROS



ANEXO 5
DADOS METEOROLOGICOS FORNECIDOS PELA FEPAGRO –
TAQUARI, RS

Temperatura Média (°C)		
	2009	2010
Janeiro	22.5	26.0
Fevereiro	22.7	27.4
Março	21.8	25.1
Abril	18.5	21.1
Maio	14.7	18.2
Junho	9.4	16.0
Julho	-	15.5
Agosto	-	15.3
Setembro	17.0	18.5
Outubro	19.3	18.8
Novembro	23.9	-
Dezembro	24.8	-

Precipitação (mm)		
	2009	2010
Janeiro	201.5	191.4
Fevereiro	78.7	197.4
Março	89.3	87.5
Abril	11.0	129.2
Maio	78.8	118.0
Junho	63.6	144.2
Julho	94.0	181.5
Agosto	221.2	52.2
Setembro	304.0	226.9
Outubro	129.7	35.0
Novembro	384.0	-
Dezembro	153.3	-

Umidade Relativa (%)		
	2009	2010
Janeiro	81.0	70.0
Fevereiro	82.5	71.0
Março	83.3	76.7
Abril	78.7	77.8
Maio	83.2	83.0
Junho	83.0	81.5
Julho	84.3	78.5
Agosto	74.4	76.8
Setembro	75.3	75.9
Outubro	65.7	67.0
Novembro	76.5	-
Dezembro	68.2	-

MES	AGOSTO	ANO:
LOCAL:	TAQUARI	2010
DIAS	Temp. mini.	Temp. maxi.
1	7.3	15.1
2	3.0	13.1
3	2.1	12.9
4	1.1	13.0
5	9.1	13.0
6	9.0	17.1
7	6.1	18.9
8	11.9	13.9
9	9.0	17.0
10	5.8	18.0
11	8.0	22.6
12	11.3	19.1
13	12.0	14.0
14	8.9	12.2
15	8.0	14.3
16	10.1	20.9
17	9.0	22.9
18	9.1	24.0
19	11.0	24.9
20	12.3	22.1
21	7.3	24.0
22	14.5	29.9
23	13.8	33.2
24	20.8	29.4
25	16.0	18.4
26	17.0	19.8
27	17.1	18.3
28	18.0	22.8
29	18.4	24.1
30	14.5	18.5
31	15.0	26.5
TOTAL	10.9	19.8

