

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

Jaqueline Raquel Tomm Krahn

**MICROBIOTA DO SOLO EM TRÊS SISTEMAS DE CULTIVO DE CITROS
E PATOGENICIDADE DE *Fusarium* spp.**

**Santa Maria, RS
2017**

Jaqueline Raquel Tomm Krahn

MICROBIOTA DO SOLO EM TRÊS SISTEMAS DE CULTIVO DE CITROS E
PATOGENICIDADE DE *Fusarium* spp.

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Agronomia**

Orientador: Prof^a. Ph.D. Elena Blume

Santa Maria, RS
2017

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Krahn, Jaqueline Raquel Tomm
MICROBIOTA DO SOLO EM TRÊS SISTEMAS DE CULTIVO DE
CITROS E PATOGENICIDADE DE *Fusarium* spp. / Jaqueline
Raquel Tomm Krahn.- 2017.
94 p.; 30 cm

Orientadora: Elena Blume
Coorientadores: Marlove Fátima Brião Muniz, José
Miguel Reichert
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-
Graduação em Agronomia, RS, 2017

1. Citricultura 2. Sistemas de cultivo 3.
Patogenicidade 4. Solos 5. Comunidade fúngica I. Blume,
Elena II. Muniz, Marlove Fátima Brião III. Reichert,
José Miguel IV. Título.

© 2017

Todos os direitos autorais reservados a Jaqueline Raquel Tomm Krahn. A reprodução de partes ou de todo deste trabalho só poderá ser feita mediante citação da fonte. Endereço: Departamento de Defesa Fitossanitária, Centro de Ciências Rurais, Prédio 42 - Campus Universitário, Universidade Federal de Santa Maria, CEP: 97105-900 - Santa Maria/RS. Fone: (55) 3220-8015; e-mail: jaquetomm@hotmail.com

Jaqueline Raquel Tomm Krahn

**MICROBIOTA DO SOLO EM TRÊS SISTEMAS DE CULTIVO DE CITROS E
PATOGENICIDADE DE *Fusarium* spp.**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Agronomia**

Aprovado em 28 de julho de 2017:



Elena Blume, Ph.D.
(Presidente/Orientadora)



Luciana Zago Ethur, Dr^a. (UNIPAMPA)



Sandra Beatriz Vieenci Fernandes, Dr^a. (UNIJUI)

Santa Maria, RS
2017

Agradecimentos

À Deus por estar comigo nessa trajetória.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, por proporcionar a oportunidade de me qualificar profissionalmente.

À Capes, pela bolsa concedida, que viabilizou a execução deste trabalho.

À minha orientadora, professora Ph.D. Elena Blume, pela orientação, disponibilidade e auxílio durante o desenvolvimento dessa pesquisa e principalmente por me apoiar nos momentos difíceis.

Aos meus co-orientadores, professora Dr^a Marlove Fátima Brião Muniz, pelas dúvidas esclarecidas e parceria nos momentos de descontração, e em especial ao Ph.D. José Miguel Reichert, pela sua disponibilidade e prestatividade durante a execução do trabalho.

À banca examinadora, professoras Dr^a Luciana Zago Ethur e Dr^a Sandra Beatriz Vicenci Fernandes, pela disposição para contribuir em meu trabalho.

Aos meus pais Luis e Erica, pela educação, apoio e confiança depositada em todos esses anos de estudos, pelo exemplo de honestidade e trabalho.

Aos meus irmãos, Jackson e Janine, por estarem sempre ao meu lado.

Aos meus avós Reinaldo Krahn, Erich e Ida Anna Tomm, pela educação e ajuda prestada durante toda a trajetória da minha vida.

As minhas afilhadas Beatriz, Thalia, Valentina, Sara e ao afilhado Benício, pelo carinho e momentos divertidos que sempre passamos juntos.

Aos meus amigos, Amanda Cardoso, Nailene Dreilich, Isadora Lorenzoni e Henrique Bigolin pela amizade verdadeira e sincera, que apesar da distância permanece a mesma, o apoio de vocês foi e sempre será essencial.

Às minhas amigas, Ana Lúcia Londero e Cassiane Ubessi, pela amizade verdadeira e acolhida carinhosa em Santa Maria, em especial a Cassi, que sempre esteve ao meu lado em todas as alegrias e principalmente angústias que a pós-graduação me proporcionou.

Aos funcionários do Departamento de Defesa Fitossanitária, em especial a Maria Neves Weber, pela orientação nos trabalhos, apoio nos momentos difíceis, amizade e alegria transmitida no dia a dia do laboratório. Agradeço também ao Fernando Cognato, pela ajuda no laboratório e amizade.

Ao Lucas Pilon pela amizade e ajuda na coleta de amostras de solo, análises químicas e físicas realizadas. Sem você tudo teria sido mais difícil, obrigada de verdade.

Aos colegas de Laboratório Caciara G. Maciel, Clair Walker, Ricardo Mezzomo, Vinicius Fantinel, Jéssica Rolim, Janaína Sarzi, Renata F. Favaretto, Adriana F. Dutra, Jéssica E. Rabuske, Tales Poletto, Lucas G. Savian, Pamela Oruoski, Felipe Vedovatto, Vanessa Alba e Luciana Maculam pela ajuda na condução dos trabalhos, pela amizade e principalmente pelos bons momentos que compartilhamos.

Aos agricultores Luiz e Delfino, que juntamente com suas famílias disponibilizaram seus pomares para a realização do trabalho.

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram com meu trabalho e estiveram presentes em algum momento dessa trajetória.

RESUMO

MICROBIOTA DO SOLO EM TRÊS SISTEMAS DE CULTIVO DE CITROS E PATOGENICIDADE DE *Fusarium* spp.

AUTORA: Jaqueline Raquel Tomm Krahn

ORIENTADOR(A): Elena Blume

Diferentes sistemas de produção utilizam técnicas de manejo que buscam suprir as necessidades nutricionais, conjuntamente com o controle de pragas e doenças que venham a ser prejudiciais às plantas. No entanto, algumas dessas técnicas podem ser prejudiciais aos micro-organismos e, principalmente, aos presentes na microbiota do solo, pois alguns apresentam potencial patogênico e outros antagonicos. É de suma importância o conhecimento da ecologia de micro-organismos presentes em diferentes sistemas de cultivo, buscando um sistema de produção menos prejudicial ao meio. Os objetivos deste trabalho foram: identificar e quantificar a população fúngica em três sistemas de cultivo de citros (manejo orgânico, manejo agroflorestal e manejo convencional); avaliar a patogenicidade de isolados de *Fusarium* spp. a mudas de *Citrus deliciosa* Tenore. Avaliar o potencial antagonico de isolados de *Trichoderma* spp. em relação a isolados de *Fusarium* spp.. Amostras de solo foram coletadas no município de Montenegro (RS) em pomares de citros com diferentes manejos. As coletas foram realizadas na profundidade de 0-5 cm no verão e inverno de 2015 e verão e inverno de 2016. Nas amostras coletadas foram realizadas avaliações da população fúngica (diluições seriadas) e de características físicas e químicas do solo. Fungos dos gêneros *Fusarium* e *Trichoderma*, quando presentes nas diluições seriadas, foram isolados para posterior caracterização morfológica e identificação molecular (baseada na região TEF-1 α). Foram realizados teste *in vitro* (confrontação direta) para avaliar a eficiência de controle de *Fusarium* spp. versus *Trichoderma* spp. As características químicas e as populações fúngicas apresentaram correlações significativas, as quais são favorecidas pelo sistema de manejo. As espécies de *Fusarium* identificadas foram: *F. solani*, *F. oxysporum* e *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* e de *Trichoderma* foram: *T. asperellum*, *T. harzianum* e *T. koningiopsis*. Os isolados de *Trichoderma* spp. apresentam boa capacidade de inibição do crescimento de *Fusarium* spp. Em mudas de *Citrus deliciosa* Tenore, fungos do gênero *Fusarium* spp. podem ser considerados patógenos fracos.

Palavras-chave: Citricultura, Comunidade fúngica, Solo, Patogenicidade.

ABSTRACT

SOIL MICROBIOTE IN THREE SYSTEMS OF CITRUS CULTURE AND PATHOGENICITY OF *Fusarium* spp.

Author: Jaqueline Raquel Tomm Krahn

Adviser: Elena Blume

Different production systems utilize management techniques that seek to supply nutritional needs, together with the control of pests and diseases that are harmful to plants. However, some of these techniques can be harmful to microorganisms and, mainly, to those present in the soil microbiota, since some of them have pathogenic and others antagonistic potential. It is very important to understand the ecology of microorganisms present in different farming systems, searching for a production system less prejudicial to the environment. The objectives of this paper were: to identify and quantify the fungal population in three citrus cultivation systems (organic, agroforestry and conventional managements); to evaluate the pathogenicity of *Fusarium* spp. isolates to *Citrus deliciosa* Tenore seedlings; and to evaluate the antagonistic potential of *Trichoderma* spp. isolates in relation to *Fusarium* spp. isolates. Soil samples were collected in Montenegro, RS, Brazil, in citrus orchards with different managements, at 0-5 cm depth in the summer and winter of 2015 and 2016. Fungal population (through serial dilutions) and physical and chemical characteristics of the soil were evaluated. Fungi of genus *Fusarium* and *Trichoderma* were isolated for further morphological characterization and molecular identification (based on TEF-1 α region). In vitro tests (direct confrontation) were performed to evaluate the control efficiency of *Fusarium* spp. by *Trichoderma* spp. The chemical characteristics and the fungal populations showed significant correlations, which are favored by the management system. The *Fusarium* species identified were: *F. solani*, *F. oxysporum*, and *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* and of *Trichoderma* were: *T. asperellum*, *T. harzianum*, and *T. koningiopsis*. The *Trichoderma* spp. isolates have good ability to inhibit the in vitro growth of *Fusarium* spp. In *Citrus deliciosa* Tenore seedlings, *Fusarium* spp. can be considered weak pathogens.

Keywords: Citriculture, Fungus Community, Soil, Pathogenicity.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Pontos de coleta georeferenciados, nos sistemas cultivo orgânico, agroflorestal e convencional de <i>Citrus deliciosa</i> Tenore, na cidade de Montenegro/RS.	25
Tabela 2 – Isolados de <i>Fusarium</i> spp. e <i>Trichoderma</i> spp., oriundos de sistemas orgânico, agroflorestal e convencional de <i>Citrus deliciosa</i> Tenore, utilizados no teste de confronto direto.	33
Tabela 3 – Gêneros fúngicos presentes em solos de sistemas orgânico, agroflorestal e convencional de <i>Citrus deliciosa</i> Tenore, cv. Montenegrina.	35
Tabela 4 – População de <i>Penicillium</i> spp. em sistemas de cultivo orgânico, agroflorestal e convencional de <i>Citrus deliciosa</i> Tenore, cv. Montenegrina.	36
Tabela 5 – População de <i>Fusarium</i> spp. em sistemas de cultivo orgânico, agroflorestal e convencional de <i>Citrus deliciosa</i> Tenore, cv. Montenegrina.	39
Tabela 6 – População de <i>Trichoderma</i> spp. em sistemas de cultivo orgânico, agroflorestal e convencional de <i>Citrus deliciosa</i> Tenore, cv. Montenegrina.	40
Tabela 7 – População de bactérias, leveduras e demais fungos em sistemas de cultivo orgânico, agroflorestal e convencional de <i>Citrus deliciosa</i> Tenore, cv. Montenegrina.	41
Tabela 8 – Composição granulométrica do solo: teores de areia, silte e argila em sistemas de cultivo orgânico, agroflorestal e convencional de <i>Citrus deliciosa</i> Tenore, cv. Montenegrina, na camada de 0-5cm de profundidade.	42
Tabela 9 – Propriedades físicas do solo: densidade do solo, porosidade total, microporosidade e macroporosidade, em sistemas de cultivo orgânico, agroflorestal e convencional de <i>Citrus deliciosa</i> Tenore, cv. Montenegrina, na camada de 0-05cm de profundidade.	43
Tabela 10 – Propriedades químicas do solo, em sistemas de cultivo orgânico, agroflorestal e convencional de <i>Citrus deliciosa</i> Tenore, cv. Montenegrina, no verão de 2015.	44

Tabela 11 – Propriedades químicas do solo, em sistemas de cultivo orgânico, agroflorestal e convencional de <i>Citrus deliciosa</i> Tenore, cv. Montenegrina, no inverno de 2015.....	45
Tabela 12 – Propriedades químicas de solo, em sistemas de cultivo orgânico, agroflorestal e convencional de <i>Citrus deliciosa</i> Tenore, cv. Montenegrina, no verão de 2016.....	45
Tabela 13 – Propriedades químicas de solo, em sistemas de cultivo orgânico, agroflorestal e convencional de <i>Citrus deliciosa</i> Tenore, cv. Montenegrina, no inverno de 2016.....	45
Tabela 14 – Médias das propriedades químicas do solo, em sistemas de cultivo orgânico, agroflorestal e convencional de <i>Citrus deliciosa</i> Tenore, cv. Montenegrina, no período de 2015/16.	49
Tabela 15 – Coeficientes de correlação de Pearson na diagonal superior e na diagonal inferior (sem efeito de tratamentos) entre as propriedades químicas e fungos de solo em sistemas de cultivo orgânico, agroflorestal e convencional de <i>Citrus deliciosa</i> Tenore, cv. Montenegrina.	50
Tabela 16 – Características morfológicas de <i>Fusarium</i> spp. obtidos de sistemas de cultivo orgânico, agroflorestal e convencional de <i>Citrus deliciosa</i> Tenore, cv. Montenegrina.....	54
Tabela 17 – Grupos de isolados de <i>Fusarium</i> spp, com base na técnica de agrupamento UPGMA-("Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean").....	59
Tabela 18 - Distâncias de Mahalanobis entre 24 isolados de <i>Fusarium</i> spp., após agrupamento pela técnica UPGMA-("Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean").....	61
Tabela 19 – Contribuição relativa dos caracteres (esporulação, taxa de crescimento micelial, diâmetro final da colônia, crescimento micelial diário, comprimento, largura e número de septos dos macroconídios) para divergência.....	62
Tabela 20 – Acesso no <i>Genbank</i> , cobertura (%), similaridade (%), país de origem e referência das espécies utilizadas na construção do dendrograma filogenético da região do fator de alongação 1- α	64

Tabela 21 – Características morfológicas de <i>Trichoderma</i> spp. obtidos em sistemas de cultivo orgânico, agroflorestal e convencional de <i>Citrus deliciosa</i> Tenore, cv. Montenegrina.....	67
Tabela 22 – Grupos de isolados de <i>Trichoderma</i> spp. com base na técnica de agrupamento UPGMA-("Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean").....	70
Tabela 23 – Distâncias de Mahalanobis, entre 12 isolados de <i>Trichoderma</i> spp., após agrupamento pela técnica UPGMA	73
Tabela 24 – Contribuição relativa dos caracteres (esporulação, diâmetro da colônia, taxa de crescimento micelial, comprimento e largura dos esporos) para divergência.....	74
Tabela 25 – Acesso Genbak cobertura (%), similaridade (%), país de origem e referência das espécies utilizadas na construção do dendrograma filogenético da região do fator de alongação 1- α	75
Tabela 26 – Grupos de isolados de <i>Fusarium</i> spp. após teste de patogenicidade, com base na formação de estrias.	78
Tabela 27 – Crescimento micelial (mm) de <i>Fusarium</i> spp. após sete dias em teste de confrontação direta com <i>Trichoderma</i> spp., % de inibição e sua classificação quanto ao antagonismo, conforme escala de Bell et al. (1982).....	80

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Espacialização do <i>grid</i> amostral em sistemas orgânico, agroflorestal e convencional de <i>Citrus deliciosa</i> Tenore, na cidade de Montenegro/RS.	25
Figura 2 – Produção de inóculo de <i>Fusarium</i> spp. pelo método do palito.....	31
Figura 3 – Inoculação de palitos infectados com <i>Fusarium</i> spp. em mudas de <i>Citrus deliciosa</i> Tenore, cv. Montenegrina.....	32
Figura 4 – Frutos infestados por <i>Penicillium</i> spp. em sistema Orgânico de <i>Citrus deliciosa</i> Tenore.	37
Figura 5 – Estruturas morfológicas de diferentes isolados de <i>Fusarium</i> spp.	56
Figura 6 – Isolados de <i>Fusarium</i> spp. obtidos no verão/2015 em sistemas de cultivo orgânico, agroflorestal e convencional de <i>Citrus deliciosa</i> Tenore, cv. Montenegrina.	57
Figura 7 – Isolados de <i>Fusarium</i> spp. obtidos no inverno/2015 em sistemas de cultivo orgânico, agroflorestal e convencional de <i>Citrus deliciosa</i> Tenore, cv. Montenegrina.....	57
Figura 8 – Isolados de <i>Fusarium</i> spp. obtidos no verão/2016 em sistemas de cultivo orgânico, agroflorestal e convencional de <i>Citrus deliciosa</i> Tenore, cv. Montenegrina.	58
Figura 9 – Isolados de <i>Fusarium</i> spp. obtidos no inverno/2016 em sistemas de cultivo orgânico, agroflorestal e convencional de <i>Citrus deliciosa</i> Tenore, cv. Montenegrina.....	58
Figura 10 – Dendrograma mostrando a porcentagem de dissimilaridade entre os 24 isolados de <i>Fusarium</i> spp. O Dendrograma foi obtido pela técnica UPGMA, a partir da análise da matriz de distância de Mahalanobis, com sete caracteres morfológicos (esporulação, taxa de crescimento micelial, diâmetro final da colônia, crescimento micelial diário, comprimento, largura e número de septos dos macroconídios)	60
Figura 11 – Dendrograma filogenético baseado no método <i>Neighbour-joining</i> a partir de sequências de DNA da região do fator de alongação 1- α	65
Figura 12 – Isolados de <i>Trichoderma</i> spp. obtidos em sistemas de cultivo orgânico, agroflorestal e convencional de <i>Citrus deliciosa</i> Tenore, cv. Montenegrina, no verão/2015.....	68

Figura 13 – Isolados de <i>Trichoderma</i> spp. obtidos em sistemas de cultivo orgânico, agroflorestal e convencional de <i>Citrus deliciosa</i> Tenore, cv. Montenegrina, no inverno/2015.....	68
Figura 14 – Isolados de <i>Trichoderma</i> spp. obtidos em sistemas de cultivo orgânico, agroflorestal e convencional de <i>Citrus deliciosa</i> Tenore, cv. Montenegrina, no verão/2016.....	69
Figura 15 – Isolados de <i>Trichoderma</i> spp. obtidos em sistemas de cultivo orgânico, agroflorestal e convencional de <i>Citrus deliciosa</i> Tenore, cv. Montenegrina, no inverno/2016.....	69
Figura 16 – Dendrograma mostrando a porcentagem (%) de dissimilaridade entre os 12 isolados de <i>Trichoderma</i> spp. O Dendrograma foi obtido pela técnica UPGMA, a partir da análise da matriz de distância de Mahalanobis, com cinco caracteres morfológicos (esporulação, diâmetro final da colônia, taxa de crescimento micelial, comprimento e largura dos esporos).....	72
Figura 17 – Dendrograma filogenético baseado no método <i>Neighbour-joining</i> a partir de sequências de DNA da região do fator de alongação 1- α	76
Figura 18 – Estrias causadas por <i>Fusarium</i> spp. em mudas de <i>Citrus deliciosa</i> Tenore.....	78
Figura 19 – Imagens do teste de confronto direto, utilizando isolados de <i>Trichoderma</i> spp. sobre diferentes isolados de <i>Fusarium</i> spp.	81

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO -----	13
2. OBJETIVOS -----	15
2.1 OBJETIVO GERAL-----	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS-----	15
3. JUSTIFICATIVA -----	15
4. REVISÃO DE LITERATURA -----	16
4.1 PRODUÇÃO E SISTEMAS DE CULTIVO DE CITROS-----	16
4.2 DOENÇAS DA CULTURA DO CITROS-----	18
4.2.1 Doenças radiculares dos citros -----	19
4.2.2 Doenças e os sistemas de cultivo -----	20
4.3 ANTAGONISTAS DO GÊNERO <i>Trichoderma</i> spp. NO CONTROLE DE PATÓGENOS-----	21
5. HIPÓTESE -----	22
6. MATERIAL E MÉTODOS -----	22
6.1 DESCRIÇÃO E LOCAL DA ÁREA DE ESTUDO-----	23
6.2 COLETA DAS AMOSTRAS-----	24
6.3 QUANTIFICAÇÃO DE UNIDADE FORMADORAS DE COLÔNIAS (UFCS) DE <i>Fusarium</i> spp., <i>Trichoderma</i> spp. E OUTROS-----	25
6.4 DETERMINAÇÕES DE DENSIDADE DO SOLO, MACROPOROSIDADE, MICROPOROSIDADE, POROSIDADE TOTAL E ANÁLISE QUÍMICA DO SOLO --	27
6.5 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DOS ISOLADOS DE <i>Fusarium</i> spp. e <i>Trichoderma</i> spp.-----	27
6.5.1 Taxa de crescimento micelial -----	28
6.5.2 Esporulação -----	28
6.5.3 Pigmentação das colônias -----	28
6.5.4 Caracterização dos conídios -----	28
6.5.5 Identificação molecular de <i>Fusarium</i> spp.e <i>Trichoderma</i> spp. -----	29
6.6 PATOGENICIDADE IN VIVO DE <i>FUSARIUM</i> SPP. EM MUDAS DE <i>Citrus</i> <i>deliciosa</i> Tenore, CV. MONTENEGRINA-----	30
6.6.1 PRODUÇÃO DE INÓCULO-----	30
6.6.2 INOCULAÇÃO DE <i>Fusarium</i> SPP. NAS MUDAS-----	31
6.7 CONFRONTO DIRETO DE ISOLADOS DE <i>Trichoderma</i> spp. E <i>Fusarium</i> spp. -----	32
6.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA-----	34
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO -----	34
7.1 DIVERSIDADE E QUANTIFICAÇÃO DE FUNGOS DE SOLO-----	34
7.2 PROPRIEDADES FÍSICAS E QUÍMICAS DO SOLO NOS SISTEMAS DE CULTIVO-----	41
7.3 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE <i>Fusarium</i> spp.-----	51
7.4 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE <i>Trichoderma</i> spp. -	65
7.5 PATOGENICIDADE DE ISOLADOS DE <i>Fusarium</i> spp. A MUDAS DE <i>Citrus</i> <i>deliciosa</i> Tenore.-----	76
7.6 CONFRONTO DE <i>Fusarium</i> . E <i>Trichoderma</i> spp.-----	78
CONCLUSÕES -----	82
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	83

1. INTRODUÇÃO

A produção de citros no Rio Grande do Sul é predominantemente em propriedades de agricultura familiar, fazendo com que se tenha uma heterogeneidade de sistemas de cultivo e, com isso, distintas técnicas são empregadas no manejo dos pomares, mas todas buscam o melhor desempenho produtivo.

O cultivo orgânico visa ao manejo sustentável do sistema, adotando técnicas específicas que têm como objetivo a sustentabilidade ecológica do meio. Sistemas biodinâmicos levam em consideração os mesmos princípios e técnicas da agricultura orgânica, porém apresentam algumas peculiaridades ligadas à antroposofia e baseadas na integração de todos os elementos ambientais agrícolas. Cultivos baseados na utilização de agrotóxicos, insumos e uso, em grande escala, de maquinário agrícola, são conhecidos como convencionais, nos quais o principal objetivo é a maximização da produção e do lucro. Cultivos em sistemas agroflorestais são baseados na interação entre espécies arbóreas e espécies de produção agrícola, com as espécies arbóreas fornecendo serviços ambientais como: sombreamento, abrigo, alimento, energia, entre outros, que podem beneficiar a produção agrícola.

Nos distintos sistemas de cultivo, são empregadas práticas que visam atender as necessidades nutricionais, conjuntamente com o controle de pragas e doenças que venham a ser prejudiciais às plantas. Essas práticas, na maioria das vezes, causam alterações no ambiente do solo, causando mudanças na comunidade microbiana, conseqüentemente afetando a biodiversidade. Cada sistema de cultivo forma um agroecossistema específico, fazendo com que cada integrante do mesmo responda de uma forma diferente a uma determinada condição. Por exemplo, considerando uma determinada espécie e analisando o sistema de cultivo em que está inserida, ela pode ser beneficiada, ou prejudicada.

A comunidade biológica do solo é composta, em sua grande maioria, por micro-organismos, como fungos e bactérias, sendo que alguns apresentam patogenicidade, ou seja, são capazes de causar doenças em seus hospedeiros, e outros são antagonistas aos patogênicos. No entanto, a presença desses organismos está relacionada com as condições de habitat, que podem ser favoráveis aos patógenos e não aos antagonistas, ou vice-versa. Nesse contexto

deve-se conhecer os fatores individuais de cada sistema que possam afetar os organismos e as plantas cultivadas, pois todos os fatores interagem nos agroecossistemas.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a ecologia de fungos de solo, patogênicos ou não e antagonistas do gênero *Trichoderma* nos sistemas de cultivo orgânico, agroflorestal e convencional de *Citrus deliciosa* Tenore.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Identificar a diversidade fúngica presente no solo nos sistemas de cultivo.

Identificar a diversidade e quantidade dos patógenos radiculares e antagonistas presentes em cada sistema de cultivo nos verões e invernos de 2015 e 2016.

Avaliar as relações entre a comunidade fúngica e as propriedades químicas do solo.

Avaliar a patogenicidade do patógeno, com maior ocorrência em cada sistema, à cultura do citros.

Avaliar o biocontrole de isolados de *Trichoderma* spp. oriundos dos sistemas orgânicos, agroflorestal e convencional em relação ao patógeno radicular com maior ocorrência em cada sistema.

3. JUSTIFICATIVA

Na produção de citros, distintas são as práticas que podem ser utilizadas associadas ao sistema de cultivo adotado. Essas práticas podem causar alterações nos micro-organismos integrantes da microbiota do solo e, com isso, propiciar ou não a ocorrência de patógenos, ou também beneficiar a ocorrência de antagonistas a esses patógenos. São escassos os relatos na literatura quanto à ocorrência de

patógenos e antagonistas, em relação à produção de citros, em diferentes sistemas de cultivo. Nesse sentido, é importante o estudo da ecologia dos patógenos e antagonistas em sistemas de cultivo distintos, buscando sistemas alternativos de produção que causem menos impacto ao meio.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1 PRODUÇÃO E SISTEMAS DE CULTIVO DE CITROS

O Rio Grande do Sul apresenta um grande potencial para produção de citros por apresentar condições climáticas favoráveis para o desenvolvimento do fruto com características físico-químicas adequadas (SCHAFFER; DORNELLES, 2000). A área colhida com citros no estado é de 40.553 ha; a produção é dividida em laranjeiras (64%), tangerineiras (32%) e limoeiros (3,4%). O rendimento médio para a laranja, limão e tangerina é de 14.579, 12.275 e 12.216 kg ha⁻¹, respectivamente (IBGE, 2014).

O cultivo de citros concentra-se em pequenas propriedades na região da Depressão Central do estado, próximo dos rios Caí e Taquari (DORNELLES, 1991). As áreas variam de um a seis hectares, com exceção de pomares comerciais, os quais podem chegar até 400 ha (GRUPEX, 2005). Na região, os citros são cultivados sob distintos sistemas de produção, tais como: orgânico, convencional, produção integrada, agroflorestal, biodinâmico, natural, alternativo e sistemas mistos (PETRY et al., 2012). No Vale do Rio Caí, a principal atividade desenvolvida pelas unidades de produção agrícola é a citricultura, predominando o cultivo de tangerineiras, com a cultivar “Montenegrina” sendo a mais produzida (PANZENHAGEN et al., 2008), especialmente nos sistemas orgânico e convencional.

Os pomares em sistema de cultivo orgânico estão regidos pela Lei nº 10.831 (BRASIL, 2003), que considera também os cultivos biodinâmicos, ecológicos, natural, agroecológicos, regenerativos e outros que atendam aos princípios da lei e visem à sustentabilidade ecológica e econômica. Seguindo princípios do cultivo orgânico têm-se sistemas agroflorestais que são sistemas sustentáveis de uso da terra, nos quais espécies arbóreas são cultivadas com espécies de interesse agrícola, obtendo benefícios ecológicos e econômicos (KING; CHANDLER, 1978).

Os sistemas agroflorestais otimizam os efeitos benéficos das interações entre os componentes arbóreos e as culturas ou animais, diminuindo a necessidade de insumos externos e reduzindo os impactos ambientais negativos das práticas agrícolas, obtendo uma maior diversidade de produtos no sistema (GLIESSMAN, 2005; ALTIERI, 2002).

O sistema de cultivo convencional é baseado no uso de fertilizantes e agrotóxicos, sendo o mais usual e não possuindo regras definidas ou legislação (PETRY et al., 2012). Os alimentos produzidos por meio da agricultura convencional, muitas vezes, apresentam resíduos dos compostos químicos utilizados, sendo pela frequência na aplicação ou por não respeitar os prazos de carência recomendados (SANTOS; MONTEIRO, 2004).

A contaminação do solo e da água pode ser acentuada em áreas manejadas em sistema de preparo convencional, ou seja, em situações em que os solos são submetidos a preparos intensivos e manejados sem a presença de resíduos orgânicos na superfície. Nessas condições, o solo fica mais suscetível à degradação de sua estrutura e, conseqüentemente, à erosão e ao escoamento superficial (MERTEN; MINELLA, 2002). Nos sistemas convencionais, o uso de agrotóxicos vem sendo utilizado em grande escala, provocando diversos impactos sobre o meio e, com isso, muitos estão em transição para o orgânico, buscando uma produção mais sustentável. Na medida em que ocorre a diminuição gradativa ou eliminação do uso de agrotóxicos e a reciclagem dos nutrientes e da biomassa do sistema, a função e conformação dos agroecossistemas mudam, principalmente aspectos da estrutura básica do solo, como o conteúdo de matéria orgânica, a diversidade e atividade da biota do solo (GLIESSMAN, 2005).

O tipo de sistema de cultivo é determinante para o sucesso produtivo da cultura, pois cada solo possui suas características específicas, podendo-se mencionar a capacidade de supressividade a fitopatógenos que, é descrita em três situações em relação ao patógeno: não se estabelece; estabelece-se, mas não causa doença; ou estabelece-se e causa doença por algum período, mas sofre declínio com o tempo (BAKER; COOK, 1974). A capacidade de supressividade de solos a *Rhizoctonia solani*, com diferentes tipos de cobertura vegetal, é interferida pela prática da fumigação, devido ocorrer a eliminação da microbiota do solo e conseqüentemente diminuir a supressividade. Assim, concluíram que a atividade

microbiana do solo é importante para o manejo de doenças contribuindo para a supressividade dos solos (GHINI; ZARONI, 2001).

A qualidade química dos solos também é influenciada pelo tipo de sistema empregado. Pomares conduzidos em sistema orgânico normalmente apresentam pH mais elevado, o que é relatado por Sartori et al. (2004) quando compara sistemas orgânico e convencional de laranja. No sistema orgânico o pH foi superior a 7,0 e no convencional foi aproximadamente de 6,0. Além disso, a quantidade de matéria orgânica do solo (MOS) foi superior no sistema orgânico, proporcionando uma maior disponibilização de nutrientes de liberação lenta e a relação cálcio e magnésio (Ca/Mg) também foi superior devido aos altos teores de Ca presentes na adubação utilizada. Gonzatto (2009) quando comparou um sistema agroflorestal (SAF) e um em pleno sol (SOL), com laranja Valência, constatou que neste pH foi de, aproximadamente 5,9 e nesse foi em torno de 5,4, sendo possível a detecção de Al^{3+} na solução do solo.

A qualidade dos frutos é uma das características mais importantes para se ter uma aceitação no mercado consumidor e um dos fatores que contribuem para isso é o tipo de sistema utilizado na produção. A qualidade nutricional de limas ácidas (*Citrus latifolia* Tanaka, cv Tahiti) oriundas de sistemas orgânico biodinâmico e convencional apresentam poucas diferenças nutricionais. No entanto, as limas provenientes de sistema orgânico biodinâmico são mais benéficas à saúde humana, visto que são produzidas sem o uso de agrotóxicos (RANGEL et al., 2011).

4.2 DOENÇAS DA CULTURA DO CITROS

A produção brasileira de citros é afetada por inúmeras doenças que reduzem significativamente a produção, longevidade e a qualidade dos frutos. A manutenção e o estado fitossanitário requerem vigilância sistemática e efetiva, devendo-se fazer amostragens, inspeções semanais ou quinzenais nas plantas, identificando o problema logo no início para que o controle seja preventivo, diminuindo a incidência das doenças (MELO; ANDRADE, 2006).

As doenças cítricas são causadas por fungos, bactérias e vírus; entre as bacterioses encontram-se o Cancro Cítrico (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*); a Clorose Variegada do Citros (*Xylella fastidiosa* Wells) e o Greening-HLB

(*Candidatus Liberibacter americanus* e *Candidatus Liberibacter asiaticus*); entre as doenças fúngicas, o Estiolamento (*Rhizoctonia spp.* Kuhn; *Pythium spp.*; *Phytophthora spp.*), a Melanose (*Diaporthe citri*), a Verrugose (*Elsinoe spp.*), a Gomose (*Phytophthora spp.*), a Mancha Preta (*Guignardia citricarpa*), a Antracnose ou Podridão Floral do Citros (PFC) (*Colletotrichum spp.*), o Bolor Verde (*Penicillium digitatum*), a Podridão de Fusário (*Fusarium solani*); e entre as viroses tem-se a Tristeza e a Leprose (AZEVEDO, 2003; MELO; ANDRADE, 2006; TOFFANO, 2012).

Alguns dos agentes causais de doenças em citros vivem na microbiota do solo, pois ela é formada por fungos, bactérias, antinomicetos, algas e demais microorganismos que estão em contínua interação, fazendo com que se tenha condições de sinergismo, antagonismo, mutualismo e, na grande maioria, parasitismo (MICHEREFF et al., 2005).

4.2.1 Doenças radiculares dos citros

As espécies de citros são atacadas por patógenos radiculares que causam podridões de raízes e/ou tombamentos de plantas. Entre os agentes causais das doenças radiculares mais severas estão os fungos dos gêneros *Rhizoctonia spp.*, *Pythium spp.*, *Phytophthora spp.* e *Fusarium spp.* A Podridão Radicular ou Gomose, causada por *Phytophthora spp.*, pode provocar inúmeras perdas aos viveiros de diferentes regiões do país (AMORIM; MELO, 2002.). Muniz et al. (2004), avaliando a patogenicidade de espécies de *Phytophthora* em quatro cultivares de citros no estado de Alagoas, observaram que os isolados de *P. nicotianae* quando inoculados no colo da planta produziram lesões necróticas no caule e não causaram a morte após 90 dias. Oliveira (2008), quando realizou testes de patogenicidade com espécies do gênero *Phytophthora*, em frutos e plantas, observou que os isolados de *P. nicotianae* e *P. citrophthora* foram patogênicos; ambos os isolados desenvolveram sintomas de podridão de raízes e caule, murcha e, posteriormente, morte das plantas. Caixeta et al. (2013), quando avaliaram a diversidade de espécies do gênero *Phytophthora*, associada à Gomose em algumas regiões do estado do Paraná, confirmaram a presença das espécies *P. nicotianae* e *P. citrophthora*; nos testes de patogenicidade em mudas de limão cravo, também verificaram que ambas foram patogênicas.

Al Sadi et al. (2014), estudando patógenos associados à limeiras ácidas e doces encontraram 12 fungos patogênicos, sendo *Fusarium solani* o mais comum nas raízes que apresentavam algum sintoma de doença; em mudas jovens de viveiros, também verificaram a presença do gênero *Fusarium*. É constante a presença de fungos do complexo *F. solani* associados a raízes e solo rizosférico de plantas cítricas com e sem sintomas de morte súbita (PFENNING et al., 2006). Apesar da associação desse complexo fúngico às plantas com morte súbita, a doença ainda permanece sem agente causal específico. Porém a presença de fungos do gênero *Fusarium* podem agravar a doença, devido a produção de toxinas pelo fungo.

Nos Estados Unidos, fungos do gênero *Fusarium* spp. têm sido associados à podridão seca do citros. O fungo é encontrado em plantas que estão com algum estresse: lesões radiculares por insetos, roedores e capinas manuais, saturação do solo, devido ao excesso de irrigação ou também quando as plantas estão debilitadas pelo ataque de outras doenças, como gomose (*Phytophthora* spp.) e tristeza do citros. No entanto, o *Fusarium* é considerado um patógeno fraco à cultura do citros (ADESEMOYE et al., 2011). Todavia, fungos do gênero *Fusarium* podem produzir um grande número de pigmentos do tipo naftoquinonas, que são tóxicos para as plantas. Os pigmentos são chamados de naftarazinas e podem apresentar um papel importante na sintomatologia de plantas cítricas infectadas por *Fusarium* spp. (KERN, 1978; BAKER et al., 1981; NEMEC; BAKER, 1992; RENSBURG et al., 2001).

4.2.2 Doenças e os sistemas de cultivo

As doenças que afetam as culturas agrícolas podem estar relacionadas com o tipo de sistema de produção empregado. Em tomateiro, o sistema biodinâmico apresentou menor severidade de doenças do que o sistema orgânico de produção (CASA, 2008). Já em sistemas orgânico e biodinâmico de cultivo de batata doce o sistema orgânico foi energeticamente mais eficiente (RAMOS, 2004). Com isso, pode-se concluir que os sistemas respondem de formas diferentes. Segundo Torsvik e Ovreas (2002), a variação da diversidade microbiana ao longo das estações do ano não é bem compreendida, já que em cada estação pode ocorrer uma

comunidade microbiana dominante. Com isso, a capacidade de supressividade do solo aos patógenos pode ser distinta durante um ano de cultivo.

Tomita (2009) estudou o sistema de produção orgânico e convencional para a cultura da *Gypsophila* e observou que o manejo orgânico proporciona a ação da biodiversidade do solo, promovendo a supressividade edafológica na presença de patógenos causadores de podridões radiculares ou do colo. Concluiu, também, que sistemas de manejo convencional tornam-se, ao longo dos anos e dos ciclos de produção, propícios à manutenção de inóculos e disseminação de doenças no sistema produtivo.

Gonzatto (2009) avaliando dois sistemas de cultivo de citros, um com manejo agroflorestal e outro em pleno sol com a cultivar de laranja Valência, relata que a incidência e a severidade da doença Pinta Preta nos frutos, causada pelo fungo *Guignardia citricarpa*, foi influenciada pelo sistema de manejo, sendo que no SAF a incidência foi de 75,4% e no SOL foi 91,2%. Consequentemente, a severidade também foi inferior no SAF, devido à atenuação da radiação solar nos frutos, proporcionada pelo sombreamento das espécies arbóreas que integram o sistema. Por outro lado, o SAF pode ter favorecido a queda prematura de frutos jovens, causado pelo fungo *Colletotrichum acutatum* Simmonds.

O tipo de sistema empregado na produção de qualquer frutífera pode influenciar na ocorrência de doenças pós-colheita. Diferentes alternativas para o controle de antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, em pós-colheita, em frutos de goiaba oriundos de sistemas convencional e orgânico apresentam tratamentos com efeitos diferentes na expressão das características físico-químicas dos frutos considerando o sistema de cultivo (FERRAZ, 2010).

4.3 ANTAGONISTAS DO GÊNERO *Trichoderma* spp. NO CONTROLE DE PATÓGENOS

As populações de micro-organismos interagem com outras populações e representam a diversidade química e molecular da natureza, constituindo a base dos processos ecológicos, como os ciclos biogeoquímicos, além de manterem relações vitais entre si e com os organismos “superiores” (ZILLI et al., 2003). Solos ricos em matéria orgânica apresentam maior capacidade de suportar a atividade microbiana,

pois podem ser fonte de micronutrientes, hormônios, aminoácidos para a microbiota do solo, que produz compostos químicos capazes de induzir a resistência do hospedeiro ou controlar diretamente os patógenos (MICHEREFF, 2005).

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, podendo viver saprofiticamente ou parasitando outros fungos (ROIGER et al., 1991).

Liu et al. (2008) estudaram a diversidade do gênero *Trichoderma* em solos com distintos sistemas de produção e concluíram que solos com práticas orgânicas foram mais eficazes na supressão da doença causada por *Sclerotium rolfsii* do que solos submetidos a práticas convencionais. Relatam, também, que essa capacidade de supressão está mais relacionada com a grande diversidade microbiana do solo que ao número de propágulos de *Trichoderma* spp. dos diferentes sistemas de cultivo. Isolados de *Trichoderma* provenientes de compostos orgânicos com diferentes estágios de maturação, são uma fonte de *Trichoderma* spp., pois os mesmos apresentaram potencial de biocontrole a *Sclerotium rolfsii* (BRITO et al., 2010).

5. HIPÓTESE

As hipóteses do trabalho são:

Existe diferença na ocorrência de espécies de patógenos radiculares e antagonistas nos diferentes sistemas de cultivo.

Patógenos em sistemas de produção orgânico e agroflorestal podem apresentar menor patogenicidade ao citros.

Fungos antagonistas do gênero *Trichoderma* encontrados em sistemas orgânico e agroflorestal apresentam maior capacidade de biocontrole.

6. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado em duas etapas, sendo realizadas coletas a campo e, posteriormente, ensaios experimentais no Laboratório de Fitopatologia, do

Departamento de Defesa Fitossanitária (DF), da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

6.1 DESCRIÇÃO E LOCAL DA ÁREA DE ESTUDO

O estudo foi conduzido em área que envolve duas propriedades agrícolas com pomares de citros, uma com um pomar orgânico biodinâmico e um sistema agroflorestal biodinâmico, e outra com sistema convencional, sendo três áreas de estudo: citros em sistema convencional (CONV), citros em sistema orgânico (ORG) e citros em sistema agroflorestal (SAF), sendo o tamanho de cada área de 11.200, 11.700 e 11.600m² respectivamente.

As áreas estão localizadas no município de Montenegro, região fisiográfica da Depressão Central, RS (29°41'20''S e 51°27'39''W). De acordo com Köppen (1948), o clima da região é Cfa – subtropical úmido de verão quente. Os meses mais quentes são janeiro e fevereiro, com temperatura média próxima de 25 °C e os meses mais frios são junho e julho, com temperatura média de 9 °C. A precipitação média anual é de 1.440 mm (BERGAMASCHI; GUADAGNIN, 1990; BERGAMASCHI et al., 2003). O solo da região é classificado como ARGISSOLO Vermelho-Amarelo Distrófico arênico (PVAd) (EMBRAPA, 2006; STRECK et al., 2008), pertencente à unidade de mapeamento Bom Retiro (BRASIL, 1973). É um solo oriundo de arenito (Formação Botucatu), ocupando um relevo ondulado a forte ondulado, com vegetação original da região composta, predominantemente, por Mata Atlântica e Pampa (PIETRZACKA, 2009).

No ano de 1990, realizou-se o preparo convencional do solo, com utilização de arado e grade para mobilização, e o plantio manual das mudas de bergamota (*Citrus deliciosa* T., da variedade Montenegrina, enxertadas sobre *Poncirus trifoliata*). As plantas foram alocadas num espaçamento entre plantas de 3 m entre plantas na linha e 6,5 m nas entrelinhas. No ano de 1998, iniciou-se a substituição do manejo CONV para o manejo orgânico, com aplicações de compostos provenientes da Ecocitrus (Cooperativa dos Citricultores do Vale do Caí). O manejo das plantas espontâneas é realizado com roçadas nas entrelinhas e sob a copa das plantas.

O sistema de cultivo agroflorestal possui manejo igual ao da área orgânica, e está instalado desde 1998, quando foram consorciadas espécies nativas florestais e algumas exóticas*: Açoita-cavalo (*Luehea grandiflora*), Acácia Negra* (*Acacia mearnsi*), Angico Vermelho (*Parapiptenia rígida* (Benth.) Brenan), Araucária (*Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze), Butiá (*Butiaeriospatha* (Mart. ExDrude) Becc.), Cabreúva (*Myroxylon peruiferum*), Canafístula (*Peltophorum dubium*), Canela (*Cinnamomum zeylanicum*), Canjerana (*Cabralea canjerana*), Cedro Rosa *Cedrela odorata*), Cinamomo* (*Melia azedarach*), Ipê Roxo (*Handroanthus impetiginosus*), Jacarandá-mimoso (*Jacaranda mimosifolia*, D. Don), Jerivá (*Syagrus romanzoffiana*), Louro-pardo (*Cordia trichotoma*), Mamica de Cadela (*Zanthoxylum rhoifolium*) e Timbaúva (*Enterolobium contorstisiliquum*). Essas árvores foram plantadas na linha das tangerineiras em espaçamento médio de 15 m, pois não seguem um padrão de distâncias entre árvores, mas sim, obedecem a sua estrutura de dossel.

No sistema de cultivo convencional, instalado há aproximadamente 27 anos (1990), foi realizado o preparo convencional do solo, com utilização de arado e grade para mobilização do solo para o plantio manual de mudas de tangerineiras (*Citrus deliciosa*), das variedades Montenegrina, Okitsu, Morgote e Caí, enxertadas sobre *Poncirus trifoliata*. As plantas foram alocadas num espaçamento entre plantas de 3 m entre plantas na linha e 6,5 m nas entrelinhas. Há o uso intensivo de fertilizantes minerais, herbicidas em toda a área duas vezes ao ano, na primavera e no verão, e demais agrotóxicos.

6.2 COLETA DAS AMOSTRAS

A amostragem de solo foi realizada com auxílio de uma pá de corte. Foram coletados nove pontos amostrais aleatoriamente, dentro de um grid amostral com 1020 m² (Figura 1), sendo que os vértices do grid foram georeferenciados (Tabela 1) utilizando o software CR-Campeiro (GIOTTO; ROBAINA, 2007), nos três sistemas de cultivo (totalizando 27 pontos amostrais). Coletou-se aproximadamente 400 gramas de solo por ponto amostral, na camada de 0,05m, totalizando nove amostras por sistema de cultivo em quatro épocas ao longo de dois anos, verão de 2015, inverno de 2015, verão de 2016 e inverno de 2016. Logo após a coleta as amostras

foram acondicionadas em sacos plásticos e encaminhadas para o Laboratório de Fitopatologia da (UFSM).

Figura 1 – Espacialização do *grid* amostral em sistemas orgânico, agroflorestal e convencional de *Citrus deliciosa* Tenore, na cidade de Montenegro/RS.



Fonte: Google maps

A: citros convencional (CONV); B: citros agroflorestal (SAF); C: citros orgânico (ORG).

Tabela 1 – Pontos de coleta georeferenciados, nos sistemas cultivo orgânico, agroflorestal e convencional de *Citrus deliciosa* Tenore, na cidade de Montenegro/RS.

Sistema	Ponto ¹	UTM ²	X ³	Y ⁴
CONV ⁵	1	22 J	453891,76 m E	6721097,21 m S
	2	22 J	453923,63 m E	6721086,17 m S
	3	22 J	453938,05 m E	6721115,76 m S
	4	22 J	453906,77 m E	6721128,70 m S
SAF ⁶	5	22 J	454402,38 m E	6721798,13 m S
	6	22 J	454429,48 m E	6721817,28 m S
	7	22 J	454408,66 m E	6721849,54 m S
	8	22 J	454380,44 m E	6721830,19 m S
ORG ⁷	9	22 J	454249,73 m E	6721829,45 m S
	10	22 J	454283,40 m E	6721823,47 m S
	11	22 J	454280,82 m E	6721861,32 m S
	12	22 J	454247,16 m E	6721857,50 m S

Fonte: Autor

¹Vertices do Grid amostral; ²Sistema de coordenadas, com base no plano cartesiano; ³Eixo X; ⁴Eixo Y;

⁵Convencional; ⁶Agroflorestal; ⁷Orgânico.

6.3 QUANTIFICAÇÃO DE UNIDADE FORMADORAS DE COLÔNIAS (UFCs) DE *Fusarium* spp., *Trichoderma* spp. E OUTROS

Com as amostras de solo coletadas (Item 6.2), foram realizadas diluições seriais. Foram utilizadas 10 g de solo de cada tratamento, diluídos em 90 mL de água destilada e esterilizada acrescida de duas gotas do emulsificante Tween 80®. A suspensão foi agitada por três minutos, em agitador magnético e, dessa suspensão, foram realizadas diluições seriais até a diluição 10^{-3} . Da última diluição, foi retirada uma alíquota de $0,5 \text{ mL}^{-1}$ e colocada em quatro placas de Petri contendo meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA) acrescido com 0,05 mg de estreptomicina/100 mL de meio. As placas foram colocadas em geladeira, do tipo BOD, por sete dias com temperatura de $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$) e fotoperíodo de 12 h. Em seguida foi contabilizado o número de UFCs dos fungos presentes em cada placa. Esses foram classificados quanto ao gênero através de observações das placas em microscópio estereoscópico e confecção de lâminas para observação em microscópio ótico, com base na bibliografia especializada (BARNETT; HUNTER, 1999). Embora tenha sido acrescentado antibiótico ao meio de cultura, houve crescimento de bactérias e, por isso, realizou-se a contagem da população microbiológica (bactérias, leveduras e fungos). A quantidade de UFCs de cada gênero fúngico foi determinado pelas equações (CARTER, 1993):

$$FD = Di \times Ds \times Q, \text{ em que:} \quad (1)$$

FD: Fator de diluição

Di: Diluição inicial

Ds: Diluição subsequente

Q: Quantidade colocada na placa

$$UFCs = 1/FD \times n, \text{ em que:} \quad (2)$$

UFCs: Unidades Formadoras de Colônias por grama de solo

FD: Fator de Diluição

n: Número de colônias na placa

O delineamento experimental utilizado para a quantificação de UFCs foi o inteiramente casualizado com quatro repetições por sistema de cultivo. Dois isolados de *Fusarium* spp. com colorações diferentes, e um isolado de *Trichoderma* spp.,

encontrados nas diluições seriais de solo em cada época de coleta de cada sistema, foram cultivados em meio de cultura BDA, após sete dias de crescimento, os isolados foram purificados conforme a técnica de cultura monospórica (FERNANDES, 1993), para manutenção das características patogênicas e antagônicas dos fungos para posterior utilização, resultando em 24 isolados de *Fusarium* spp. e 12 isolados de *Trichoderma* spp.

6.4 DETERMINAÇÕES DE DENSIDADE DO SOLO, MACROPOROSIDADE, MICROPOROSIDADE, POROSIDADE TOTAL E ANÁLISE QUÍMICA DO SOLO

No momento em que foram coletadas as amostras para a quantificação das UFCs, foram realizadas coletas para determinação das características físicas e químicas do solo. Para as determinações físicas do solo, a coleta das amostras foi realizada em dezembro de 2014, sendo coletadas amostras com auxílio de anéis volumétricos de aço, na profundidade de 0-5 cm, em nove pontos por sistema gerando nove repetições. Determinaram-se as seguintes características físicas: densidade do solo (Ds), macroporosidade (Ma), microporosidade (Mi) e porosidade total (PT), utilizando o método da mesa de tensão (EMBRAPA, 1979). As análises foram feitas no Laboratório de Física do Solo da Universidade Federal de Santa Maria. Essas determinações foram realizadas uma única vez durante a execução do trabalho, devido às propriedades físicas não sofrerem alterações num curto intervalo de tempo.

A amostragem de solo para análise química foram realizadas na camada de 0-5 cm, em quatro pontos de coleta nas quatro épocas, totalizando 12 amostras por coleta. Cada amostra continha aproximadamente 400 gramas de solo e após identificação, foi encaminhada ao Laboratório de Análises de Solos da UFSM para determinação do pH em água, P e K (Mehlich 1), Ca, Mg e Al trocáveis e teor de matéria orgânica, segundo metodologia proposta por Tedesco et al. (1995) e H + Al por meio da relação matemática com TSM-tampão Santa Maria (TOLEDO et al., 2012).

6.5 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DOS ISOLADOS DE *Fusarium* spp. E *Trichoderma* spp.

6.5.1 Taxa de crescimento micelial

A taxa de crescimento micelial (TCM) foi determinada a partir da transferência de discos de meio BDA, com 7 mm de diâmetro para os isolados de *Fusarium* spp. e 5 mm para os isolados de *Trichoderma* spp., obtidos de colônias com sete dias de crescimento, para outras placas com meio BDA e mantidas a 25 ± 2 °C, com 12 h de fotoperíodo. Para isso, foram utilizadas cinco repetições, sendo cada uma constituída por uma placa. O crescimento micelial de cada isolado foi avaliado aos sete dias de incubação, pela mensuração da média do diâmetro da colônia em dois sentidos diametralmente opostos.

6.5.2 Esporulação

A esporulação foi avaliada aos seis dias de incubação para os isolados de *Trichoderma* spp. e aos dez dias para isolados de *Fusarium* spp., pela adição de 10 mL de água destilada estéril esterilizada, acrescida de uma gota do emulsificante Tween 80®, após procedeu-se a raspagem das colônias e peneiramento em camada dupla de gaze. A suspensão foi agitada por 30 segundos e, com auxílio de uma micropipeta, retirou-se 1 mL e espalhou-se na câmara de Neubauer, para a posterior estimativa da concentração de conídios (conídios.mL⁻¹).

6.5.3 Pigmentação das colônias

Foram observadas a coloração e a pigmentação das colônias e do micélio aéreo com o auxílio da Carta de Cores de Munsell (Munsell Soil Color Chart).

6.5.4 Caracterização dos conídios

Os isolados de *Fusarium* spp. foram repicados para meio de cultura folha-de-cravo-ágar (CLA) (NELSON, 1983), com o propósito de verificar a forma de macroconídios, formação de microconídios e presença ou ausência de clamidósporos (LESLIE ;SUMMERELL, 2006). Para cada isolado, foram medidos 28 conídios. Também foi contado o número de septos dos macroconídios. A largura e o

comprimento foram medidos em microscópio ótico, com micrômetro acoplado, na magnitude de 40 x (LESLIE ; SUMMERELL, 2006). Para os isolados de *Trichoderma* spp. foram medidos a largura e comprimento ou diâmetro de 28 conídios, de acordo com o formato do mesmo.

6.5.5 Identificação molecular de *Fusarium* spp.e *Trichoderma* spp.

Os isolados de *Fusarium* spp. e *Trichoderma* spp. foram submetidos à técnica de análise multivariada para agrupamento. Após escolheu-se um isolado, para representar cada grupo formado, e encaminhou-se à identificação molecular. Foram identificados os seguintes isolados: ISF2, IICF1, IIIOF2 e IVSF1 do gênero *Fusarium* e IST1, IIOT1 e IVCT1 do gênero *Trichoderma*.

Essa etapa foi executada no Laboratório de Bioquímica Fitopatológica do Instituto Biológico de São Paulo, onde foi realizada a extração de DNA, conforme método CTAB, descrito por Doyle e Doyle (1991). As amostras de DNA genômico extraídas foram submetidas à Reação da Polimerase em Cadeia (PCR), para a amplificação da região TEF-1 α do rDNA em *Fusarium* e *Trichoderma*. Para a amplificação, foi utilizado um fragmento com aproximadamente 1100pb do gene codificador do fator de alongação alfa com o par de oligonucleotídeos iniciadores EF1-T (ATGGGTAAGGARGACAAGAC) e EF1-1567R (ACHGTRCCRATACCACCRATCTT) (REHNER; BUCKLEY, 2005).

A reação foi realizada com 30 ng de DNA, tampão 10X, 2,5 μ M de cada dNTP, 20 nM de MgCl₂, 25 pmoles da cada um dos oligonucleotídeos iniciadores, cinco unidades da enzima Taq polimerase e água ultrapura para completar o volume da reação. As reações foram realizadas em termociclador MJ Research, INC. PTC – 100MT, sob as seguintes condições térmicas: 94 °C por 2 min, 30 ciclos de 94 °C por 45 s, 55 °C por 30 s, 72 °C por 35 s e 72 °C por 10 min. Ao final da reação, os produtos da pCR foram mantidos a 4 °C. Um controle negativo sem DNA foi incluído nas amplificações do PCR. Os fragmentos amplificados e o controle foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,2 %, em tampão TBE 1X (10,8 g de tris base, 5,5 g de ácido bórico, 4 mL de EDTA a 0,5 M e 4 mL de água destilada), contendo brometo de etídio, e visualizado sob luz ultravioleta.

Os produtos da PCR foram purificados com PEG 8000 a 13% e os fragmentos gênicos foram sequenciados nas direções senso e antisenso em sequenciador

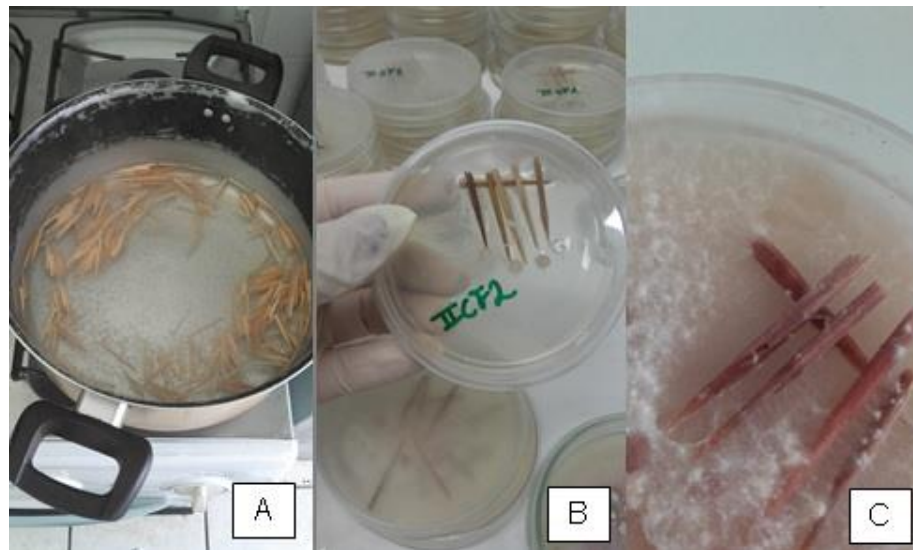
MEGA BACE 500 (Amersham). Os fragmentos sequenciados foram analisados através do programa BioEdit (HALL, 1999). As sequências de nucleotídeos obtidas foram comparadas com as já existentes no *GenBank* do National Center for Biotechnological Information – NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (ALTSCHUL et al., 1990). As sequências do *GenBank* que apresentaram os maiores escores foram selecionadas e alinhadas, juntamente com as sequências obtidas no sequenciamento pelo algoritmo ClustalW (THOMPSON et al., 1994). A análise filogenética foi conduzida utilizando o método estatístico “*Neighbour-joining*” com 1000 replicatas, pelo programa MEGA versão 4 (TAMURA et al., 2007). O modelo utilizado foi escolhido de acordo com o selecionado pelo programa disponível online, FindModel, que estabelece o melhor modelo após fornecimento de um arquivo com as sequências escolhidas alinhadas através do BioEdit (HALL, 1999) ou outro programa escolhido. A similaridade das sequências de nucleotídeos entre os isolados foi calculada através do procedimento Basic Local Alignment Search Tool - BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

6.6 PATOGENICIDADE IN VIVO DE *Fusarium* spp. EM MUDAS DE *Citrus deliciosa* TENORE, CV. MONTENEGRINA

6.6.1 Produção de inóculo

Para a produção do inóculo foram utilizados palitos-de-dente, cortados a $\frac{1}{4}$ do seu tamanho normal, afilados em uma das pontas, fervidos em água destilada por três vezes, com sucessivas trocas de água, visando extrair possíveis substâncias tóxicas. Após a fervura, os palitos foram colocados em placas de Petri e autoclavados por 20 minutos. Em seguida, para cada isolado de *Fusarium* spp., foram repicados discos de micélio em duas placas de Petri contendo meio BDA e palitos. As placas foram colocadas em câmara climatizada, com temperatura de 25 °C (± 2 °C) e fotoperíodo de 12 h, por oito dias (Figura 2) (GASPERI, 2000; SIVIEIRO et al. 2002;).

Figura 2 – Produção de inóculo de *Fusarium* spp. pelo método do palito.



Fonte: Autor

A: Fervura dos palitos em água destilada; B: Repicagem de discos de micélio com palitos; C: Palitos inoculados com *Fusarium* spp. após oito dias.

6.6.2 Inoculação de *Fusarium* spp. nas mudas

A inoculação consistiu na inserção do palito infestado pelo patógeno no colo das mudas de bergamota Montenegrina (Figura 3). No ponto de inoculação, os tecidos foram previamente perfurados individualmente, com o auxílio de um bisturi estéril, para facilitar a entrada do palito infestado, após a introdução do palito o restante do mesmo foi cortado e o ferimento foi fechado com insufilme (GASPERI, 2000; SIVIEIRO et al., 2002).

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com 125 mudas de bergamota Montenegrina, de aproximadamente 12 meses. Cada muda representou uma unidade experimental, sendo inoculadas cinco mudas com o mesmo isolado, totalizando cinco repetições por isolado de *Fusarium* spp. Cinco mudas foram introduzidas com um palito, devidamente esterilizado, sem inóculo, constituindo o tratamento testemunha.

Figura 3 – Inoculação de palitos infectados com *Fusarium* spp. em mudas de *Citrus deliciosa* Tenore, cv. Montenegrina.



Fonte: Autor

A: Palito com micélio de *Fusarium* spp.; B: Palito introduzido no colo da muda; C: Inoculação do palito realizada.

6.7 CONFRONTO DIRETO DE ISOLADOS DE *Trichoderma* spp. E *Fusarium* spp.

Realizou-se o teste de confrontação direta ou cultura pareada (DENNIS; WEBSTER, 1971), com os isolados obtidos dos sistemas de cultivo de bergamota nas quatro épocas. A ação antagônica de *Trichoderma* spp. contra *Fusarium* spp. foi testada *in vitro*, sendo que cada isolado de *Fusarium* sp. foi confrontado com o isolado de *Trichoderma* sp. oriundo do mesmo sistema de cultivo e época de coleta (Tabela 2). Um disco de meio de cultura BDA de 7 mm de diâmetro contendo micélio de *Fusarium* sp. foi transferido para placas de Petri (8,0 cm de diâmetro), também contendo meio BDA com 0,05 mg de estreptomicina/100 mL, a 0,3 cm da borda da placa. Em seguida, as placas foram incubadas durante 48 h a 25 °C (± 2 °C) com fotoperíodo de 12 h. Após esse período, um disco de meio de cultura BDA com 7 mm de diâmetro, contendo micélio de *Trichoderma* sp., foi transferido para a posição oposta ao disco de micélio de *Fusarium* sp. nas placas de Petri. As placas foram novamente incubadas a 25 °C (± 2 °C) com fotoperíodo de 12 h.

Aos sete dias após a repicagem dos isolados de *Trichoderma* spp., foram feitas medições do diâmetro das colônias do patógeno, com o auxílio de um paquímetro digital, e agrupamento dos isolados do antagonista em classes, segundo a escala proposta por Bell et al. (1982), atribuindo-se notas que variaram de 1 a 5, sendo:

1. Antagonista cresce e ocupa toda a placa.
2. Antagonista cresce e ocupa uma parte do patógeno (2/3 da placa).
3. Antagonista e patógeno crescem até a metade da placa (nenhum domina o outro).
4. Patógeno cresce e ocupa uma parte do antagonista (2/3 da placa).
5. Patógeno cresce e ocupa toda placa.

A avaliação da classe de antagonismo foi realizada novamente aos 13 dias após a repicagem dos isolados de *Trichoderma* spp. O ensaio foi realizado no delineamento experimental inteiramente casualizado com cinco repetições por tratamento.

Tabela 2 – Isolados de *Fusarium* spp. e *Trichoderma* spp., oriundos de sistemas orgânico, agroflorestal e convencional de *Citrus deliciosa* Tenore, utilizados no teste de confronto direto.

ÉPOCA	SISTEMA	<i>Fusarium</i> spp.	<i>Trichoderma</i> spp.
Verão/2015	ORG	I OF1	I OT1
		I OF2	
	CONV	I CF1	I CT1
		I CF2	
	SAF	I SF1	I ST1
		I SF2	
Inverno/2015	ORG	II OF1	II OT1
		II OF2	
	CONV	II CF1	II CT1
		II CF2	
	SAF	II SF1	II ST1
		II SF2	
Verão/2016	ORG	III OF1	III OT1
		III OF2	
	CONV	III CF1	III CT1
		III CF2	
	SAF	III SF1	III ST1
		III SF2	
Inverno/2016	ORG	IV OF1	IV OT1
		IV OF2	
	CONV	IV CF1	IV CT1
		IV CF2	
	SAF	IV SF1	IV ST1
		IV SF2	

Fonte: Autor

6.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados de quantificação da população microbiana, de *Penicillium* spp., *Fusarium* spp., *Trichoderma* spp. e outros (fungos e bactérias), e das variáveis físicas e químicas do solo foram checados quanto ao atendimento dos pressupostos do modelo matemático e após os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste de médias de Scott Knott, com 5% de significância, através do software estatístico SISVAR versão 2010 5.3 (FERREIRA, 2010).

Os dados de quantificação da população microbiana, de *Penicillium* spp., *Fusarium* spp., *Trichoderma* spp. e outros (fungos e bactérias) e das análises químicas foram relacionados utilizando correlações de Pearson através do software estatístico Genes versão 2015 5.0 (CRUZ, 2013).

Os resultados obtidos pelo teste de confrontação *in vitro* de isolados de *Trichoderma* spp. com isolados de *Fusarium* spp. foram checados quanto ao atendimento dos pressupostos do modelo matemático e após os dados foram submetidos à análise de variância e teste de médias de Scott Knott, com 5% de significância, através do software SISVAR versão 2010 5.3 (FERREIRA, 2010).

Os dados quantitativos de caracterização morfológica dos isolados de *Fusarium* spp. e *Trichoderma* spp. foram submetidos à técnica de análise multivariada para agrupamento dos isolados de *Fusarium* spp. e *Trichoderma* spp. pelo programa GENES 2015 5.0. A matriz de distância de Mahalanobis foi calculada como medida de dissimilaridade e utilizada para agrupamento dos isolados pelo método “Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean” – UPGMA, pelo programa GENES 2015 5.0 (CRUZ, 2013).

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 DIVERSIDADE E QUANTIFICAÇÃO DE FUNGOS DE SOLO

A diversidade de fungos encontrados no solo, não variou entre os sistemas estudados. Ao longo das coletas realizadas, no período que compreendeu o início do ano de 2015, com estação quente, até o final da estação fria de 2016, a diversidade manteve-se a mesma. Os gêneros fúngicos encontrados (Tabela 3), são fungos que sobrevivem no solo, ou em restos culturais, e que podem apresentar

patogenicidade a diferentes culturas agrícolas. Além dos fungos foram encontradas bactérias e leveduras. Os resultados obtidos corroboram com Moreira e Siqueira (2002), que descrevem que os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Lecanicillium*, *Alternaria*, *Mucor* e *Pythium* são fungos comumente isolados no solo. A maioria dos gêneros encontrados também foram identificados em sistemas de manejo agroflorestal, com manejo orgânico e convencional, de *Citrus sinensis* (PRADE et al., 2007). Além disso, a presença de uma comunidade microbiana do solo maior e diversificada é fundamental para a produtividade de qualquer agroecossistema (ARAÚJO et al., 2012).

Tabela 3 – Gêneros fúngicos presentes em solos de sistemas orgânico, agroflorestal e convencional de *Citrus deliciosa* Tenore, cv. Montenegrina.

Gêneros	
<i>Aspergillus</i> spp.	<i>Pythium</i> spp.
<i>Cladosporium</i> spp.	<i>Rhizoctonia</i> spp.
<i>Colletotrichum</i> spp.	<i>Rizophus</i> spp.
<i>Epicoccum</i> spp.	<i>Sclaropsis</i> spp.
<i>Fusarium</i> spp.	<i>Trichoderma</i> spp.
<i>Gonotobotrys</i> spp.	<i>Verticillium</i> spp.
<i>Mucor</i> spp.	<i>Penicillium</i> spp.

Fonte: Autor

A quantificação de UFCs permitiu conhecer a população dos gêneros *Fusarium* spp., *Penicillium* spp., *Trichoderma* spp., e demais fungos, leveduras e bactérias, nos diferentes sistemas estudados e nas diferentes épocas (Tabelas 4, 5, 6 e 7). A população de *Penicillium* spp. diferiu estatisticamente entre os sistemas Orgânico, Convencional e Agroflorestal, na primeira época de coleta, com os sistemas Orgânico e Convencional apresentando população inferior ao do Agroflorestal. Nas demais épocas não houve diferença estatística entre as populações de cada sistema (Tabela 4).

O gênero *Penicillium* spp. é considerado um patógeno oportunista e as diferentes espécies do gênero estão amplamente distribuídas na natureza, o que é comprovado por vários autores. De acordo com Monteiro (2012), quando identificou fungos dos gêneros *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp., em solos do cerrado, verificou, em todas as amostras coletadas, a presença dos dois gêneros. No

entanto, fungos do gênero *Penicillium* spp. foram encontrados de maneira predominante. Também Coutinho et al. (2010), isolaram fungos de solo, oriundos de produção de *Cucumis melo*, no Vale do São Francisco, e obtiveram 78 espécies, sendo os gêneros mais representativos *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp.

Tabela 4 – População de *Penicillium* spp. em sistemas de cultivo orgânico, agroflorestal e convencional de *Citrus deliciosa* Tenore, cv. Montenegrina.

Sistemas	UFCs g ⁻¹ de solo			
	Épocas			
	Verão/2015 ⁴	Inverno/2015 ⁵	Verão/2016 ⁶	Inverno/2016 ⁷
ORG ¹	6,04E+03 B* b	6,49E+01 B a	1,01E+03 B a	4,68E+04 A a
CONV ²	3,45E+04 A b	5,43E+02 B a	5,35E+02 B a	2,59E+04 A a
SAF ³	6,72E+04 A a	9,77E+02 B a	1,69E+00 B a	2,58E+04 B a

Fonte: Autor

¹Orgânico; ²Convencional; ³Agroflorestal; ⁴janeiro de 2015; ⁵outubro de 2015; ⁶fevereiro de 2016; ⁷julho de 2016. *Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, maiúscula na linha e minúscula na coluna, pelo teste de Scott-Knott (P ≤ 0,05%).

A população de *Penicillium* spp. entre as épocas, dentro de cada sistema, diferiu estatisticamente (Tabela 4). No sistema orgânico, a população da época inverno/2016 foi superior às demais, sendo possível observar a infecção de *Penicillium* spp. em frutos, em pré-colheita (Figura 4.). Na citricultura, os fungos do gênero *Penicillium* spp. são responsáveis por doenças de pré-colheita e pós-colheita e isso ocorre devido à fácil disseminação dos esporos, pelo vento, causando alta incidência da doença (FISCHER; LOURENÇO; AMORIM, 2008). No sistema convencional, a população de *Penicillium* spp. apresentou diferença estatística entre as épocas de coleta, com as épocas verão/2015 e inverno/2016 diferindo das demais e apresentando populações superiores. No sistema agroflorestal, a época verão/2015 diferiu estatisticamente das demais, apresentando população superior. A variação da população de *Penicillium* spp. entre as estações, em cada sistema, pode estar relacionada com as condições climáticas e à forma de manuseio dos frutos durante a colheita (LARANJEIRA et al., 2002).

Figura 4 – Frutos infestados por *Penicillium* spp. em sistema Orgânico de *Citrus deliciosa* Tenore.



Fonte: Autor

A população de *Fusarium* spp. diferiu estatisticamente entre os sistemas de cultivo, na época verão/2015, com o sistema agroflorestal apresentando população superior, seguido do convencional e do orgânico. A maior população de *Fusarium* spp. no SAF pode estar relacionada às propriedades químicas do solo, visto que, apresentou níveis de P superiores aos demais sistemas (Tabela 10) e de acordo com Silva et al. (2011), o P é um nutriente essencial para o crescimento e a esporulação do fungo. O aumento da concentração de P favorece o patógeno (ELOY et al., 2004)

Na época inverno/2015 os sistemas agroflorestal e convencional, não diferiram entre si, mas diferiram estatisticamente do sistema orgânico, que apresentou população inferior. Essa redução pode ter sido favorecida pelas condições climáticas, uma vez que, no inverno tem-se temperaturas mais baixas, com períodos de luminosidade reduzidos, aumento da umidade e das chuvas. Santos et al. (2014) em seu estudo, sobre o efeito da sazonalidade na comunidade de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs), constataram que a diversificação da comunidade de FMAs foi influenciada pelas condições climáticas das estações do ano, sendo que a precipitação pluviométrica teve maior relevância.

A população do sistema convencional, na época verão/2016, diferiu estatisticamente dos demais, apresentando população inferior (Tabela 5). As práticas de manejo, empregadas no sistema CONV, podem ter contribuído para a redução da população, em comparação aos demais sistemas, visto que são

realizadas duas aplicações de herbicidas na entre linha, uma na primavera e outra no verão. De acordo com Milanesi (2012), a população de *Fusarium* spp. presente em solo, sofre influência do herbicida, uma vez que, após a aplicação do herbicida glifosato, obteve uma redução significativa na quantidade de UFCs. Na época inverno/2016 a população não diferiu estatisticamente entre os sistemas.

A quantidade de UFCs, entre as épocas de cada sistema, diferiu estatisticamente para os sistemas ORG e SAF (Tabela 5). No sistema ORG a população foi menor no verão e inverno de 2015 e isso pode ter sido favorecido pelo excesso de chuvas daquele ano, dado que, o ano de 2015 teve forte presença do fenômeno El Niño (PEGORIM, 2015), que é caracterizado pelo aquecimento acima do normal das águas do oceano Pacífico Equatorial e essa elevação da temperatura interfere no vento e em diversos níveis da atmosfera, causando alterações na precipitação e na temperatura em distintas regiões do planeta, em diferentes épocas do ano. Na região sul do Brasil, em anos com El Niño intenso, o inverno é mais quente e ocorre o aumento das chuvas na primavera com temperaturas mais elevadas (GRIMM, 2015). O excesso de chuvas, favorecido pelo fenômeno El Niño, pode ter proporcionado uma maior percolação da água no solo e ter alterado a quantidade *Fusarium* spp. na superfície do solo no sistema ORG, visto que a percolação da água pode alterar a distribuição de fitopatógenos e outros micro-organismos em diferentes profundidades do solo (GRAY; POPE, 1986). Muller-Dombois (1983) explica que o fato de ocorrer diferenças na comunidade fúngica do solo em diferentes estações do ano está associada com o heterotrofismo, a amplitude de dispersão e a capacidade de sobreviver às condições adversas.

No sistema SAF, ocorreu diferença estatística na população de *Fusarium* spp. entre as épocas avaliadas. A época Verão/2015 apresentou população superior (Tabela 5) às demais, podendo estar relacionada ao efeito das condições climáticas referentes àquele ano, em que se teve uma maior quantidade de chuvas. As avaliações realizadas no sistema CONV não diferiram estatisticamente entre si, mas é possível observar uma redução na população de *Fusarium* spp. a partir da primeira época (Verão/2015).

Tabela 5 – População de *Fusarium* spp. em sistemas de cultivo orgânico, agroflorestal e convencional de *Citrus deliciosa* Tenore, cv. Montenegrina.

Sistemas	UFCs g ⁻¹ de solo			
	Épocas			
	Verão/2015 ⁴	Inverno/2015 ⁵	Verão/2016 ⁶	Inverno/2016 ⁷
ORG ¹	5,66E+02 B* c	6,25E+01 B b	4,42E+03 A a	2,96E+03 A a
CONV ²	2,30E+03 A b	1,53E+03 A a	1,23E+03 A b	1,75E+03 A a
SAF ³	5,01E+03 A a	2,36E+03 B a	3,62E+03 B a	3,10E+03 B a

Fonte: Autor

¹Orgânico; ²Convencional; ³Agroflorestal; ⁴janeiro de 2015; ⁵outubro de 2015; ⁶fevereiro de 2016; ⁷julho de 2016. *Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, maiúscula na linha e minúscula na coluna, pelo teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05\%$).

Fungos do gênero *Trichoderma* são considerados cosmopolitas e são facilmente encontrados em todos os tipos de solo e podem preferir regiões mais quentes (HARAN et al., 1996; DOMSCH et al. 1993). No presente estudo, a população de *Trichoderma* spp. diferiu estatisticamente entre os sistemas, na maioria das épocas avaliadas (Tabela 6). No verão/2015, o SAF apresentou população superior aos demais sistemas e isso também ocorreu na época seguinte (inverno/2015), mas com uma população menor, diferindo estatisticamente entre as épocas, em cada sistema. A maior população, de *Trichoderma* spp. no SAF, pode ter sido favorecida pela diversidade de espécies arbóreas que integram o sistema e pelas condições climáticas da época. De acordo com Silva, Sena e Silva Junior (2007), a biomassa microbiana do solo, em SAF, é maior do que em sistemas convencionais, devido à presença de espécies diferentes de plantas que favorecem o aumento da biomassa microbiana, pelo aporte de resíduos orgânicos, e pelo efeito rizosférico. No entanto Ribeiro (2014), em seu trabalho, afirma que os atributos microbiológicos do solo foram influenciados, mais fortemente, pela época do ano do que pelos sistemas agroflorestais. Essa afirmação é mais condizente com a variação da população entre os sistemas nas diferentes épocas, visto que no verão/2016 não houve diferença estatística entre as populações dos sistemas e, no inverno/2016, as populações dos sistemas ORG e CONV foram superiores ao SAF, diferindo estatisticamente do mesmo. O mesmo é relatado por Prade et al. (2007), quando trabalharam com sistemas de produção de citros, em manejo agroecológico e

convencional, e encontraram diferenças no número de isolados fúngicos de cada sistema, sendo que, essa variação ocorreu em função da estação do ano.

A variação da população de *Trichoderma*, entre os sistemas, em cada época avaliada, também pode ter sido influenciada pela presença de outros micro-organismos na comunidade biológica do solo. Esses microrganismos (fungos, bactérias, leveduras) produzem metabólitos secundários, que podem ser prejudiciais a *Trichoderma* spp., causando alterações no seu crescimento e desenvolvimento.

Tabela 6 – População de *Trichoderma* spp. em sistemas de cultivo orgânico, agroflorestal e convencional de *Citrus deliciosa* Tenore, cv. Montenegrina.

Sistemas	UFCs g ⁻¹ de solo			
	Épocas			
	Verão/2015 ⁴	Inverno/2015 ⁵	Verão/2016 ⁶	Inverno/2016 ⁷
ORG ¹	1,70E+03 A* b	2,57E+02 B b	1,44E+02 B a	2,23E+03 A a
CONV ²	1,05E+03 B b	8,05E+01 C b	2,28E+02 C a	2,47E+03 A a
SAF ³	2,68E+03 A a	1,34E+03 B a	7,57E+02 B a	6,56E+02 B b

Fonte: Autor

¹Orgânico; ²Convencional; ³Agroflorestal; ⁴janeiro de 2015; ⁵outubro de 2015; ⁶fevereiro de 2016; ⁷julho de 2016. *Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, maiúscula na linha e minúscula na coluna, pelo teste de Scott-Knott (P ≤ 0,05%).

A comunidade biológica do solo é bem diversificada e sua população fúngica pode variar de 10⁴ a 10⁶ UFCs/g⁻¹ solo (BRANDÃO, 1992). Considerando essa grande diversidade é possível observar, que a população de bactérias, leveduras e outros fungos manteve-se constante nos sistemas ORG, CONV e SAF, não diferindo estatisticamente em nenhuma das épocas avaliadas (Tabela 7). A população do SAF foi a única a apresentar diferença estatística, entre as épocas avaliadas, com as populações das épocas inverno/2015 e verão/2016 sendo inferiores as demais. Velmourougane (2016) não encontrou diferenças significativas entre a população de fungos e actinomicetos em sistemas orgânico e convencional de *Coffea arabica* L. e isso pode estar relacionado às propriedades químicas do solo, uma vez que solos com pH mais próximos da neutralidade e altos teores de matéria orgânica podem reduzir os efeitos tóxicos dos metais que se encontram na solução do solo, deixando-os menos disponíveis para os micro-organismos (BANU et al., 2004).

Tabela 7 – População de bactérias, leveduras e demais fungos em sistemas de cultivo orgânico, agroflorestal e convencional de *Citrus deliciosa* Tenore, cv. Montenegrina.

Sistemas	UFCs g ⁻¹ de solo			
	Épocas			
	Verão/2015 ⁴	Inverno/2015 ⁵	Verão/2016 ⁶	Inverno/2016 ⁷
ORG ¹	3,20E+04 A* a	4,20E+03 A a	1,62E+04 A a	1,98E+04 A a
CONV ²	2,44E+04 A a	7,17E+03 A a	1,38E+04 A a	2,74E+04 A a
SAF ³	4,24E+04 A a	1,87E+04 B a	9,18E+03 B a	3,99E+04 A a

Fonte: Autor

¹Orgânico; ²Convencional; ³Agroflorestal; ⁴janeiro de 2015; ⁵outubro de 2015; ⁶fevereiro de 2016; ⁷julho de 2016. *Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, maiúscula na linha e minúscula na coluna, pelo teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05\%$).

7.2 PROPRIEDADES FÍSICAS E QUÍMICAS DO SOLO NOS SISTEMAS DE CULTIVO

O município de Montenegro tem solos caracterizados como Argissolos Vermelhos Distróficos arênicos, originados de arenito (Formação Botucatu), com relevo ondulado a forte ondulado (STRECK et al., 2008). Os sistemas de produção estudados apresentaram altos teores de areia e conseqüentemente baixos teores de silte e argila. Esses teores diferem entre os sistemas, sendo que o CONV apresentou maior teor de areia (89,9%), diferindo estatisticamente dos demais. Os teores de silte também apresentaram diferença estatística. Com o sistema SAF apresentando maior teor (7,9%), seguido do ORG e do CONV. Os teores de argila não diferiram entre os sistemas (Tabela 8.). Com base nessas informações o solo foi enquadrado como um solo de textura arenosa, sendo que, solos com essa textura apresentam menor capacidade de retenção de água, devido ao menor teor de argila.

Mota et al. (2007) estudaram as propriedades físicas de três tipos de solo com cultivo de melão e observaram que o solo caracterizado como Argissolo Vermelho Distrófico arênico foi o que apresentou menor capacidade de retenção de água, devido aos baixos teores de argila em sua composição. A capacidade de retenção de água é um fator, muito importante, para o bom desenvolvimento dos cultivos agrícolas, pois pode favorecer a ocorrência de déficit hídrico, quando não se tem a distribuição normal das chuvas, fazendo com que as plantas fiquem debilitadas e

propensas ao ataque de patógenos. No entanto, essa capacidade de retenção de água pode ser melhorada a longo prazo, com a incorporação de matéria orgânica no solo e uso de técnicas conservacionistas, como cobertura morta, reduzindo as perdas de água para a atmosfera (NEGREIROS et al., 2001; BORGES et al., 2014). Pilon (2017) quando avaliou a capacidade de retenção de água, nos mesmos sistemas do presente estudo, observou que os sistemas ORG e SAF apresentaram maior capacidade de retenção de água, em diferentes potenciais matriciais. Essa maior capacidade pode ser resultado dos altos teores de MO encontrados nos sistemas (Tabelas 10, 11, 12 e 13), visto que Silva et al. (2005), observaram que as variações entre as curvas de retenção de água em diferentes potenciais matriciais estão relacionadas com a composição do solo, como MO e argila.

Tabela 8 – Composição granulométrica do solo: teores de areia, silte e argila em sistemas de cultivo orgânico, agroflorestal e convencional de *Citrus deliciosa* Tenore, cv. Montenegrina, na camada de 0-5cm de profundidade.

Sistema	% Areia	% Silte	% Argila
ORG ¹	85,1 b*	6,2 b	8,7 a
CONV ²	89,9 a	2,7 c	7,3 a
SAF ³	84,1 b	7,9 a	8,1 a

Fonte: Autor

¹Orgânico; ²Convencional; ³Agroflorestal; *Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05\%$).

Os componentes orgânicos e minerais do solo e a proporção existente entre eles, vão influenciar diretamente as propriedades físicas, como: densidade do solo (Ds), porosidade total (PT), microporosidade (Mi) e macroporosidade (Ma). Nos sistemas estudados, o sistema CONV apresentou Ds superior aos sistemas ORG e SAF (Tabela 9). Os resultados obtidos corroboram com os de Palacios (2010), quando estudou as propriedades físicas de solo cultivado com erva-mate em diferentes sistemas e observou que o sistema arborizado com espécies nativas, com maior incremento de MO, apresentou menor Ds.

Tabela 9 – Propriedades físicas do solo: densidade do solo, porosidade total, microporosidade e macroporosidade, em sistemas de cultivo orgânico, agroflorestal e convencional de *Citrus deliciosa* Tenore, cv. Montenegrina, na camada de 0-05cm de profundidade.

Sistema	Mg m ⁻³	m ³ m ⁻³		
	Ds ⁴	PT ⁵	Mi ⁶	Ma ⁷
ORG ¹	0,97 b*	0,62 a	0,35 b	0,27 a
CONV ²	1,40 a	0,47 b	0,26 c	0,20 c
SAF ³	0,95 b	0,64 a	0,40 a	0,23 b

Fonte: Autor

¹Orgânico; ²Convencional; ³Agroflorestal; ⁴Densidade do solo; ⁵Porosidade total; ⁶Microporosidade; ⁷Macroporosidade; *Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05\%$).

Santos (2013), quando estudou sistemas de produção de citros, com diferentes tipos de manejo da cobertura do solo, na entrelinha, verificou que o tipo de manejo empregado influencia a Ds do solo em diferentes profundidades e isso pode comprometer o bom desenvolvimento radicular e conseqüentemente a produção das bergamoteiras. Os limites desejáveis para uma boa produção de citros em solos arenosos devem variar entre 1,25 a 1,8766 e de 1,00 a 1,25 Mg m⁻³ para solos argilosos, nos primeiros 0,30 m de profundidade (DURIGAN; TIMOSSO, 2002). No entanto, os resultados obtidos no presente trabalho foram inferiores, com exceção do CONV, que apresentou valor de 1,40 Mg m⁻³. A menor Ds no SAF pode ter sido favorecida pela diversidade de espécies arbóreas. Segundo Aguiar (2008), Carvalho et al. (2004), Mendonça et al. (2010) e Pilon et al., (2013) sistemas perenes consorciados com árvores (SAFs) apresentam menores valores de densidade do solo indicando o bom potencial desses sistemas em melhorar as condições físicas dos solos. O teor de MO orgânica nos sistemas ORG e SAF é considerado alto e isso pode ter favorecido a redução da Ds. Já no CONV, o teor de MO é considerado baixo, a Ds foi superior, no entanto não apresenta restrição ao desenvolvimento radicular do citros.

A porosidade do solo é determinada pela forma como as partículas estão arrançadas no solo. Quando essas partículas estão em íntimo contato, tem-se a predominância de sólidos na amostra de solo e a porosidade total é baixa, mas quando as partículas estão arrançadas na forma de agregados a porosidade é alta. Solos com densidades maiores tendem a apresentar uma menor porosidade, e isso

foi constatado no presente estudo, onde os sistemas ORG e SAF apresentaram porosidade superior, diferindo estatisticamente do CONV (Tabela 8) (RIBEIRO et al. 2007). Embora, o sistema CONV, tenha apresentado valor inferior de PT, ele também é considerado adequado para o crescimento e desenvolvimento radicular de plantas cítricas. De acordo com Demattê e Vitti (1992); Reichardt e Timm (2004) e Libardi (2005) o limite de PT satisfatório ao desenvolvimento de plantas cítricas varia de 0,40 a 0,55 m³ m⁻³.

A microporosidade em todos os sistemas diferiu estatisticamente, com o SAF sendo superior, seguido do ORG e do CONV. Os resultados são considerados altos e isso é um fator positivo, tendo em vista que, a cultura do citros apresenta bom desenvolvimento radicular com valores de microporosidade em torno de 0,36 m³ m⁻³ (Tabela 9). Os bons resultados encontrados no presente trabalho estão relacionados com a MO e as raízes das plantas de cobertura, que estão presentes nas camadas superficiais do solo, promovendo uma boa estruturação do mesmo, devido à formação de agregados que facilitam a aeração do solo e a distribuição da água (SANTOS, 2013).

Nas tabelas 10, 11, 12 e 13 são apresentadas algumas propriedades químicas do solo, dos três sistemas em cada época de avaliação. Devido essas propriedades não apresentarem variações significativas ao longo do período de avaliação, calculou-se a média das quatro épocas, a fim de caracterizar quimicamente o solo de cada sistema (Tabela 14.).

Tabela 10 – Propriedades químicas do solo, em sistemas de cultivo orgânico, agroflorestal e convencional de *Citrus deliciosa* Tenore, cv. Montenegrina, no verão de 2015.

Sistema	pH	cmolc/dm ³			%	mg dm ³	
		Ca	Mg	Al ³⁺	MO	K	P
ORG	6,69 a	2,17 b	0,88 a	0,90 a	5,55 a	91 a	153,03 a
CONV	5,33 b	0,42 c	0,38 c	0,67 a	1,46 b	85 a	63,26 b
SAF	6,61 a	2,73 a	0,70 b	0,83 a	6,05 a	151 a	133,62 a

Fonte: Autor

¹Orgânico; ²Convencional; ³Agroflorestal. *Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott (P ≤ 0,05%).

Tabela 11 – Propriedades químicas do solo, em sistemas de cultivo orgânico, agroflorestal e convencional de *Citrus deliciosa* Tenore, cv. Montenegrina, no inverno de 2015.

Sistema	pH	cmolc/dm ³			%	mg dm ³	
		Ca	Mg	H+Al	MO	K	P
ORG	6,20 a	3,43 b	0,90 a	0,12 b	4,03 a	58,65 b	90,27 b
CONV	5,69 b	0,91 c	0,35 c	0,12 2	1,54 b	35,19 b	53,34 b
SAF	6,51 a	4,91 a	0,66 b	0,16 a	5,21 a	97,75 a	169,23 a

Fonte: Autor

¹Orgânico; ²Convencional; ³Agroflorestal. *Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05\%$).

Tabela 12 – Propriedades químicas de solo, em sistemas de cultivo orgânico, agroflorestal e convencional de *Citrus deliciosa* Tenore, cv. Montenegrina, no verão de 2016.

Sistema	pH	cmolc/dm ³			%	mg dm ³	
		Ca	Mg	H+Al	MO	K	P
ORG	6,65 a	22,52 a	1,87 b	1,77 a	9,27 a	129,03 a	307,97 a
CONV	6,30 a	5,15 b	1,61 b	1,60 a	2,80 b	156,40 a	168,32 b
SAF	6,82 a	18,37 a	2,26 a	1,55 a	7,95 a	152,49 a	154,00 b

Fonte: Autor

¹Orgânico; ²Convencional; ³Agroflorestal. *Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05\%$).

Tabela 13 – Propriedades químicas de solo, em sistemas de cultivo orgânico, agroflorestal e convencional de *Citrus deliciosa* Tenore, cv. Montenegrina, no inverno de 2016.

Sistema	pH	cmolc/dm ³			%	mg dm ³	
		Ca	Mg	H+Al	MO	K	P
ORG	6,62 a	4,37 a	0,82 a	0,14 a	8,83 a	46,92 a	182,43 a
CONV	5,63 c	1,04 b	0,56 a	0,13 a	2,96 b	35,19 a	77,34 c
SAF	5,99 b	4,34 a	0,70 a	0,14 a	7,77 a	62,56 a	129,93 b

Fonte: Autor

¹Orgânico; ²Convencional; ³Agroflorestal. *Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05\%$).

Na tabela 14, é possível observar que as propriedades químicas dos sistemas ORG e SAF não diferiram estatisticamente entre elas, mas ambas diferiram do sistema CONV, o qual apresentou valores menores. Os sistemas ORG e SAF apresentam pH superior ao valor de referência para a cultura (pH de referência 6,0). Já o sistema CONV apresenta pH 5,66, o que é considerado inferior ao

recomendado para cultura, mas não é limitante para a produtividade, pois somente pHs abaixo de 5,5 podem apresentar toxidez às plantas, devido à presença do Al trocável (SILVA et al., 2016). O pH do solo influencia o desenvolvimento da comunidade microbológica, quanto maior o valor do pH, maior a população de bactérias, seguida da população de fungos (MELZ; TIAGO, 2009). Sanomiya e Nahas (2003) relatam que a população de bactérias é mais sensível a elevação do pH do solo, quando comparada à população fúngica.

Os teores de Ca e Mg são classificados quanto a sua disponibilidade no solo. Os sistemas ORG e SAF apresentaram teores de 8,39 e 7,25 cmolc dm^{-3} , respectivamente e são classificados como altos. Já o sistema CONV apresentou teor de 1,685 cmolc dm^{-3} sendo classificado como baixo. Os teores de Mg para os sistemas ORG e SAF foram de 1,13 e 1,03 cmolc dm^{-3} , respectivamente, sendo classificados como médios e o CONV apresentou teor de 0,72 cmolc dm^{-3} , com classificação baixa (Tabela 14) (SILVA et al., 2016).

Nos sistemas ORG e SAF, os teores de MO foram elevados, diferindo estatisticamente do sistema CONV. Os valores encontrados foram: 6,91, 6,65 e 2,17%, respectivamente. A classificação do teor de MO nos sistemas ORG e SAF foi alta e no CONV baixa (SILVA et al., 2016). Canali et al. (2004), em seus estudos também encontraram diferenças significativas no teor de matéria orgânica do solo, em pomares de laranja com manejo orgânico e convencional, sendo que, o com manejo orgânico apresentou maior teor de carbono orgânico total no solo.

A $\text{CTC}_{\text{pH}7,0}$ é importante para a caracterização do solo e o seu enquadramento em classes é utilizado para a interpretação dos teores de K no solo. No presente estudo, a $\text{CTC}_{\text{pH}7,0}$ dos sistemas ORG e SAF foi classificada como média e do CONV como baixa. Com base nessas informações, a disponibilidade de K no solo do sistema ORG, foi classificado, como médio, do SAF como alto, e do CONV como médio, (Tabela 14). O K é importante para a formação de frutos de boa qualidade, pois quando ocorre a sua deficiência em pomares cítricos, os frutos são pequenos com casca fina, podendo ocorrer sua queda, já as folhas podem apresentar aspecto encurvado com coloração bronzeada (MALAVOLTA et al., 1997).

Os teores de P para os sistemas ORG, SAF e CONV foram 179,55, 141,74 e 88,78 mg dm^{-3} , respectivamente. Com base na classe do teor de argila, a disponibilidade de P nos sistemas ORG e SAF foi considerada muito alta e no CONV foi alta. A absorção de fósforo pelas raízes das plantas é favorecida pela atividade

de fungos micorrízicos, cuja ausência pode limitar a absorção do nutriente, sendo que em viveiros de citros, onde o solo foi esterilizado tem se observado baixa absorção do nutriente. A falta acentuada de P causa perda do brilho com bronzeamento das folhas, redução do tamanho e aparência seca nas extremidades e bordas das folhas, podendo haver queda anormal, gerando galhos desfolhados (RODRIGUEZ, 1991). De acordo com Eloy et al. (2004) e Silva et al. (2011) o fósforo é um nutriente essencial para o crescimento e esporulação de fungos de solo e pode favorecer patógenos como *Fusarium* spp.

Na tabela 15, são apresentadas as correlações de Pearson, entre as variáveis de características químicas e a comunidade fúngica do solo, nos sistemas estudados. As variáveis apresentaram coeficientes positivos e negativos, porém nem todos foram significativos. A tabela é composta pelas correlações totais, na diagonal superior, considerando-se o efeito dos tratamentos (diferentes sistemas e as épocas), e na diagonal inferior são as correlações residuais, desprezando-se o efeito dos tratamentos. Com base nessas informações, é possível afirmar que as variáveis sofrem efeito do tratamento, visto que, a maioria das correlações significativas ocorrem na diagonal superior da tabela. As correlações residuais significativas ocorrem, na maioria, entre as propriedades químicas, em função das mesmas se correlacionarem independentemente do tipo de manejo empregado.

A análise de correlação revelou que, dentre os maiores coeficientes encontrados, destacam-se aqueles que explicam a relação linear entre as propriedades químicas do solo, como MO e pH, índice SMP e H+ Al, a CTC ef. e os macronutrientes (Mg, Ca, K e P) (Tabela 15). É característico das propriedades químicas do solo a ocorrência de correlações, tanto positivas quanto negativas. Isso ocorre porque existe uma dependência/influência entre essas propriedades, que é observada quando o efeito de tratamento é retirado, pois ainda existem correlações residuais significativas entre elas. No entanto, os coeficientes das correlações são menores. Montezano et al. (2006), em seus estudos, observaram correlações significativas entre propriedades químicas do solo, sendo elas: medidas de acidez do solo (pH e H + Al), teor de MO com a soma de bases (SB), a CTC e a saturação por bases (V%). Também observaram correlações negativas entre micronutrientes com a acidez potencial, a CTC e o teor de MO.

As variáveis fúngicas apresentaram coeficientes de correlações negativos com as propriedades químicas do solo, com exceção do *Fusarium* spp. que teve um

coeficiente significativo positivo de 0,35, quando correlacionado com a variável P (Tabela 15). Essa correlação significativa é observada nas correlações totais, mostrando que fungos do gênero *Fusarium* são favorecidos por ambientes com maior disponibilidade do macronutriente P. É possível verificar correlações positivas entre as variáveis fúngicas. Os coeficientes para *Fusarium* spp., *Trichoderma* spp. e Outros quando correlacionados com *Penicillium* spp. foram: 0,51, 0,65 e 0,68, respectivamente. No entanto, quando o efeito do tratamento é desconsiderado, essa correlação deixa de acontecer, com exceção da variável *Trichoderma* que quando correlacionada com *Penicillium* apresenta coeficiente de -0,45. Essa correlação negativa pode estar relacionada com a característica antagônica do gênero *Trichoderma*, que pode atuar sobre a população de *Penicillium* spp. do solo, fazendo com que sua população seja menor.

Tabela 14 – Médias das propriedades químicas do solo, em sistemas de cultivo orgânico, agroflorestal e convencional de *Citrus deliciosa* Tenore, cv. Montenegrina, no período de 2015/16.

SISTEMAS	pH	SMP	cmolc dm ⁻³			Saturação de bases	% MO	P-Mehlich	K (Mg dm ⁻³)	CTC ef	CTC pH 7.0
			Ca	Mg	H + Al						
ORG ¹	6,61 a	7,02 a	8,39 a	1,13 a	1,41 a	81,21 a	6,91 a	179,55 a	80,77 b	9,73 a	11,08 a
CONV ²	5,66 b	6,94 a	1,85 b	0,72 a	1,42 a	55,69 b	2,17 b	88,78 b	78,96 b	2,77 b	4,27 b
SAF ³	6,50 a	6,85 a	7,25 a	1,03 a	1,61 a	74,32 a	6,65 a	141,74 a	122,54 a	8,60 a	10,31 a

Fonte: Autor

¹Orgânico; ²Convencional; ³Agroflorestal. *Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott (P ≤ 0,05%)

Tabela 15 – Coeficientes de correlação de Pearson na diagonal superior e na diagonal inferior (sem efeito de tratamentos) entre as propriedades químicas e fungos de solo em sistemas de cultivo orgânico, agroflorestal e convencional de *Citrus deliciosa* Tenore, cv. Montenegrina.

Caracteres	pH	SMP	Ca	Mg	MO	H+Al	K	P	CTC ef	CTC pH7.0	V%	Pe.	Fus.	Tr.	Out.
pH	1	-0,09	0,51*	0,60*	0,77*	0,13	0,33*	0,67*	0,54*	0,53*	0,86*	-0,27	-0,19	-0,32*	-0,41*
SMP	0,25	1	-0,10	-0,14	0,07	-0,98*	-0,45*	-0,32*	-0,12	-0,14	-0,04	0,11	-0,26	0,44*	0,08
Ca	0,29*	0,13	1	0,86*	0,69*	0,03	0,66*	0,78*	1,00*	1,00*	0,77*	-0,42*	0,06	-0,48*	-0,37*
Mg	-0,05	-0,03	0,48*	1	0,53*	0,04	0,80*	0,65*	0,89*	0,88*	0,84*	-0,50*	-0,01	-0,51*	-0,41*
MO	0,04	0,05	0,54*	0,33*	1	-0,05	0,28*	0,71*	0,68*	0,68*	0,75*	-0,07	-0,13	-0,12	-0,19
H+Al	-0,22	-0,98	-0,10	0,04	-0,05	1	0,31*	0,31*	0,04	0,06	0,03	-0,04	0,27	-0,45*	-0,11
K	-0,01	-0,14	0,04	0,12	0,34*	0,13	1	0,54*	0,69*	0,70*	0,57*	-0,39*	0,13	-0,29*	-0,31*
P	-0,19	0,06	-0,02	0,20	0,31*	-0,09	0,17	1	0,78*	0,79*	0,77*	-0,23	0,35*	-0,46*	-0,39*
CTC ef	0,27	0,11	0,99*	0,55*	0,55*	-0,08	0,08	-0,02	1	1,00*	0,78*	-0,41*	0,07	-0,48*	-0,35*
CTC pH7.0	0,22	-0,09	0,97*	0,55*	0,54*	0,12	0,10	-0,01	0,98*	1	0,78*	-0,43*	0,06	-0,50*	-0,38*
SB	0,11	0,46	0,42*	0,58*	0,26	-0,43*	0,06	0,05	0,45*	0,36*	1	-0,52*	-0,19	-0,53*	-0,62*
Pe.	0,20	-0,09	0,14	0,15	-0,13	0,04	0,01	-0,02	0,15	0,15	0,19	1	0,51*	0,65*	0,68*
Fus.	-0,02	0,02	0,05	-0,04	-0,01	-0,02	-0,07	-0,06	0,06	0,04	0,04	0,18	1	0,12	0,31*
Tr.	-0,10	-0,15	-0,07	-0,16	-0,12	0,19	0,07	-0,16	-0,08	-0,04	-0,38*	-0,45*	-0,20	1	0,65*
Out.	-0,02	-0,24	0,00	0,06	0,02	0,25	0,00	0,02	0,02	0,06	-0,15	-0,03	0,42	0,08	1

Fonte: Autor

pH: em água; SMP: índice SMP; Ca: cálcio; Mg: Magnésio; MO: matéria orgânica; H+Al: acidez potencial; K: potássio; P: fósforo; CTC ef.: capacidade de troca de cátions efetiva; CTC pH 7,0: capacidade de troca de cátions a pH 7,0; V%: Saturação por bases; Pe.: *Penicillium*; Fus.: *Fusarium*; Tr.: *Trichoderma*; Out.: Outros (fungos, bactérias e leveduras). *Significativo a 5% de probabilidade (p<0,05)

7.3 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE *Fusarium* spp.

Na tabela 16, são apresentados os dados da caracterização morfológica, dos isolados de *Fusarium* spp. que foram utilizados para separar os mesmos em grupos. São encontradas diferenças entre os isolados. O isolado IICF1 apresentou maior esporulação, ficando com média de $77,410^6$ esporos/mL, e o isolado com menor esporulação foi o IIICF1, com média de $2,7510^6$ esporos/mL. De acordo com Monteiro et al. (2004), a esporulação é uma estratégia de sobrevivência e disseminação do fungo, visto que, quanto maior for a esporulação maior é a distribuição de esporos no ambiente.

O crescimento micelial dos isolados também apresenta comportamento diferente, sendo que o isolado IIISF1 apresentou a menor taxa de crescimento micelial (T.C.M), ficando com média de $8,74 \text{ mm dia}^{-1}$, e o isolado IISF1 apresentou maior T.C.M, com média de $11,96 \text{ mm dia}^{-1}$. Mezzomo (2017) obteve T.C.M para isolados de *Fusarium* spp. que variaram de $4,85$ a $11,15 \text{ mm dia}^{-1}$. Kuhnem Júnior et al. (2013) registraram médias menores de T.C.M para isolados de *F. verticillioides* ($2,73 \text{ mm/dia}$), e Walker et al. (2016) encontrou T.C.M de $11,2 \text{ mm dia}^{-1}$ para *F. verticillioides*. Existe uma grande variação na T.C.M entre as espécies de *Fusarium* spp. e também entre isolados da mesma espécie, e isso pode ser influência do meio de cultura e pH, temperatura, fotoperíodo, entre outros fatores, porém no presente trabalho não houve variação, na TCM dos isolados.

O formato dos microconídios em todos os isolados foi a forma oval (Figura 5, A), com exceção do isolado IIISF2, que não apresentou a formação de microconídios. Mezzomo (2017) encontrou diferentes formatos de microconídios, em diferentes isolados de *F. solani*, com a maioria do formato oval, e para um isolado de *F. oxysporum* o formato observado foi reniforme. O formato do microconídio é utilizado em chaves de identificação morfológica, mas não deve ser considerado de forma isolada para a determinação de uma espécie e, sim, juntamente com demais características morfológicas, a fim de evitar equívoco. Isso se torna mais evidente no presente trabalho, na qual foi observado, apenas o formato oval. Outros trabalhos como de Milanesi (2012) e Walker et al. (2016), em relação a micronídios, observaram apenas a presença ou ausência dos mesmos.

A formação de esporodóquio, em meio CLA, foi observada em alguns isolados. A presença ou ausência é muito importante para a diferenciação entre espécies de

Fusarium spp. visto que, algumas espécies não são capazes de formar essa estrutura (Figura 5, B). O esporodóquio pode apresentar diferentes colorações, variando da cor creme a marrom alaranjado. No presente trabalho, a coloração observada foi creme. No esporodóquio tem-se a formação de macroconídios, os quais apresentaram diferentes tamanhos e número de septos (Figura 5, D). O comprimento variou de 14,83 a 41,96 μm , nos isolados IIICF2 e IIISF1, respectivamente. A largura variou de 2,97 a 5,74 μm (IVOF1 e IOF2). Nos isolados que não apresentaram esporodóquio, os macroconídios foram observados no micélio aéreo, porém os isolados IICF2, IISF2, IVOF2 e IVSF1 não formaram macroconídios, somente microconídios. O número de septos, na maioria dos isolados, foi de três a quatro, os isolados IIOF2 e IIISF1 foram os que apresentam maior número de septos, no isolado IIOF2 foram observados macroconídios com até seis septos e no IIISF1 observou-se até cinco septos (Tabela 16). Carnielli (2014) identificou seus isolados de *F. guttiforme* e, entre as características observadas dos macroconídios foi o comprimento, variando de 35 a 71 μm , largura de 3 a 4 μm e 3 a 5 septos.

As pigmentações das colônias foram bem diversificadas, variando de amarelo a castanho avermelhado, já o micélio aéreo, apresentou coloração branca, em todos os isolados (Figuras 6, 7, 8 e 9). Segundo Walker et al. (2016) em seus estudos com *F. acuminatum* e *F. verticillioides*, em meio de cultura BDA, verificaram coloração vermelho-carmim, variando entre tons de amarelo bronzeado e marrom, para o primeiro, e para o segundo a coloração violácea. Milanesi (2012) encontrou colorações bem diversificadas para isolados de *Fusarium* spp., sendo algumas delas: roxo amarronzado, creme claro, lilás claro, ocre bronzeado, violeta escuro, vermelho carmim e avermelhado claro. Algumas espécies, embora diferentes, apresentaram colorações iguais, como por exemplo: *F. proliferatum* e *F. solani* com coloração creme claro, o mesmo ocorrendo com isolados da mesma espécie em que apresentam diferentes pigmentações da colônia. Kataki (2014) observou em mais de 100 isolados de *F. oxysporum* a coloração rosa e também maioria dos seus esporos em forma de microconídios.

Todos os isolados apresentaram a formação de clamidósporos, com exceção do isolado IOF2, em meio CLA. Bueno et al. (2007) observaram a presença de clamidósporos em *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* e relatam que o número médio de clamidósporos foi maior quando teve o aumento do teor de umidade no solo,

explicando a oscilação do número de sobrevivente do fungo no campo. De acordo com Rios (2001), os clamidósporos são estruturas de resistência comuns em fungos do gênero *Fusarium*, principalmente *F. oxysporum* e *F. solani*. Contudo o período de sobrevivência no solo pode ser curto, mas alguns clamidósporos têm a capacidade de germinarem, estimulados por exsudatos ou resíduos, tanto de hospedeiros como de não hospedeiros, dando origem a novos clamidósporos, incrementando assim a população de propágulos. Mezzomo (2017) observou a presença de clamidósporos, na maioria dos isolados e, posteriormente, identificou alguns deles, com técnicas moleculares, sendo das espécies *F. oxysporum* e *F. solani*.

Após a caracterização morfológica dos 24 isolados, os dados relacionados à esporulação, crescimento micelial (diâmetro final da colônia, crescimento diário do diâmetro da colônia e crescimento micelial diário), comprimento e largura dos macroconídios e número de septos foram submetidos ao método de agrupamento UPGMA (“*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*”) e através do dendrograma gerado, os isolados foram agrupados pela similaridade entre as médias dos caracteres.

A proximidade entre a matriz de dissimilaridade Mahalanobis e a matriz cofenética, obtida para os níveis de distância entre cada amostra no gráfico, foi verificada através do coeficiente de correlação entre elas. Obteve-se uma correlação (índice cofenético) de 0,7834, mostrando uma boa representação da medida de dissimilaridade pelo dendrograma.

Tabela 16 – Características morfológicas de *Fusarium* spp. obtidos de sistemas de cultivo orgânico, agroflorestal e convencional de *Citrus deliciosa* Tenore, cv. Montenegrina.

(Continua)

Isolado	Esp. (.10 ⁶) ¹	T.C.M (mm dia ⁻¹)	Micro.* ²	Esporod. ⁴	Macroconídios ¹			Pigmentação ¹		Clamid. ^{2,3}
					comp(µm)	larg(µm)	Nº septos	Colônia	Mic. aéreo	
I OF1	6,16	10,89	Oval	-	24,80	14,82	2 ou 3	Vermelho pálido	Branco	+
I OF2	23,9	10,60	Oval	+	39,42	5,74	3 ou 4	Vermelho pálido	Branco	-
I CF1	3,25	11,44	Oval	-	19,77	3,13	1 ou 2	Rosa claro	Branco	+
I CF2	3,43	11,54	Oval	+	32,19	4,43	3 ou 4	Castanho avermelhado claro	Branco	+
I SF1	3,36	11,62	Oval	-	32,48	3,96	2 ou 3	Rosa	Branco	+
I SF2	4,13	11,37	Oval	-	31,50	4,07	2 ou 4	Castanho avermelhado claro	Branco	+
II OF1	24,4	10,09	Oval	+	38,45	5,00	3 ou 4	Marrom pálido	Branco	+
II OF2	21,4	10,58	Oval	+	30,77	4,66	3 ou 6	Marrom pálido	Branco	+
II CF1	77,4	8,75	Oval	+	28,89	4,19	3 ou 4	Vermelho escuro	Branco	+
II CF2	6,26	9,77	Oval	-		Ausente		Cinza rosado	Branco	+
II SF1	4,76	11,96	Oval	-	21,08	3,39	2 ou 3	Cinza rosado	Branco	+
II SF2	8,13	11,60	Oval	-		Ausente		Rosa claro	Branco	+
III OF1	15,4	10,56	Oval	-	24,65	3,37	3	Vermelho fraco	Branco	+
III OF2	25,3	9,26	Oval	+	38,54	4,67	3 u 4	Amarelo claro	Branco	+
III CF1	2,75	10,54	Oval	-	16,73	2,93	1 ou 2	Rosa claro	Branco	+
III CF2	14,9	10,72	Oval	-	14,83	2,70	1 ou 2	Castanho avermelhado claro	Branco	+
III SF1	13,3	8,74	Oval	+	41,96	5,09	3 ou 5	Amarelo	Branco	+
III SF2	6,87	10,17	Ausente	+	40,17	4,90	3 ou 4	Vermelho amarelado	Branco	+
IV OF1	2,22	10,71	Oval	-	17,49	2,97	1 ou 2	Branco rosado	Branco	+

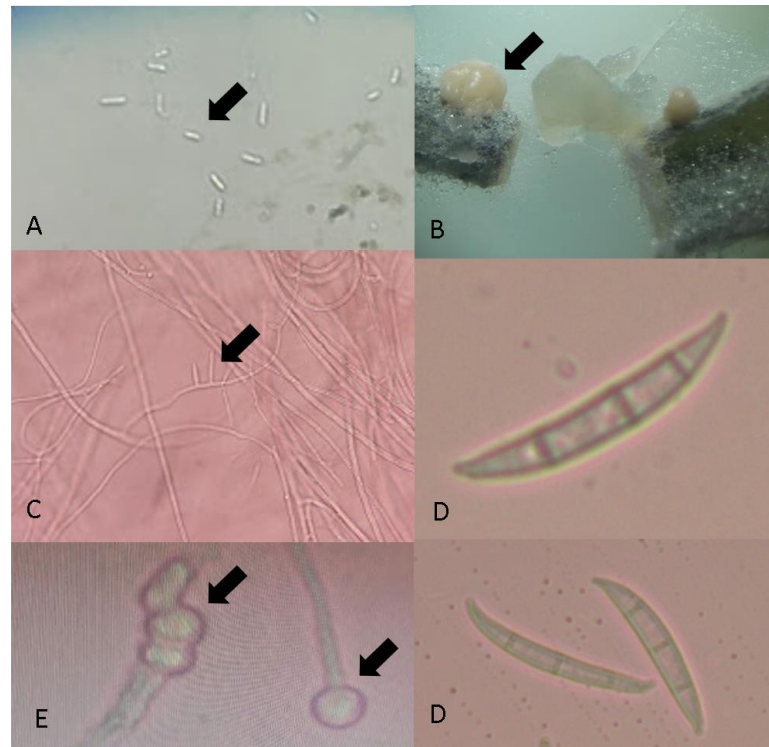
(Conclusão)

IV OF2	2,41	10,49	Oval	-		Ausente		Rosa claro	Branco	+
IV CF1	43,8	10,88	Oval	+	34,99	4,48	3 ou 4	Marrom pálido	Branco	+
IV CF2	2,92	10,91	Oval	+	31,49	3,95	3	Rosa claro	Branco	+
IV SF1	34,5	11,15	Oval	-		Ausente		Cinza rosado	Branco	+
IV SF2	24	11,23	Oval	-	27,74	4,43	2 ou 3	Rosa	Branco	+

Fonte: Autor

Esp.: Esporulação aos sete dias; Taxa de Crescimento Micelial (T.C.M) (mm/dia); Micro.: microconídios; (*) forma dos microconídios; Comp.: comprimento; Larg.: largura; Clamid.: clamidósporo; 1: meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar; 2: meio de cultura Folha-de-cravo-Ágar; 3: Presença (+) e ausência (-). Valores médios de cada isolado.

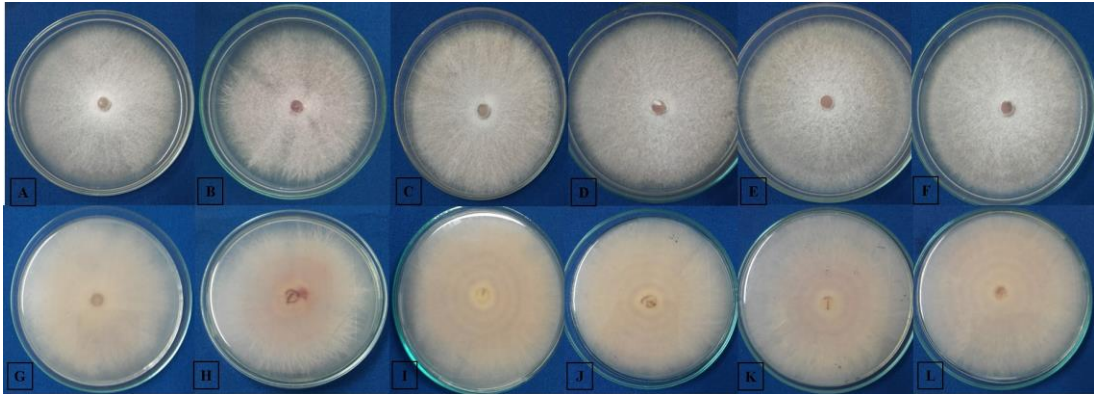
Figura 5 – Estruturas morfológicas de diferentes isolados de *Fusarium* spp.



Fonte: Autor

A: microconídios; B: esporodóquio; C: conidióforo; D: macroconídios; E: clamidósporo

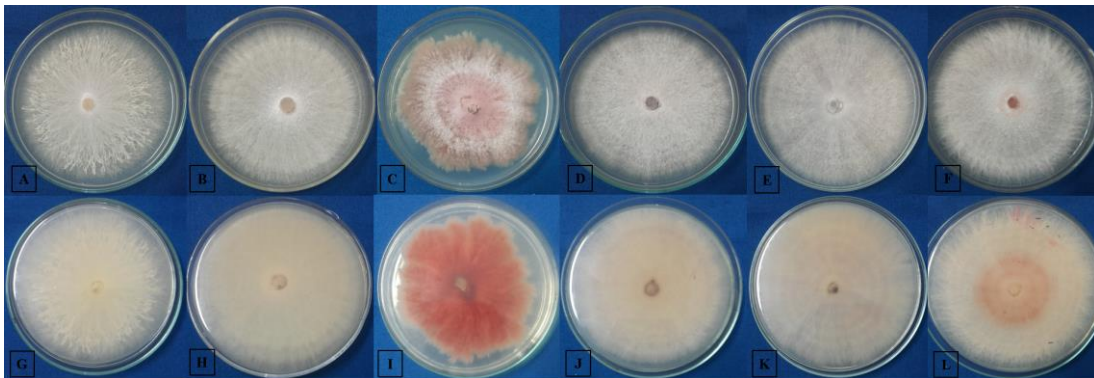
Figura 6 – Isolados de *Fusarium* spp. obtidos no verão/2015 em sistemas de cultivo orgânico, agroflorestal e convencional de *Citrus deliciosa* Tenore, cv. Montenegrina.



Fonte: Autor

Face superior dos isolados: A (IOF1), B (IOF2), C (ICF1), D (ICF2), E (ISF1) e F (ISF2), respectivamente. Face Inferior dos isolados: G (IOF1), H (IOF2), I (ICF1), J (ICF2), K (ISF1) e L (ISF2), respectivamente.

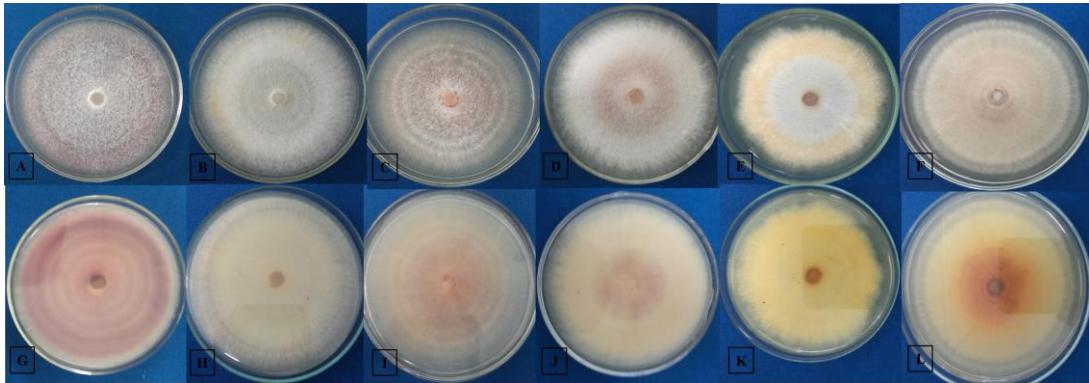
Figura 7 – Isolados de *Fusarium* spp. obtidos no inverno/2015 em sistemas de cultivo orgânico, agroflorestal e convencional de *Citrus deliciosa* Tenore, cv. Montenegrina.



Fonte: Autor

Face superior dos isolados: A (IIOF1), B (IOF2), C (IICF1), D (IICF2), E (IISF1) e F (IISF2), respectivamente. Face Inferior dos isolados: G (IIOF1), H (IIOF2), I (IICF1), J (IICF2), K (IISF1) e L (IISF2), respectivamente.

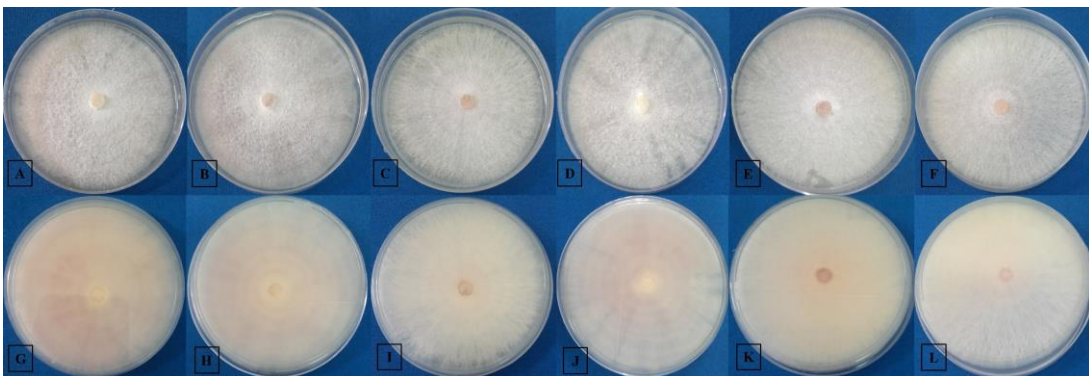
Figura 8 – Isolados de *Fusarium* spp. obtidos no verão/2016 em sistemas de cultivo orgânico, agroflorestal e convencional de *Citrus deliciosa* Tenore, cv. Montenegrina.



Fonte: Autor

Face superior dos isolados: A (IIIOF1), B (IIIOF2), C (IIICF1), D (IIICF2), E (IIISF1) e F (IIISF2), respectivamente. Face Inferior dos isolados: G (IIIOF1), H (IIIOF2), I (IIICF1), J (IIICF2), K (IIISF1) e L (IIISF2), respectivamente.

Figura 9 – Isolados de *Fusarium* spp. obtidos no inverno/2016 em sistemas de cultivo orgânico, agroflorestal e convencional de *Citrus deliciosa* Tenore, cv. Montenegrina.



Fonte: Autor

Face superior dos isolados: A (IVOF1), B (IVOF2), C (IVCF1), D (IVCF2), E (IVSF1) e F (IVSF2), respectivamente. Face Inferior dos isolados: G (IVOF1), H (IVOF2), I (IVCF1), J (IVCF2), K (IVSF1) e L (IVSF2), respectivamente.

Com base no dendrograma (Figura 10), foi possível separar os isolados em quatro grandes grupos (Tabela 17). Os grupos um e dois apresentam 40% de dissimilaridade, o que é considerado baixo, todavia separa os isolados por pequenas diferenças que podem ser comprovadas por técnicas moleculares. Já os grupos três e quatro apresentaram 90% de dissimilaridade, demonstrando uma grande diferença significativa entre os parâmetros utilizados na análise. Martins (2005), trabalhando

com isolados patogênicos e não patogênicos de *Fusarium* spp., observou níveis de similaridade entre 10,2 e 100%, segundo coeficiente de *Jaccard*. Segundo Lazzaroto (2013), é necessário, a identificação molecular dos isolados, para confirmar a heterogeneidade entre os grupos formados. É importante analisar se as características consideradas são capazes de distinguir espécies diferentes ou apenas separar isolados da mesma espécie que apresentam algum comportamento discrepante.

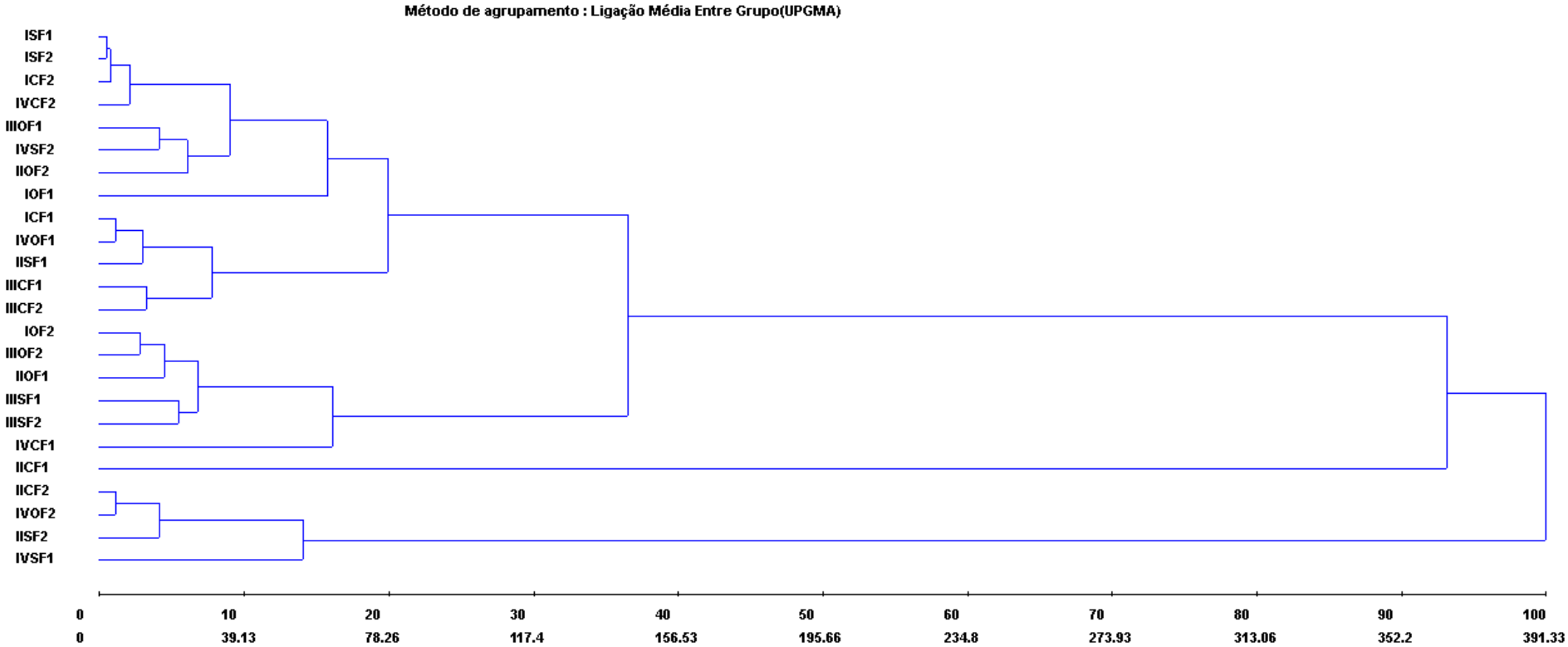
Tabela 17 – Grupos de isolados de *Fusarium* spp, com base na técnica de agrupamento UPGMA-("Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean").

GRUPO	Isolados
1	ISF1, ISF2*, ICF2, IVCF2, IIOF1, IVSF2, IIOF2, IOF1, ICF1, IIICF2, IVOF1, IISF1 e IIICF1
2	IOF2, IIIOF2*, IIOF1, IIISF1, IIISF2 e IVCF1
3	IICF1*
4	IICF2, IVOF2, IISF2 e IVSF1*

Fonte: Autor

*Isolados identificados molecularmente.

Figura 10 – Dendrograma mostrando a porcentagem de dissimilaridade entre os 24 isolados de *Fusarium* spp. O Dendrograma foi obtido pela técnica UPGMA, a partir da análise da matriz de distância de Mahalanobis, com sete caracteres morfológicos (esporulação, taxa de crescimento micelial, diâmetro final da colônia, crescimento micelial diário, comprimento, largura e número de septos dos macroconídios)



Fonte: Autor

O método de agrupamento UPGMA fornece as distâncias de Mahalanobis, entre os isolados, sendo que as menores distâncias tendem a uma maior proximidade entre os caracteres analisados e as maiores distâncias sugerem uma maior diferença entre os caracteres. As distâncias são utilizadas para agrupar isolados similares em um mesmo clado, assim como separá-los quando apresentam diferenças significativas. Na tabela 18, é possível observar as distâncias de Mahalanobis, entre os isolados. O isolado IICF1 apresenta as maiores distâncias entre os demais e isso pode ser explicado devido à alta esporulação do fungo, que foi de 77,4.106 esporos/mL, sendo muito superior aos demais. As menores distâncias estão entre os isolados ISF1 e ISF2, os quais apresentaram distância de 1,99.

Tabela 18 – Distâncias de Mahalanobis entre 24 isolados de *Fusarium* spp., após agrupamento pela técnica UPGMA-("Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean")

Isolado	Maior distância		Menor distância	
	Valor	Isolado	Valor	Isolado
IOF1	415,11	IICF1	46,11	IIIIOF1
IOF2	616,40	IISF2	11,02	IIIIOF2
ICF1	478,25	IICF1	4,19	IVOF1
ICF2	449,54	IVSF1	2,36	ISF1
ISF1	450,42	IICF1	1,99	ISF2
ISF2	426,96	IICF1	1,99	ISF1
IIOF1	608,36	IISF2	16,38	IIIIOF2
IIOF2	419,81	IISF1	18,06	IIIIO1
IICF1	741,07	IISF2	124,97	IVCF1
IICF2	672,13	IIISF1	4,35	IVOF2
IISF1	467,57	IICF1	5,96	ICF1
IISF2	752,08	IISF2	10,84	IVOF2
IIIIOF1	310,77	IICF1	15,99	IVSF2
IIIIOF2	643,65	IISF2	11,02	IOF2
IIICF1	499,98	IICF1	10,13	IVOF1
IIICF2	451,29	IICF1	12,79	IIICF1
IIISF1	752,08	IISF2	20,06	IOF2
IIISF2	669,41	IVSF1	20,52	IOF2
IVOF1	476,99	IICF1	4,19	ICF1
IVOF2	729,00	IICF1	4,35	IICF2
IVCF1	556,35	IISF2	33,94	IOF2
IVCF2	431,75	IVSF1	4,06	ISF2
IVSF1	747,72	IIISF1	44,96	IISF2
IVSF2	302,88	IISF2	15,99	IIIIOF1

A contribuição relativa dos caracteres para a divergência, ou seja, quanto que cada variável contribuiu para o agrupamento dos isolados em clados, é observada na tabela 19. No presente trabalho, o caracter que mais contribuiu foi o comprimento dos macroconídios, com 62,08%, seguido da esporulação, com contribuição de 19,5%, com as outras variáveis apresentando contribuições inferiores.

Lazarotto (2013) em seu trabalho considerou o diâmetro de colônias, esporulação, largura e comprimento de conídios para o agrupamento UPGMA, a fim de diferenciar morfológicamente isolados de *Fusarium* spp. e constatando que a largura dos conídios foi responsável por 99,98% da contribuição relativa dos caracteres avaliados para formação de clados. Entretanto, Mezzomo (2017) encontrou contribuição de 72,22% da variável esporulação, quando agrupou isolados de *Fusarium* spp.

Os resultados dos autores citados divergem dos encontrados no presente trabalho, sendo que o caracter que mais contribuiu foi o comprimento dos macroconídios. Dessa forma, deve-se ter cautela no momento de considerar ou não alguma variável, visto que, em cada análise ela pode apresentar comportamento diferente, e isso pode estar relacionado a grande variabilidade genética dos fungos. Nesse sentido, é de suma importância a confirmação dessas diferenças por meio de análises moleculares.

Tabela 19 – Contribuição relativa dos caracteres (esporulação, taxa de crescimento micelial, diâmetro final da colônia, crescimento micelial diário, comprimento, largura e número de septos dos macroconídios) para divergência.

Caracteres	Valor (%)
Esporulação	19,5
Diâmetro final da colônia	1,59
Taxa de crescimento micelial	5,82
Crescimento micelial médio diário	4,02
Largura de macroconídios	1,22
Comprimento de macroconídios	62,08
Nº de septos	5,72

Fonte: Autor

A fim de comprovação das diferenças dos grupos formados pelo dendrograma, realizou-se a identificação molecular de um isolado de cada grupo. Os isolados ISF2, IIIOF2, IICF1 e IVSF1 foram submetidos a extração do DNA e sequenciamento do fator de alongação (TEF1- α). Na tabela 20 são apresentados os acessos utilizados para a comparação filogenética, obtidos a partir do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), acompanhados de seu número de acesso, percentual de cobertura e similaridade. Foram selecionados os acessos com maior similaridade e cobertura para a confecção do dendrograma, determinados após o alinhamento das sequências.

Após o alinhamento, gerou-se um dendrograma com base no fator de alongação 1- α , que permitiu identificar as espécies dos isolados (Figura 11). Os isolados IICF1 e ISF2 foram alocados a um clado com 88% de *bootstrap*. No entanto ambos separam-se em dois pequenos ramos, com sequências de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, que foram utilizadas para comparação, com o isolado IICF1 ficando com 86% de *bootstrap* e o ISF2 com 88%.

O isolado IVSF1 foi alocado em outro clado, juntamente com sequências de *Fusarium oxysporum* que foram utilizadas na separação, com suporte de *bootstrap* de 91%. Ao comparar com as sequências que não ficaram no mesmo clado, o suporte de *bootstrap* passa para 100%. O isolado IIIOF2 foi alocado a outro clado, com suporte de *bootstrap* de 100%, sendo que, para a comparação, foram utilizadas sequências de *F. solani*. Dentro desse clado teve a formação de outro clado, no qual o isolado apresenta suporte de *bootstrap* de 64% em relação a sequência de *F. solani*. O dendrograma obtido por Mezzomo (2017) também separa, em dois cladros, isolados identificados como *F. oxysporum* e *F. solani*, discriminando as espécies, com suporte de *bootstrap* de 99%.

Hafizi et al. (2013) quando identificou patógenos associados à doença da coroa em palma (*Elaeis guineenses*), obteve a formação de dois cladros, separando em dois grandes grupos espécies de *Fusarium oxysporum*. Esse resultado corrobora com o obtido no presente trabalho, com três isolados de *Fusarium oxysporum* foram separados em dois ramos diferentes dentro do mesmo clado. Os isolados IICF1 e ISF2 foram agrupados com isolados da espécie *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* e o IIIOF2 com isolados identificados como *Fusarium oxysporum*.

A identificação de espécies de *Fusarium* com base no sequenciamento da região TEF1- α é considerada eficiente, devido à alta qualidade das informações

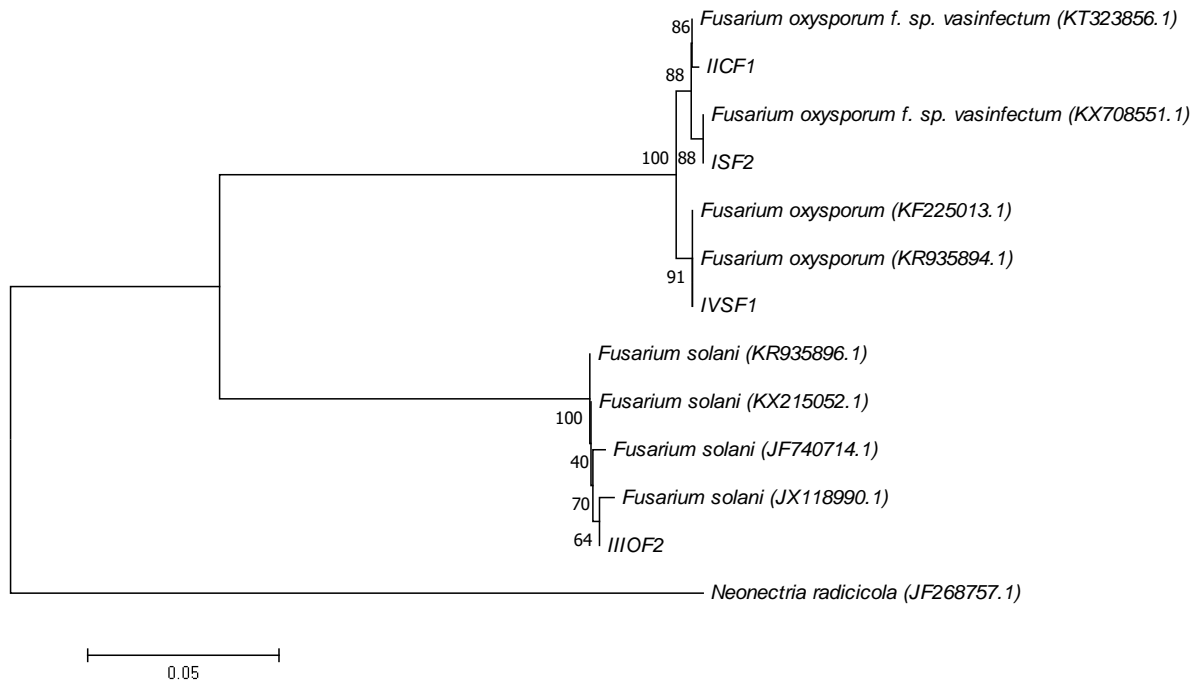
filogenéticas fornecidas, embora possam ser empregadas demais regiões como: β -tubulina, histona H3, entre outras (JACOBS, 2010; SOARES, 2011). Mezzomo (2017) com base no sequenciamento da região TEF1- α , obteve uma diferenciação intraespecífica mais ampla, visto que os isolados de *F. solani* foram distribuídos em ramos distintos, quando comparado com a região ITS. O mesmo ocorre com Tsuji (2012), quando, por meio do sequenciamento da região TEF1- α , separou isolados de *F. guttiforme* de outras espécies, formando um grupo monofilético com formação de subgrupos, que apresentaram suporte de bootstrap superiores a 50%.

Tabela 20 – Acesso no *Genbank*, cobertura (%), similaridade (%), país de origem e referência das espécies utilizadas na construção do dendrograma filogenético da região do fator de alongação 1- α .

Espécie	Acesso do Genbank	Cobertura %	Similaridade %	País de origem	Referência
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i>	KT323856.1	100	99	USA	Ortiz et al. (2017)
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i>	KX708551.1	100	99	Georgia	Bell et al. (2017)
<i>Fusarium oxysporum</i>	KF225013.1	100	99	França	Hermet, A. (2014)
<i>Fusarium oxysporum</i>	KR935894.1	100	99	México	Silva et al. (2015)
<i>Fusarium solani</i>	KR935896.1	100	99	México	Silava et al. (2015)
<i>Fusarium solani</i>	KX215052.1	95	99	Espanha	Pastrana et al. (2017)
<i>Fusarium solani</i>	JF740714.1	100	99	USA	O'Donnell et al. (2011)
<i>Fusarium solani</i>	KX118990.1	96	99	Holanda	Davari et al. (2012)
<i>Neonectria radiciola</i>	JF268757.1	-	-	China	Zhao et al. (2011)

Fonte: Autor

Figura 11 – Dendrograma filogenético baseado no método *Neighbour-joining* a partir de sequências de DNA da região do fator de alongação 1- α .



Fonte: Autor

OBS: os números sobre os ramos indicam a porcentagem de repetições da análise de *bootstrap* na qual as repetições foram observadas (1000 repetições). Uma sequência de *Neonectria radiculicola* foi utilizada como *outgroup*.

7.4 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE *Trichoderma* spp.

Na tabela 21, são apresentadas características morfológicas de isolados de *Trichoderma* spp. A esporulação entre os isolados variou de 0,031 a 64,97.10⁶ esporos/mL, com o isolado IICT1 apresentando o menor valor e o IVCT1 o maior. A esporulação apresenta grande variação e depende da espécie, Peres e Melo (1995), quando trabalharam com isolados de *Trichoderma harzianum*, observaram que a esporulação variou de 1,71.10⁶ a 83,69.10⁶ esporos/mL e o tamanho do esporo de 2,53 a 4,23 μ m, sendo esses valores semelhantes aos encontrados no presente trabalho. Todavia, Ethur (2006) mediu o diâmetro de isolados de *T. harzianum* e obteve valores inferiores, entre 1,6 a 2,3 μ m. A esporulação está relacionada com a habilidade do fungo em produzir clamidósporos, que são estruturas de resistência, de aspecto tipicamente globoso ou subgloboso, e indicam um bom potencial de disseminação no solo (GRONDONA et al. 1997).

Foram observadas pequenas diferenças no diâmetro final da colônia (Tabela 21). O isolado IIIOT1 obteve o menor diâmetro e conseqüentemente a menor taxa de crescimento micelial, com valores de 73,72 e 24,57 mm dia⁻¹, respectivamente. Já o isolado IICT1 teve os maiores resultados; o diâmetro da colônia foi de 77,7 mm e a T.C.M foi de 25,9 mm dia⁻¹. Os resultados do presente trabalho, divergem dos encontrados por Peres e Melo (1995), visto que, o diâmetro da colônia, após 48 horas de incubação, variou de 75,3 a 90 mm. Essa pequena divergência pode estar relacionada a espécie de *Trichoderma*, fotoperíodo, temperatura e pH do meio de cultura (KOIKE; LUCON, 2003).

Os isolados do presente trabalho apresentaram coloração verde claro a verde amarelado (Figuras 12, 13, 14 e 15). De acordo com Gans e Bisset (1998), a maioria das espécies de *Trichoderma* apresentam colônias formadas por massas de micélio com aparência flocosa, de coloração branca (cor gelo) nos primeiros dias, substituindo por tons verdes ao longo dos dias e em alguns casos tons amarelados.

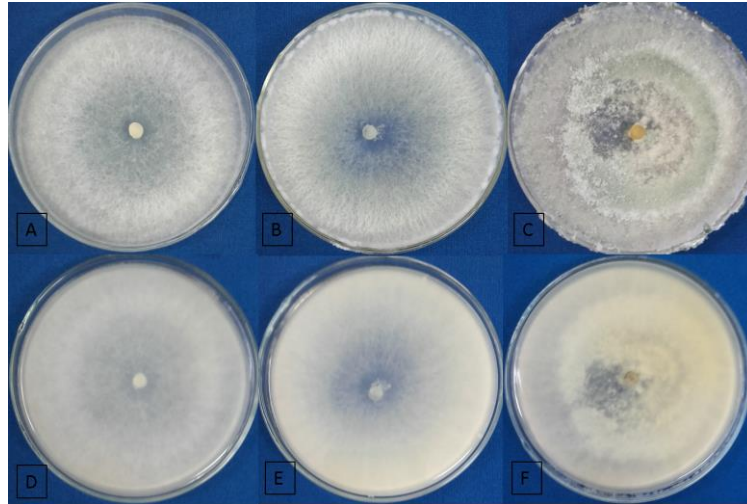
Tabela 21 – Características morfológicas de *Trichoderma* spp. obtidos em sistemas de cultivo orgânico, agroflorestal e convencional de *Citrus deliciosa* Tenore, cv. Montenegrina.

Isolado*	Esp. ($\cdot 10^6$) ¹	DC (mm)	T.C.M (mm dia ⁻¹)	Esporo		Pigmentação	
				Larg. (μ m)	Comp. (μ m)	Colônia	Mic. Aéreo
IOT1	1,19	76,25	25,42	2,4	3,02	Verde claro	Branco
ICT1	4,96	76,27	25,45	2,35	3,3	Verde claro	Branco
IST1	32,9	76,4	25,45	1,77	1,85	Verde claro	Verde fraco
IOT1	0,47	76,12	25,37	1,42	1,6	Verde claro	Branco
IICT1	0,031	77,7	25,9	2,22	2,27	Verde claro	Branco
IIST1	1,51	76,25	25,42	2	2,6	Verde claro	Branco
IIOT1	1,35	73,72	24,57	2,07	2,32	Verde claro	Branco
IICT1	12,82	75,85	25,3	2,72	3,17	Verde amarelado	Verde
IIIST1	12,72	76,02	25,32	2,12	2,5	Verde amarelado	Verde
IVOT1	4,34	76,62	25,55	2,72	2,87	Verde oliva	Verde fraco
IVCT1	64,97	74,02	24,67	2,25	2,67	Verde claro	Branco
IVST1	7,89	76,7	25,57	2,45	3,45	Verde oliva	Verde

Fonte: Autor

*Meio de cultura BDA; Esp.: esporulação aos três dias; DC: diâmetro médio final da colônia; T.C.M : taxa de crescimento micelial; Larg.: largura; Comp.: Comprimento; Mic. Aéreo: micélio aéreo.

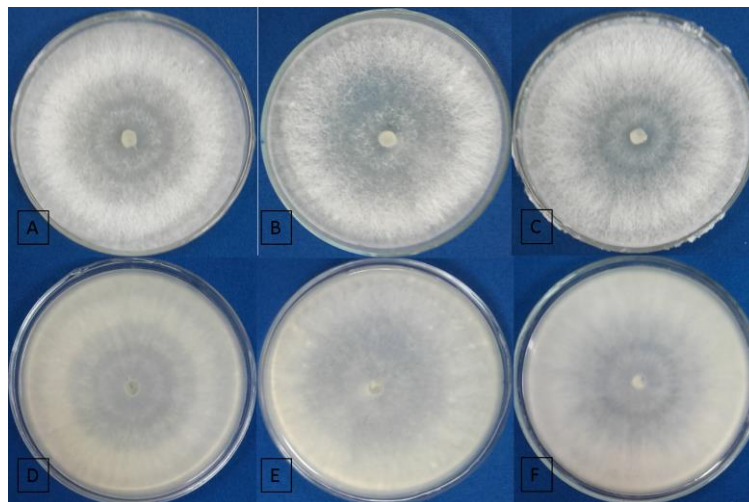
Figura 12 – Isolados de *Trichoderma* spp. obtidos em sistemas de cultivo orgânico, agroflorestal e convencional de *Citrus deliciosa* Tenore, cv. Montenegrina, no verão/2015



Fonte: Autor

Face superior dos isolados: A (IOT1), B (ICT2), C (IST1), respectivamente. Face Inferior dos isolados: D (IOT1), E (ICT2) e F (IST1), respectivamente.

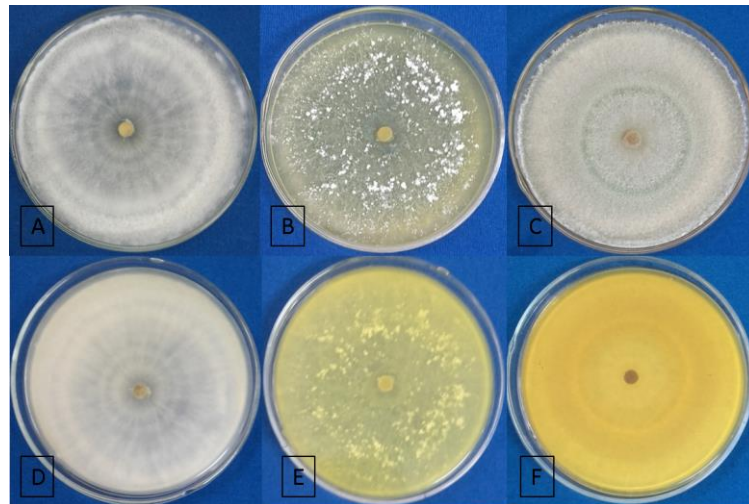
Figura 13 – Isolados de *Trichoderma* spp. obtidos em sistemas de cultivo orgânico, agroflorestal e convencional de *Citrus deliciosa* Tenore, cv. Montenegrina, no inverno/2015



Fonte: Autor

Face superior dos isolados: A (IIOT1), B (IICT2), C (IIST1), respectivamente. Face Inferior dos isolados: D (IIOT1), E (IICT2) e F (IIST1), respectivamente.

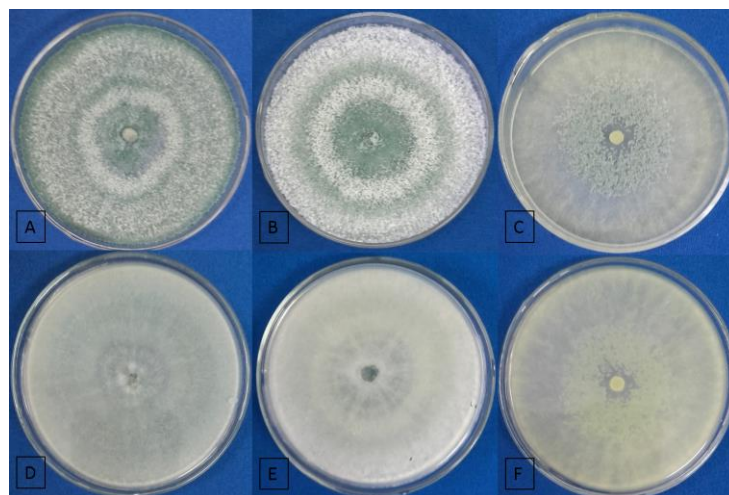
Figura 14 – Isolados de *Trichoderma* spp. obtidos em sistemas de cultivo orgânico, agroflorestal e convencional de *Citrus deliciosa* Tenore, cv. Montenegrina, no verão/2016.



Fonte: Autor

Face superior dos isolados: A (IIOT1), B (IICT2), C (IIST1), respectivamente. Face Inferior dos isolados: D (IIOT1), E (IICT2) e F (IIST1), respectivamente.

Figura 15 – Isolados de *Trichoderma* spp. obtidos em sistemas de cultivo orgânico, agroflorestal e convencional de *Citrus deliciosa* Tenore, cv. Montenegrina, no inverno/2016.



Fonte: Autor

Face superior dos isolados: A (IVOT1), B (IVCT2), C (IVST1), respectivamente. Face Inferior dos isolados: D (IVOT1), E (IVCT2) e F (IVST1), respectivamente.

Após a caracterização morfológica dos 12 isolados, os dados relacionados à esporulação, crescimento micelial (diâmetro final da colônia e taxa de crescimento micelial), comprimento e largura dos esporos foram submetidos ao método de

agrupamento UPGMA (“*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*”) e através do dendrograma gerado (Figura 16), os isolados foram agrupados pela similaridade entre as médias dos caracteres (Tabela 22).

A proximidade entre a matriz de dissimilaridade e a matriz cofenética, obtida para os níveis de distância entre cada amostra no gráfico, foi verificada através do coeficiente de correlação entre elas. Obteve-se uma correlação (índice cofenético) de 0,9559, mostrando uma boa representação da matriz de dissimilaridade pelo dendrograma.

Com base no dendrograma é possível observar a formação de dois clados, ambos com 100% de dissimilaridade. A partir dos ramos de cada clado, os isolados foram separados em grupos com características semelhantes. O grupo um alocou a maioria dos isolados, que apresentaram dissimilaridade inferior a 10%. Já o grupo dois, alocou apenas um isolado, o qual apresenta dissimilaridade de aproximadamente 25% em relação ao primeiro grupo. O grupo três, também alocou um único isolado, contudo ficou com dissimilaridade de 100% em relação aos outros dois grupos (Figura 16). Stracieri (2015) observou que isolados do gênero *Colletotrichum* foram alocados em quatro clados diferentes, com similaridade variando de alta a baixa entre os grupos.

Tabela 22 – Grupos de isolados de *Trichoderma* spp. com base na técnica de agrupamento UPGMA- (“*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*”).

GRUPO	Isolados
1	IOT1, ICT1, IIOT1*, IICT1, IIIST1, IIIOT1, IIICT1, IIIIST1, IVOT1 e IVST1
2	IST1*
3	IVCT1*

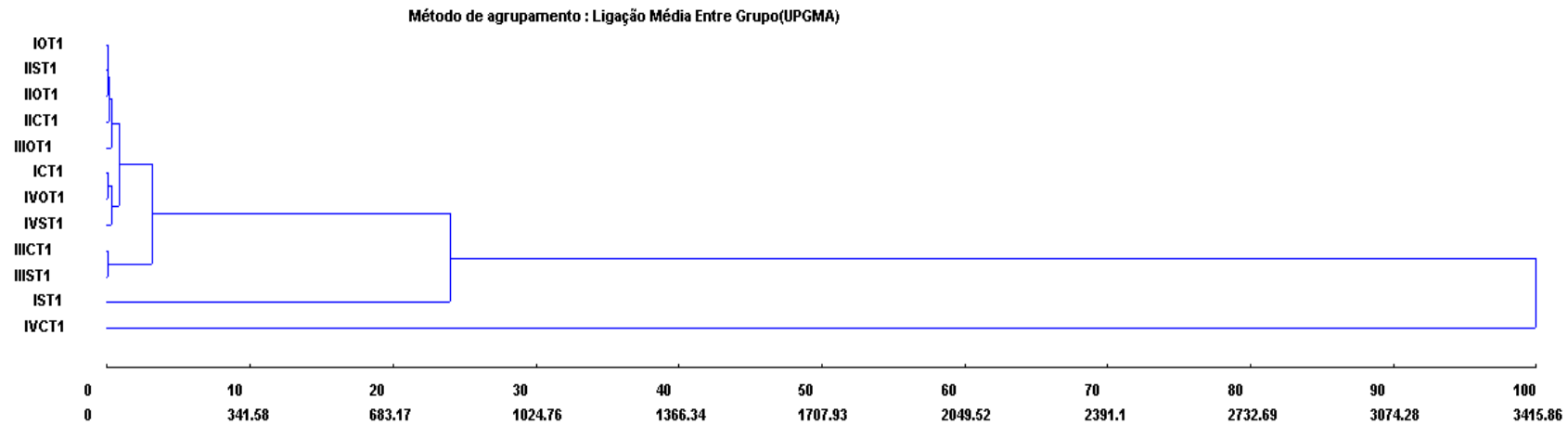
Fonte: Autor

*Isolados identificados molecularmente

Na tabela 23, estão dispostas as distâncias de Mahalanobis entre os isolados. As menores distâncias indicam proximidade entre os caracteres avaliados. Ao contrário, as maiores distâncias sugerem a diferença entre os caracteres analisados. As distâncias são utilizadas na confecção do dendrograma que agrupa isolados

semelhantes em um mesmo “cluster”/clado. O isolado IVCT1 apresenta as maiores distâncias em relação à maioria dos isolados. Isso ocorre devido ao isolado apresentar a maior esporulação, sendo que, quando comparada a esporulação do isolado IICT1, o valor é 64 vezes maior.

Figura 16 – Dendrograma mostrando a porcentagem (%) de dissimilaridade entre os 12 isolados de *Trichoderma* spp. O Dendrograma foi obtido pela técnica UPGMA, a partir da análise da matriz de distância de Mahalanobis, com cinco caracteres morfológicos (esporulação, diâmetro final da colônia, taxa de crescimento micelial, comprimento e largura dos esporos)



Fonte:Autor

Tabela 23 – Distâncias de Mahalanobis, entre 12 isolados de *Trichoderma* spp., após agrupamento pela técnica UPGMA

Isolado	Maior distância		Menor distância	
	Valor	Isolado	Valor	Isolado
IOT1	4074,10	IVCT1	0,44	IIST1
ICT1	3608,16	IVCT1	0,85	IVOT1
IST1	1069,48	IICT1	409,02	IIICT1
IOT1	4168,12	IVCT1	2,43	IIST1
IICT1	4198,22	IVCT1	3,93	IOT1
IIST1	4033,94	IVCT1	0,44	IOT1
IIOT1	4048,40	IVCT1	7,92	IIST1
IIICT1	2724,20	IVCT1	0,86	IIIST1
IIIST1	2734,95	IVCT1	0,86	IIICT1
IVOT1	3684,55	IVCT1	0,85	ICT1
IVCT1	4198,22	IICT1	1031,74	IST1
IVST1	3268,11	IVCT1	8,81	ICT1

Fonte: Autor

Outro dado fornecido pela análise multivariada (UPGMA) é a contribuição relativa dos caracteres para divergência, isto é, o quanto cada variável utilizada contribuiu para o agrupamento dos isolados em clados. A esporulação foi a variável que mais contribuiu, com 99,46%, seguido do diâmetro da colônia (0,33%), as demais variáveis praticamente não contribuíram para a divergência dos isolados (Tabela 24). Pereira (2001) utilizou variáveis morfológicas na análise UPGMA e conseguiu a separação em nível de gênero de fungos micorrízicos. As informações obtidas foram satisfatórias para a formação de três grupos contendo os gêneros *Epulorhiza* e *Ceratorhiza*. Em seu estudo o autor comparou dados de diâmetro da colônia, largura e comprimento das células monilióides e diâmetro da hifa.

A separação de isolados de *Trichoderma*, em grupos, com base em caracteres morfológicos deve ser realizada com muita cautela, visto que, não são encontrados trabalhos que tenham utilizado caracteres morfológicos associados à técnica UPGMA e, sim, somente informações genéticas, provenientes de análises moleculares. A fim de comprovar a diferença entre os grupos do presente trabalho, formados com a utilização da técnica UPGMA e caracteres morfológicos, realizou-se a identificação molecular de um isolado de cada grupo.

Tabela 24 – Contribuição relativa dos caracteres (esporulação, diâmetro da colônia, taxa de crescimento micelial, comprimento e largura dos esporos) para divergência.

Caracter	Valor (%)
Esporulação	99,46
Diâmetro da colônia	0,33
Taxa de crescimento micelial	0,07
Largura esporo	0,03
Comprimento esporo	0,08

Fonte: Autor

Os isolados IST1, IOT1, IICF1 e IVCT1 foram submetidos à extração do DNA e sequenciamento do fator de alongação (TEF1- α). Na tabela 25, são apresentados os acessos utilizados para a comparação filogenética obtidos a partir do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), acompanhados de seu número de acesso, percentual de cobertura e similaridade. Foram selecionados os acessos com maior similaridade e cobertura, para a confecção do dendrograma, determinados após o alinhamento das sequências.

O dendrograma permitiu identificar as espécies diferentes de *Trichoderma* (Figura 29). O isolado IST1 ficou alocado a um único ramo, juntamente com sequências de *Trichoderma harzianum*, utilizadas na comparação com suporte de “bootstrap” de 96%. Os isolados IOT1 e IVCT1 foram alocados a outro grande ramo, que quando comparado ao clado pertencente ao isolado IST1, apresenta suporte de “bootstrap” de 99%. No entanto, esse grande ramo se divide em mais dois ramos, separando os isolados IOT1 e IVCT1 em dois grupos menores, com suporte de “bootstrap” de 99 e 98%, respectivamente.

O isolado IOT1 foi alocado a um ramo com sequências de *T. koningiopsis*, que foram utilizadas na comparação, com suporte de “bootstrap” de 80%. Já o isolado IVCT1, foi alocado com sequências de *T. asperellum*, com suporte de “bootstrap” de 84%.

Lazarotto (2016), por meio do fator alongação também conseguiu identificar isolados de *Trichoderma*, que foram alocados em clados com sequências de *T. atroviride* para comparação, apresentando suporte de “bootstrap” variando de 86 a 99%. Reis (2014) identificou sete espécies de *Trichoderma*, com base em duas

regiões (ITS e TEF-1 α). Para cada região obteve um dendrograma com espécies alocadas em diferentes clados e suporte de “*bootstrat*” superior a 50%. A autora relata que a identificação das espécies foi compatível para as duas regiões analisadas, tanto ITS quanto TEF, formando cinco clados com sete espécies. Feitosa (2016), quando estudou diferentes genótipos de *Trichoderma* spp., com base no fator de alongação, pode identificar oito espécies diferentes: *T. harzianum*, *T. asperellum*, *T. atroviride*, *T. koningiopsis*, *T. longibrachiatum*, *T. virens*, *T. stromaticum* e *T. spirale*.

A região TEF-1 α é uma boa escolha para a identificação de espécies de *Trichoderma*, por ser uma região mais variável que a ITS, refletindo melhor as diferenças entre espécies e pequenas diferenças intraespecíficas (Samuels, 2006). Os resultados do presente trabalho são positivos, visto que foi possível identificar as espécies de *Trichoderma* utilizando apenas o sequenciamento do fator de alongação (TEF-1 α). As informações obtidas com a identificação molecular, comprovam as diferenças entre os grupos (Tabela 22) obtido pela técnica UPGMA, pela qual os isolados foram agrupados com base em caracteres morfológicos, sendo que, o que mais contribuiu para essa diferenciação foi a média da esporulação de cada isolado. Entretanto, a identificação de espécies deve sempre considerar fatores morfológicos e moleculares, para uma identificação mais eficiente.

Tabela 25 – Acesso Genbank cobertura (%), similaridade (%), país de origem e referência das espécies utilizadas na construção do dendrograma filogenético da região do fator de alongação 1- α .

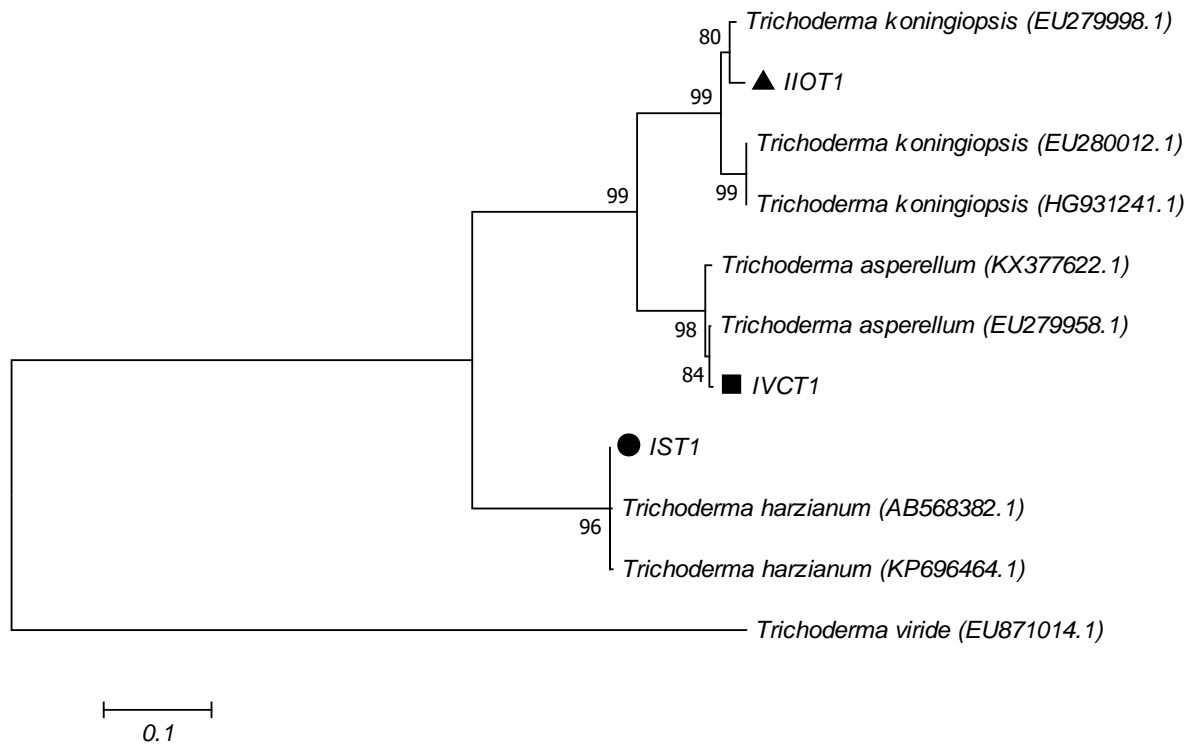
(Continua)

Espécie	Acesso do Genbank	Cobertura %	Similaridade %	País de origem	Referência
<i>Trichoderma koningiopsis</i>	EU279998.1	94	99	Colômbia	Hoyos et al. (2007)
<i>Trichoderma koningiopsis</i>	EU280012.1	88	96	Colômbia	Hoyos et al. (2007)
<i>Trichoderma koningiopsis</i>	HG931241.1	94	95	Espanha	Sandoval-Denis et al. (2014)
<i>Trichoderma asprellum</i>	KX377622.1	95	98	Japão	Li et al. (2016)

					(Conclusão)
<i>Trichoderma asprellum</i>	EU279958.1	96	98	Colômbia	Hoyos et al. (2009)
<i>Trichoderma harzianum</i>	AB568382.1	90	99	Colômbia	Smith et al. (2013)
<i>Trichoderma harzianum</i>	KP696464.1	90	99	Brasil	Marraschi et al. (2015)
<i>Trichoderma viride</i>	EU871014.1	-	-	Áustria	Zachow et al. (2009)

Fonte: Autor

Figura 17 – Dendrograma filogenético baseado no método *Neighbour-joining* a partir de seqüências de DNA da região do fator de alongação 1- α .



Fonte: Autor

7.5 PATOGENICIDADE DE ISOLADOS DE *Fusarium* SPP. A MUDAS DE *Citrus Deliciosa* TENORE.

No teste de patogenicidade observou-se a formação de pequenas estrias (pigmentos em formato estriado), próximo ao local da inoculação do patógeno (Figura 18). Tomando como base esse sintoma, visto que não foram observados outros, os isolados foram separados em dois grupos, conforme tabela 26.

Embora o gênero *Fusarium*, seja considerado um patógeno fraco à cultura do citros, ele pode causar algum estresse, pois é capaz de produzir compostos químicos do tipo naftoquinonas, que são tóxicos às plantas e são expressos na forma de pigmentos. Um dos principais compostos produzidos por *Fusarium solani* é a Isomarticina, que pode causar sintomas como: escurecimento dos vasos, murcha de folhas e podridão de raízes (KERN, 1978; BAKER et al., 1981; NEMEC e BAKER, 1992). A formação de pequenas estrias próximo ao local da inoculação do patógeno pode estar relacionada à produção dessas toxinas. Nem todos os isolados foram capazes de causar tal sintomatologia e isso pode estar relacionado a uma característica específica desconhecida do isolado. Nas plantas do tratamento testemunha não foram observadas alterações próximo ao local da introdução do palito (Figura 18c). Este fato corrobora para que alguns isolados sejam considerados patógenos fracos à cultura do citros.

Rensburg et al. (2001) obtiveram Isomarticina a partir de *F. solani*, em meio de sais minerais com sacarose líquida, e adicionaram a uma solução hidropônica, na qual cultivaram diferentes porta-enxertos com intuito de avaliar a resistência à toxina. Os autores observaram a descoloração das raízes, redução da massa verde, queda no crescimento da planta, diminuição no comprimento das raízes e acúmulo de zinco no tronco, em todos os porta-enxertos. Com base nessas informações, classificaram os porta-enxertos, variando de tolerante a sensível. O *Benton citrange*, foi classificado como o mais tolerante, *Poncirus trifoliata* como intermediário e o *Rangpur lime* como mais sensível. De acordo com os autores supracitados, o porta-enxerto *Poncirus trifoliata* é considerado intermediário quanto à resistência a Isomarticina, e isso pode explicar a baixa ocorrência de sintomas visuais.

Santos (2009), em seu estudo com plantas de laranja Valência sob o porta-enxerto limão Cravo, observou a presença de fitotoxinas do grupo naftazarinas no sistema vascular de plantas com sintomas de morte súbita. Nesse sentido, o autor reforça a hipótese do envolvimento de toxinas de *F. solani* nos sintomas de morte súbita. Porém, o efeito das toxinas pode não se manifestar imediatamente em plantas jovens e os sintomas podem ocorrer quando há uma elevada proporção de raízes com altos níveis de toxinas, ocorrendo em plantas velhas.

Tabela 26 – Grupos de isolados de *Fusarium* spp. após teste de patogenicidade, com base na formação de estrias.

Com estrias	Sem estrias
ISF2 ¹ , IIOF2, IISF2, IIIIOF1, IIIIOF2 ² , IIICF2, IIISF1, IIISF2, IVCF1 e IVSF2.	IOF1, IOF2, ICF1, ICF2, ISF1, IIOF1, IICF1 ³ , IICF2, IISF1, IIICF1, IVOF1, IVOF2, IVCF2 e IVSF1 ⁴ .

¹*F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, ²*F. solani*, ³*F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, ⁴*F. oxysporum*

Fonte: Autor

Figura 18 – Estrias causadas por *Fusarium* spp. em mudas de *Citrus deliciosa* Tenore



A: isolado IIIIOF2; B: isolado IIISF2; C: testemunha; as setas indicam as estrias.

Fonte: Autor

7.6 CONFRONTO DE *Fusarium* SPP. E *Trichoderma* SPP.

A tabela 27 apresenta os valores médios de crescimento micelial dos isolados de *Fusarium* spp., em confrontação direta com *Trichoderma* spp. e a classificação do antagonismo de *Trichoderma* spp. Todos os isolados de *Fusarium* spp. apresentaram redução no crescimento micelial, quando pareados com isolados de *Trichoderma* spp. oriundos do mesmo sistema de cultivo. A porcentagem de inibição variou de 36,35 a 64,25%, sendo devida às características dos isolados de *Fusarium* spp. utilizados, pois apresentam diferentes médias de crescimento micelial, como é observado na média da testemunha.

Com relação à classificação do antagonismo de *Trichoderma* spp., os isolados foram separados nas classes 1 e 2 (Bell et al., 1982), sendo que classe 1, o antagonista cresce e ocupa toda a placa, e na 2, o antagonista cresce e ocupa uma parte do patógeno. O isolado IST1, identificado como *T. harzianum*, quando pareado com os isolados ISF1 e ISF2 (*F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*), foi classificado como pertencente a classe dois (Figura 18), corroborando com o resultado obtido por Ethur (2006), quando avaliou o potencial de inibição de *T. harzianum* a isolados de *F. oxysporum* e classificou-os como classe 1,5 a 2. A autora também considera isolados muito eficientes aqueles que apresentarem notas entre 1,0 e 1,5, e eficientes aqueles que apresentarem notas entre 2,0 e 2,5. Porém Broetto et al. (2014) quando estudaram o potencial de inibição de *T. harzianum* a *Macrophomina phaseolina*, classificaram-no como classe um.

O isolado IIOT1, identificado como *T. koningiopsis*, apresentou classes diferentes para cada isolado de *Fusarium* spp. O mesmo é relatado por Milanesi (2012), quando estudou o potencial de *T. koningiopsis* a *Fusarium* spp. e classificou-o como classe um ou dois. A autora também avaliou outras espécies de *Trichoderma* spp. e observou que o *T. koningiopsis* foi a espécie que menos inibiu o crescimento micelial de diferentes isolados de *Fusarium* spp. O isolado IVCT1, identificado como *T. asperellum*, apresenta comportamento semelhante ao IIOT1, pois também é classificado em classes diferentes (Figura 19).

Hoffmann et al. (2015) estudaram o comportamento antagônico de 15 isolados diferentes de *Trichoderma* spp. a um isolado de *Fusarium* sp. e os classificaram, em classes que variaram de um a 3,5, segundo a escala de Bell et al. (1982). Semelhantemente, Larralde-Corona et al. (2008), em teste utilizando nove isolados de *Trichoderma* sp., constataram diferença na capacidade dos isolados em prevenir o crescimento micelial de *M. phaseolina*. *T. atroviride*, *T. koningiopsis* e *T. harzianum* apresentaram uma maior capacidade de parasitismo a *M. phaseolina*.

A classificação do potencial antagônico de *Trichoderma* é influenciada pelas diferentes espécies de fungos, pois para cada espécie, apresenta um comportamento diferente. No entanto, é considerado um excelente agente biológico, para o controle de diferentes fungos patogênicos, causadores de doenças em diferentes espécies de interesse agrícola (ARGUMEDO-DELIRA et al., 2009). Segundo Dennis e Webster (1971), a capacidade do *Trichoderma* sp. em inibir o desenvolvimento de outros fungos é explicado, pela produção de antibióticos, tais

como gliotoxina, viridina, trichodermina, suzucacilina, alameticina e dermadina e enzimas como, quitinase, β -1,3-glucanase, celulase e hemicelulase.

Silva (2015) estudou a produção de quitinase por isolados de *Trichoderma* spp. e, posteriormente, avaliou o biocontrole da Podridão Radicular da mandioca, causada por *F. solani* e constatou que o isolado que mais produziu quitinase, no teste *in vitro*, foi o que apresentou maior redução na severidade da doença, tanto na parte aérea quanto na radicular da planta.

Larralde-Corona et al. (2008) observaram a redução do crescimento de *M. phaseolina*, quando confrontado com *Trichoderma* spp., e ressaltam que o fungo possui a parede celular composta por quitina e β -1,3-glucana e, possivelmente, o seu desenvolvimento foi inibido por *Trichoderma* spp. pela produção de antibióticos ou de quitinases e β -1,3-glucanases, pelo *Trichoderma*.

Tabela 27 – Crescimento micelial (mm) de *Fusarium* spp. após sete dias em teste de confrontação direta com *Trichoderma* spp., % de inibição e sua classificação quanto ao antagonismo, conforme escala de Bell et al. (1982).

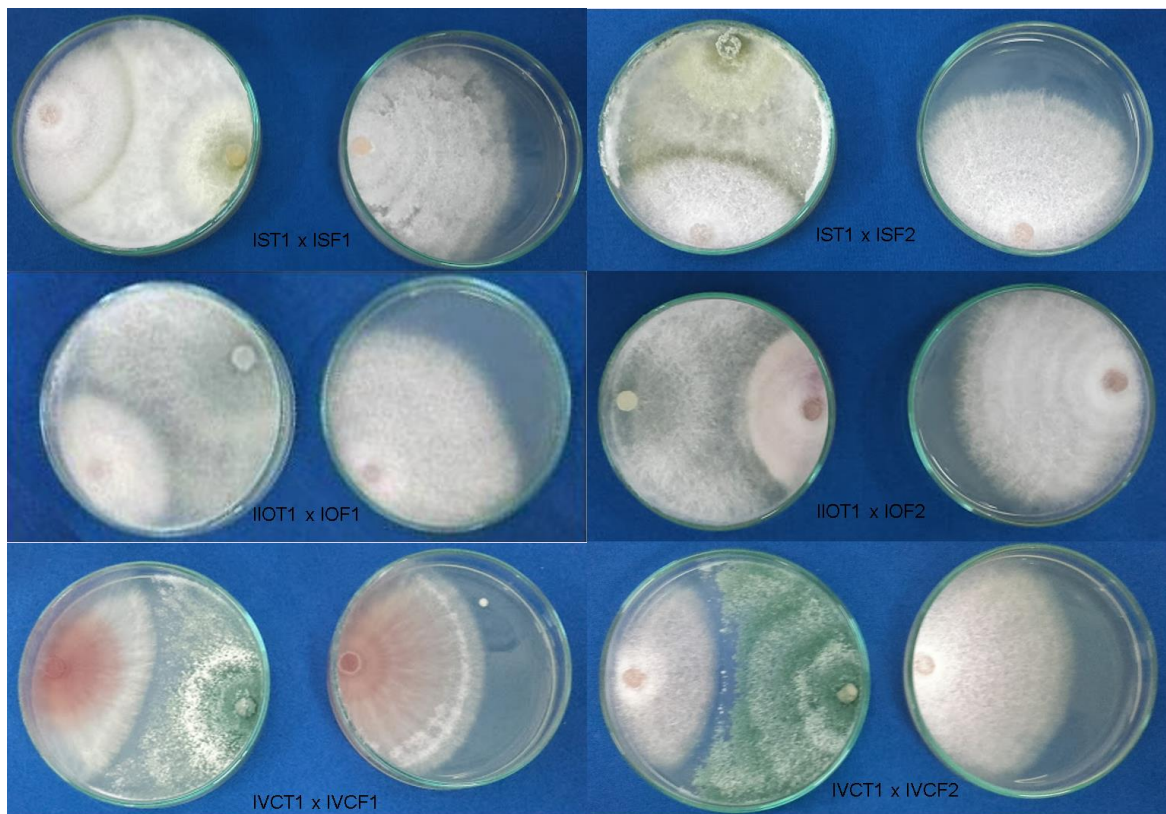
(Continua)					
Isolados*		Cresc. micelial (mm)		%	Escala
Trich.	Fus.	Conf.	Test.	Inibição	
I OT1	I OF1	23,53 a**	49,40	52,34 a	1
	I OF2	22,98 a	53,30	56,93 a	1
I CT1	I CF1	23,35 a	58,26	59,93 a	1
	I CF2	24,54 a	62,70	60,84 a	1
I ST1	I SF1	23,43 a	52,59	55,45 a	2
	I SF2	24,03 a	51,41	53,24 a	2
II OT1	II OF1	25,64 a	51,17	49,90 b	2
	II OF2	27,88 b	61,04	54,32 a	1
II CT1	II CF1	18,84 a	36,25	48,04 b	2
	II CF2	21,53 a	48,47	55,61 a	1
II ST1	II SF1	25,11 a	55,04	54,38 b	2
	II SF2	24,01 a	67,19	64,25 a	2
III OT1	III OF1	25,16 a	52,83	52,35 a	2
	III OF2	25,09 a	41,09	38,93 b	1
III CT1	III CF1	29,92 a	52,35	42,86 a	2
	III CF2	29,78 a	51,24	41,85 a	2
III ST1	III SF1	25,71 a	36,50	29,62 b	1
	III SF2	27,01 a	42,45	36,35 a	2

					(Conclusão)
IV OT1	IV OF1	25,61 a	56,06	54,35 a	1
	IV OF2	28,17 a	49,64	43,27 b	1
IV CT1	IV CF1	28,54 a	46,38	38,51 a	2
	IV CF2	28,58 a	50,82	43,79 a	1
IV ST1	IV SF1	22,85 a	47,63	52,03 a	2
	IV SF2	26,36 b	51,11	48,36 a	2

Fonte: Autor

*Nomenclatura dos isolados: I: época verão 2015, II: época inverno 2015, III: época verão 2016, IV: época inverno 2016; O: Orgânico, C: Convencional, S: Agroflorestal; 1 ou 2: número do isolado; Trich.: *Trichoderma* spp.; Fus.: *Fusarium* spp.; Conf.: Confronto; Test.: Testemunha. **Médias seguidas de mesma letra, em cada confronto, na coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05\%$).

Figura 19 – Imagens do teste de confronto direto, utilizando isolados de *Trichoderma* spp. sobre diferentes isolados de *Fusarium* spp.



Fonte: Autor

CONCLUSÕES

Não existe diferença na diversidade fúngica do solo entre os sistemas orgânico, agroflorestal e convencional de cultivo de *Citrus deliciosa* Tenore.

De maneira geral, a quantidade de patógenos e antagonistas tem variação entre os sistemas de cultivo e as épocas do ano.

Isolados de *Fusarium* spp., oriundos dos sistemas de cultivo orgânico, agroflorestal e convencional, mostraram-se patógenos fracos a mudas de *Citrus deliciosa* Tenore, cv. Montenegrina.

Isolados de *Trichoderma* spp., oriundos dos sistemas de cultivo orgânico, agroflorestal e convencional, apresentaram controle *in vitro* de *Fusarium* spp.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADESEMOYE, A. et al. Current knowledge on *Fusarium* dry rot of citrus. **Citrograph**, Visalia, v.2, n. 7. p. 29-33. 2011.
- AGUIAR, M. I. de. **Qualidade física do solo em sistemas agroflorestais**. 2008. 79p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.
- Al-SADI, A. M. et al. Characterization and pathogenicity of fungal pathogens associated with root diseases of citrus in Oman. **International Journal of Agricultural Biology**. v.16, p.371-376. 2014.
- ALTIERI, M. **Agroecologia: bases científicas para uma agricultura sustentável**. Guaíba: Agropecuária, 2002.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein data base search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 3389-3402. 1997.
- AMORIM, E. P. da R.; MELO, I. S. de Ação antagônica de rizobactérias contra *Phytophthora parasítica* e *P. citrophthora* e seu efeito no desenvolvimento de plântulas de citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 2, p. 565-568. 2002.
- ARAÚJO, A. S. F.; MELO, W. J. **Biomassa Microbiana do Solo**. Universidade Federal do Piauí, Teresinha, 2012. 150p.
- ARGUMEDO-DELIRA, R. et al. El género fúngico *Trichoderma* y su relación con contaminantes orgânicos e inorgânicos. **Revista Internacional de Contaminación Ambiental**, Toluca, v.24, n.4, p. 257-269, 2009.
- AZEVEDO, C. L. L. Sistema de Produção de Citros para o Nordeste. Sistema de Produção, 16 ISSN 1678-8796 Versão eletrônica Dez/2003. Disponível em:<<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Citros/CitrosNordeste/doencas.htm#fungos>> Acesso em 20/10/2015.
- BAKER, R.; COOK, J. **Biological control of plant pathogens**. San Francisco: W. H. Freeman and Co, San Francisco, California. 433 pp. (Book, reprinted in 1982, Amer. Phytopathology. Soc., St. Paul, Minnesota).
- Baker R, Tatum JH, Nemeš S. Toxin production by *Fusarium solani* from fibrous roots of blight-diseased trees. **Phytopathology** v.71, p. 4-951, 1981.
- BANU, N. A.; SINGH, B.; COPELAND, L. Influence of copper on soil microbial and biodiversity in some NSW soil. **Australian New Zealand Soils Conference**. Australia, p. 1-9, 2004.
- BARNETT, H.L.; HUNTER, B.B. **Illustrated Genera of Imperfect Fungi**. 4. Ed. Minnesota: American Phytopathology Society, 1999. 218 p.

BELL, D. K.; WELLS, H. D.; MARKHAM, C. R. In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. **Phytopathology**, v. 72, n. 4, p. 379-382, 1982.

BERGAMASCHI, H. et al. **Clima da Estação Experimental da UFRGS (e região de abrangência)**. Porto Alegre: Faculdade de Agronomia da UFRGS, 2003.

BERGAMASCHI, H.; GUADAGNIN, M. **Agroclima da Estação Experimental Agrônômica da UFRGS**. Porto Alegre: Faculdade de Agronomia da UFRGS, 1990.

BORGES, T. K. S. et al. Influência de práticas conservacionistas na umidade do solo e no cultivo do milho (*Zea mays* L.) em semiárido nordestino. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 38, p. 1862-1873, 2014.

BRANDÃO, E.M. Os componentes da comunidade microbiana do solo. In: Cardoso, E.J.B.N., **Microbiologia do solo**. Campinas, Soc. Brasileira de Ciência do Solo, 1992. p.1-16.

BRASIL. Lei nº 10.831, de 23 de dezembro de 2003. Dispõe sobre a agricultura orgânica e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, 24 de dezembro de 2003, Seção 1, p.8.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Departamento Nacional de Pesquisa Agropecuária. Divisão de Pesquisa Pedológica. Levantamento de reconhecimento dos solos do Estado do Rio Grande do Sul. Recife, 1973. 431 p. (Boletim técnico, 30).

BROETTO, et al. Crescimento micelial e produção de microescleródios de *Macrophomina phaseolina* confrontado com diferentes isolados de *Trichoderma* sp. **Scientia Agraria Paranaensis**, Marechal Cândido Rondon, v.13, n. 4, p.310-317. 2014.

BRITO, F. S.; MILLER, P. R. M.; STADNIK, M. Presença de *Trichoderma* spp. em composto e suas características para o controle de fitopatógenos. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Porto Alegre, v.5, n. 1, p.43-53, 2010.

Bueno, C.J.; Ambrósio, M.M. de Q.; Souza, N.L. Produção e avaliação da sobrevivência de estruturas de resistência de fungos fitopatogênicos habitantes do solo. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.33, n.1, p.47-55, 2007.

Caixeta, M. P. et al. Espécies de *Phytophthora* associadas à gomose em pomares de citros no Estado do Paraná, Brasil. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.39, n.4, p.242-247, 2013.

CANALI, S. et al. Effect of long term addition of composts and poultry manure on soil quality of citrus orchards in Southern Italy. **Biol Fertil Soils**, v.40, p. 206–210, 2004.

CARNIELLI, L. **Detecção molecular de *Fusarium guttiforme* agente etiológico da fusariose do abacaxizeiro**. 2014. 51f. Dissertação. (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, ES, 2014.

CARVALHO, R.; GOEDERT, W. J.; ARMANDO, M. S. Atributos físicos da qualidade de um solo sob sistema agroflorestal. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, p.1153-1155, 2004.

CASA, J. **Controle fitossanitário no cultivo do tomateiro nos sistemas orgânico e biodinâmico de produção**. 2008. 81p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, SP, 2008.

COUTINHO, F. P.; CAVALCANTI M. A. Q.; YANO-MELO A. M. Filamentous fungi isolated from the rhizosphere of melon plants (*Cucumis melo* L. cv. Gold Mine) cultivated in soil with organic amendments. **Acta Botânica Brasilica**, São Paulo, v. 24, n.1, p 292- 298, 2010.

CRUZ, C.D. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum**. v.35, n.3, p.271-276, 2013.

DEMATTE, J. L.; VITTI, G. C. Alguns aspectos relacionados ao manejo de solos para citrus. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE CITROS, 2., 1992, Campinas. **Anais...** Campinas: Fundação Cargill, 1992. p. 67-99.

DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma*: III – Hyphal interactions. **Transactions British Mycological Society**, London, v. 57, p. 363-369, 1971.

DOMSCH, K.H., GAMS, W.& ANDERSON, T.H. **Compendium of Soil Fungi**. 2 ed. vol.1. Eching, IHWVerlag, 1993. 860p

DURIGAN, J. C.; TIMOSSI, P. C. **Manejo de plantas daninhas em pomares cítricos**. Bebedouro: EECB, p. 53, 2002.

DORNELLES, C. M. M. Citricultura do Rio Grande do Sul. In: RODRIGUES, O., VIÉGAS, F., POMPEU JÚNIOR, J., et al. **Citricultura Brasileira**. Campinas, SP: Fundação Cargill, 1991. v.I. p.38-41.

EDWARDS, K.; JOHNSTONE, C.; THOMPSON, C. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 19, p. 1349. 1991.

ELOY, A.P. et al. Nature of soil suppressiveness to cowpea *Fusarium* wilt and population dynamics of *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.30, p.209-218, 2004.

EMBRAPA. **Manual de métodos de análise de solos**. 2.Ed. Rio de Janeiro: EMBRAPA, 1997.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 2. ed. Rio de Janeiro: EMBRAPA, 2006.

ETHUR, L. Z. **Dinâmica populacional e ação de *Trichoderma* no controle de fusariose em mudas de tomateiro e pepineiro**. 2006. 153 p. Tese (Doutorado em Agronomia- Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2006.

FEITOSA, Y. B. **Avaliação de fatores bióticos e abióticos no crescimento e esporulação de genótipos tropicais de *Trichoderma* spp.** 2016. 106 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, BA, 2016.

FERNANDES, M.R. **Manual para laboratório de fitopatologia**. Passo Fundo – RS: EMATER – CNPT, p. 128, 1993.

FERRAZ, D. M. M. **Controle de antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) em pós-colheita de goiaba (*Psidium guajava*), produzida em sistema de cultivo convencional e orgânico, pela aplicação de fosfitos, hidrotermia e cloreto de cálcio**. 2010. 103 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2010.

FERREIRA, D.F. **SISVAR - Sistema de análise de variância**. Versão 5.3. Lavras-MG: UFLA, 2010.

FISCHER, I. H.; LOURENÇO, S. A.; AMORIM, L. Doenças pós-colheita em citros e caracterização da população fúngica ambiental no mercado atacadista de São Paulo. **Tropical Plant Pathology**, v. 33, n. 3, p. 219-226, 2008.

GAMS, W.; BISSET, J. Morphology and identification of trichoderma, p. 3-74. In C.P. Kubicek, G.E. Harman and K.L. Ondik (eds.), ***Trichoderma e Gliocladium: Basic biology, taxonomy, and genetics***. Taylor & Francis, London, 1998, UK.

GASPERI, A. C. **Variabilidade de isolados, reação de cultivares e danos causados por *Fusarium solani* f. sp. *glycines***. 2008. 91p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS, 2000.

GHINI, R.; ZARONI, M. M. H. Relação entre coberturas vegetais e supressividade de solos a *Rhizoctonia solani*. **Fitopatologia Brasileira**, v.26, p.10-15, 2001.

GIOTTO, E.; ROBAINA, A. D. **A agricultura de precisão com o CR Campeiro 7**. Manual do usuário. Santa Maria: UFSM/Centro de Ciências Rurais/Departamento de Engenharia Rural/Laboratório de Geomática, 2007, 319 p.

GLIESSMAN, S. R. **Agroecologia: processos ecológicos em agricultura sustentável**. 3 ed. Porto Alegre: Ed. UFRGS, 2005.

GONZATTO, M. P. **Desenvolvimento e produção de citros em sistema agroflorestal**. 2009. 91p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2009.

GRAY, L.; POPE, R.A. Influence of soil compaction on soybean stand, yield and Phytophthora root rot incidence. **Agronomy journal**. Madison, v. 78, p. 189-191, 1986.

GRIMM, A. L. El niño, novamente! **Revista Brasileira de Meteorologia**, v. 30, n. 4, p. 351 - 357, 2015.

GRONDONA, I. et al. Physiological and Biochemical Characterization of *Trichoderma harzianum*, a biological control agent against soilborne Fungal plant pathogens. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.63, p. 3189-3198, 1997.

GRUPEX. **O cultivo dos citros no Rio Grande do Sul: referências tecnológicas**. Porto Alegre: FEPAGRO, 2005.

HAFIZI, R.; et al. Morphological and molecular characterization of *Fusarium solani* and *F. oxysporum* associated with crown disease of oil palm. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, p. 959-968, 2013.

HARAN, S.; SCHICKLER, H.; CHET, I. Molecular mechanisms of lytic enzymes involved in the biocontrol activity of 1 *Trichoderma harzianum*. **Microbiology**, Londres, v.142, p. 2321-2331, 1996.

HOFFMANN, C. A. et al. Potencial de antagonismo de isolados de *Trichoderma* sp. contra o isolados de *Fusarium* sp., in vitro. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v.10, n.1, p. 236 - 242, 2015.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística- Produção Agrícola Municipal. Disponível em:<<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/agric/default.asp?z=t&o=11&i=P>> Acesso em: 13/12/2015.

JACOBS, A. *Fusarium ananatum* sp. nov. in the Gibberella fujikuroi species complex from pineapples with fruit rot in South Africa. **Fungal Biology**, Oxford, v.114, n. 7, p. 515-527, 2010.

KATAKI, L. AL; **Identificação de raças de *Fusarium oxysporum* f. sp. phaseole na cultura do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*)**. 2014. 32 P. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Agronomia) - Uni- ANHANGUERA, CENTRO UNIVERSITÁRIO DE GOIÁS, Goiânia, GO, 2014.

Kern H. The naphthazarins of *Fusarium*. **Annals of Phytopathology**, Zurich, v.10, p. 45-327, 1978.

KING, K. F.; CHANDLER, N. T. **The wasted lands**: The program of work of the International Council for Research in Agro forestry (ICRAF). Kenya: Nairobi.1978.

KOIKE, C.M.; LUCON, C. M. M. Efeito de diferentes fatores na esporulação e crescimento de isolados de *Trichoderma spp.* **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.70, n. 3, p.96-99, 2003.

- KUHNEM JUNIOR, P. R. et al. Características patogênicas de isolados do complexo *Fusarium graminearum* e de *Fusarium verticillioides* em sementes e plântulas de milho. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.43, n.4, 2013.
- LARANJEIRA, F. F. et al. Controle das doenças causadas por fungos e bactérias em citros. In: ZAMBOLIM, L. et al. (Eds.). **Controle de doenças de plantas fruteiras**. Viçosa: UFV, 2002. p. 141-246.
- LARRALDE-CORONA, C.P. et al. Biocontrol potential and polyphasic characterization of novel native *Trichoderma* strains against *Macrophomina phaseolina* isolated from sorghum and common bean. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Münster, v.80, p.167-177, 2008.
- LIBARDI, P. L. **Dinâmica da água no solo**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2005. 335 p.
- LAZAROTTO, M. et al. Identificação de Fungos Emboloradores em Madeira de *Pinus spp.* em Laboratório. **Floram- Floresta e Ambiente**, Seropédica, v. 23, n. 4, p. 602-605, 2016.
- LAZAROTTO, M. **Identificação e caracterização de *Fusarium spp.* e *Pestalotiopsis spp.* associados a *Carya illinoensis* no Rio Grande do Sul**. 2013. 156 p. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2013.
- LESLIE, J.F.; SUMMERELL, B.A. **The *Fusarium* Laboratory Manual**. Ames: Blackwell Publishing, 2006. 388 p.
- LIU, B. et al. *Trichoderma* communities in soils from organic, sustainable, and conventional farms, and their relation with Southern blight of tomato. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 40, p. 1124-1136, 2008.
- MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aid in selection evaluation for seedling emergence and vigours. **Crop Science**, Madison, v. 2, n. 1, p. 176-177, 1962.
- MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. de. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. 2 ed., Piracicaba: POTAFOS, p. 319. 1997.
- MARTINS, M.K. **Variabilidade Genética de Isolados de *Fusarium spp.* e estudo da interação com a planta hospedeira**. 2005. 110 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.
- MELO, M. B. de; ANDRADE, L. N. T. Principais doenças da citricultura em Sergipe e seu controle. In: _____ **Aspectos Técnicos dos Citros em Sergipe**. 1º edição. Embrapa Tabuleiros Costeiros, Deagro, Aracajú. 2006. Cap. 8, p. 72-86.

MELZ, E. M.; TIAGO, P. V. Propriedades físico-químicas e microbiológicas do solo de um Parque em Tangará da Serra, MT, uma área de transição entre Amazônia e Cerrado. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 39, n. 4, p.829-834, 2009.

MENDONÇA, E. S.; CARDOSO, I. M.; JUCKSCH, I.; FERNANDES, R. B. A.; GARCIA, R.V. **Fatores edáficos de cafezais arborizados: processo de aprendizado contínuo com agricultores familiares**. In: ZAMBOLIM, L.; CAIXETA, E. T.; ZAMBOLIM, E. M. (Org.). Estratégias para produção de café com qualidade e sustentabilidade. 1ed.Viçosa - MG: Suprema Gráfica e Editora LTDA, 2010, v.1, p. 63-84.

Merten, G. H.; Minella, J. P. Qualidade da água em bacias hidrográficas rurais: um desafio atual para a sobrevivência futura. **Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável**, Porto Alegre, v. 3, n. 4, p. 33-38, 2002.

MEZZOMO, R. **Caracterização morfofisiológica, molecular, enzimática e compatibilidade vegetativa de *Fusarium oxysporum* e *F. solani* em erva-mate**. 2017. 100 p. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2017.

MICHEREFF, S. J. et al. Microbiota dos Solos Tropicais. In: **Ecologia e Manejo de Patógenos Radiculares em Solos**. Recife, UFRPE. 2005. Cap 4, p. 61-91.

MILANESI, P. M. **Aspectos biológicos da interação *Fusarium spp.* e *Trichoderma spp.* em solo compactado de aveia preta e soja sob plantio direto**. 2012. 128 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2012.

MONTEIRO, A. C. et al. Crescimento e esporulação de isolados de *Verticillium lecanii*. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.39, n.6, p.561-565, 2004.

MONTEIRO, M. C. P. **Identificação de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* em solos preservados do cerrado**. 2012. 74 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2012.

MONTEZANO, et al. Variabilidade espacial da fertilidade do solo em área cultivada e manejada homoganeamente. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa v. 30, n. 5., p. 839-847, 2006.

MOREIRA, F.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: UFLA, 2002.

MOTA, J. C. A. et al.; Algumas propriedades físicas e hídricas de três solos na Chapada do Apodi, RN, cultivados com melão. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.32, p. 49-58, 2008.

MUELLER-DOMBOIS, D. Ecological Measurements and Microbial Populations. In: **The fungal community its organization and role in ecosystem** (Wicklow, T.D. & Carrol, G.C. eds.). Marcel Dekker, Inc., New York, 1983. p.173-184.

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

Nemec S.; Baker R., Observations on *Fusarium solani* naphthazarin toxins, their action, and potential role in citrus plant disease. **Proceedings of the 7th Congress of the International Society for Citriculture**. v. 2, p.7-832, 1992.

NEGREIROS, R.F.D.; MOTA, J.C.A.; AMARO FILHO, J. Efeito da adição de compostos orgânicos na retenção de umidade em areias quartzosas. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA, 53, Salvador, 2001. **Anais/Resumos**. Salvador, 2001. CD-ROM

NELSON, P. E. et al. ***Fusarium* species, an illustrated manual for identification**. University Park: Pennsylvania State University Press, 1983. 193p.

OLIVEIRA, J. A. **Efeito do tratamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativus* L.) e pimentão (*Capsicum annum* L.)**. 1991. 111 p. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) – Universidade Federal de Lavras. Lavras, MG, 1991.

OLIVEIRA, J. M. de. **Caracterização morfológica molecular e patogênica de espécies de *Phytophthora* associadas aos citros**. 2008. 50p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2008.

PALACIOS, P. I. C. **Sistemas de cultivo de erva-mate: atributos físicos, indicadores de qualidade e estoque de carbono num Latossolo Vermelho Aluminoférrico**. 2010. 92 p. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2010.

PANZENHAGEN, N. V. et al. Aspectos técnico-ambientais da produção orgânica na região citrícola do Vale do Rio Caí, RS. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.1, p.90-95, 2008.

PEGORIM, Jócelia. Quando o El Niño vai terminar?. **Clima Tempo**, 19 nov. 2015. Disponível em < <https://www.climatempo.com.br/noticia/2015/11/19/quando-o-el-nino-vai-terminar--0786> > Acesso em: 23 abr. 2015.

PEREIRA, O. L. **Caracterização morfológica e molecular de fungos micorrízicos de sete espécie de orquídeas neotropicais**. 2001. 55 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2001.

PERES, E.; MELO, de I. S. Variabilidade entre isolados de *Trichoderma harzianum*. I - aspectos citológicos. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 52, n. 1, p. 56-59, 1995.

PETRY, et. al. Qualidade biológica do solo de sistemas de cultivo em pomares de *Citrus deliciosa*. **Ciência e Natura**, v. 34, n. 1, p. 63–79, 2012.

PFENNING, L. H. et al. Fungi associated with sudden death affected citrus plants. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, p. 217, 2006.

- PIETRZACKA, R. **Caracterização física e química de um Argissolo em área de citricultura orgânica com diferentes manejos da cobertura vegetal do solo.** 2009. 106 p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009.
- PILON, L. C. **Atributos de um Argissolo Amarelo coeso sob cultivo de cafeeiro a pleno sol e consorciado com espécies arbóreas.** 2013. 104 f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) -Programa de Pós Graduação em Ciências do Solo, UFES, Vitória, ES, 2013.
- PILON, L. C. **Interações entre a cobertura vegetal e os atributos do solo em citros cultivado nos sistemas convencional, orgânico e agroflorestal.** 2017. 126 p. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) – Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, UFSM, Santa Maria, RS, 2017.
- PRADE, C. A. et. Al. Diversidade de fungos do solo em sistemas agroflorestais de *Citrus* com diferentes tipos de manejo no município de Roca Sales, Rio Grande do Sul, Brasil. **Biociências**, Porto Alegre, v. 15, n. 1, p. 73-81, 2007.
- RAMOS, R. F. **Comparações produtiva, econômica e energética de sistemas convencional, orgânico e biodinâmico de cultivo de batata-doce (*Ipomea batatas*),** 2004. 87 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, 2004.
- RANGEL, C. N. et al. Nutritional value of organic acid lime juice (*Citrus latifolia* T.), cv. Tahiti. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 31, n.4, p 918-922, 2011.
- REICHARDT, K.; TIMM, L. C. **Solo, planta e atmosfera: conceitos, processos e aplicações.** São Paulo: Manole, 2004. 478 p.
- REIS, M. T. **Identificação e avaliação do potencial de uso de isolados de *Trichoderma* contra *Sclerotinia sclerotiorum* e *Sclerotium rolfsii*.** 2014. 133 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2014.
- RIBEIRO, J. M. **Atributos químicos e microbiológicos do solo em sistemas agroflorestais do norte de Minas Gerais.** 2014. 89 p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, UFMG, Monte Claros, MG, 2014.
- RIBEIRO, K. D. et al. Propriedades físicas do solo, influenciadas pela distribuição de poros, de seis classes de solos da região de Lavras-MG. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 31, n. 4, p. 1167-1175, jul./ago. 2007.
- RIOS, G. P. O inimigo está no solo. **Revista Cultivar Grandes Culturas**, Pelotas, maio 2001. Disponível em < <http://www.grupocultivar.com.br/artigos/o-inimigo-esta-no-solo>>. Acesso em: 17 jun. 2017.

RODRIGUEZ, O. Aspectos fisiológicos nutrição e adubação dos citros. In: RODRIGUEZ, O.; VIÉGAS, R.F.; POMPEU JÚNIOR, J.; AMARO, A.S., ed. **Citricultura brasileira**. 2.ed. Campinas: Fundação Cargill, p.419-475, 1991.

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.

SAMUELS, G.J.; *Trichoderma*: Systematics, the sexual state, and ecology. **Phytopathology**, v. 96, n. 2, p. 195-206, 2006.

SANTOS, dos G. C.; MONTEIRO, M. Sistema Orgânico de produção de alimentos. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v.15, n.1, p.73-86, 2004.

SANTOS, dos J. **Fitotoxinas de *Fusarium solani* associadas a limão cravo com sintomas de morte súbita dos citros**. 2009, 53 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2009.

SANTOS, C. V. dos. **Atributos físicos do solo e sistema radicular de bergamoteiras sob diferentes manejos da cobertura de entrelinhas do pomar**. 2013, 103 p. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2013.

SANOMIYA, L.T.; NAHAS, E. Microrganismos produtores de hidrolases envolvidos nas transformações dos compostos do carbono e do nitrogênio do solo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, n. 5, p. 835-842, 2003.

SANTOS, R. S.; BARRETO, P. A. B.; SCORIZA, R. N. Efeito da sazonalidade na comunidade de fungos micorrízicos arbusculares em um fragmento de mata de cipó em Vitória da Conquista, Bahia. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 12, p. 46-51, 2014.

SARTORI, I. A. et al. Caracterização e comparação de sistemas de cultivo orgânico e convencional de laranjeiras 'valência". **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, Porto Alegre, v. 10, n. 1-2, p. 145-152, 2004.

SCHAFFER, G.; DORNELLES, A. L C. Produção de mudas cítricas no Rio Grande do Sul - diagnóstico da região produtora. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.30, n.4, p.587-592, 2000.

SILVA, J. A. T. da, **Produção de quitinase e antagonismo de *Trichoderma* spp. contra *Fusarium solani* e *Scytalidium lignicola* e atividades enzimáticas antioxidantes em mandioca**. 2015, 67 p. Dissertação (Mestrado em Produção Agrícola) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Garanhuns, 2015.

SILVA, G. R.; SENA, W. L.; SILVA JUNIOR, M. L. Carbono e nitrogênio da biomassa microbiana como indicadores ambientais de um latossolo amarelo sob diferentes sistemas de manejo. **Revista de Ciências Agrárias**, Marituba, Pará, v. 48, p. 84, 2007.

SILVA, M. A. S. da. et al. Atributos físicos do solo relacionados ao armazenamento de água em um Argissolo Vermelho sob diferentes sistemas de preparo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.3, p. 544-552, mai-jun, 2005.

SILVA, L. S. da, et al. **Manual de calagem e adubação para os estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina**. 11. ed. 2016. 376 p.

SILVA, W, C. et al. Sucessões culturais na produção de feijão-caupi e sobre atributos químicos do solo infestado com *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*. Cadernos de Agroecologia. **Anais**. VII Congresso Brasileiro de Agroecologia, Fortaleza, 2011.

SOARES, J. M. **Caracterização morfológica, molecular e patogênica do agente etiológico da fusariose do abacaxizeiro no Brasil**. 2011. 59 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)- Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

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

STRACIERI, J. **Caracterização morfo-cultural e molecular de *Colletotrichum* spp. associados a antracnose em manga, mamão e goiaba**. 2015. 127 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2015.

STRECK, E. V. et al. **Solos do Rio Grande do Sul**. 2. Ed. Porto Alegre: EMATER/RS, 2008. 222 p.

TEDESCO, M.J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C.A.; BOHNEN, H. & VOLKWEISS, S.J. **Análise de solo, plantas e outros materiais**. 2.ed. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995. 147p. (Boletim Técnico, 5).

TOFFANO, L. et. al. Potencial do flavedo (epicarpo) de *Citrus aurantifolia* cv. Tahiti no controle do bolor verde e da antracnose em citros. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 38, n. 1, p. 61-66, 2012.

TOLEDO, J.A.; KAMINSKI, J.; SANTANNA, M.A. & SANTOS, D.R. Tampão Santa Maria (TSM) como alternativa ao tampão SMP para medição da acidez potencial de solos ácidos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 36, p. 427-435, 2012.

TOMITA, C. K. **Manejo em sistema orgânico e convencional: epidemiologia e controle em doenças em cultura de goiaba, gipsófila e pupunha**. 2009. 152p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília, Brasília, 2009.

TAMURA, K. et al. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology Evolution**, Oxford, v.24, n. 8, p. 1956-1599, 2007.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 22, n.22, 4673-4680, 1994.

TORSVIK, V.; OVREÅS, L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. **Current Opinion in Microbiology**, Amsterdam, v. 5, n. 3, p. 240–245, 2002.

TSUJI, S.S.; **Análise filogenética e patogênica do agente causal da fusariose do abacaxizeiro no Brasil**. 2012. 52 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)- Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2012.

WALKER, C. et al. Caracterização morfológica, molecular e patogenicidade de *Fusarium acuminatum* e *Fusarium verticillioides* a *Cordia americana*. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 26, n. 2, p. 463-473, 2016.

VELMOUROUGANE, K.; Impact of Organic and Conventional Systems of Coffee Farming on Soil Properties and Culturable Microbial Diversity. **Scientifica**, India, v.2016, p. 01-09, 2016.

ZILLI, J.E. et. al. Diversidade microbiana como indicador de qualidade do solo. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v. 20, n.3, p. 391-411, 2003.