



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE MESTRADO

**PATOGÊNESE DE *Aspergillus niger* E BIOCONTROLE DA
PODRIDÃO VERMELHA DO SISAL POR *Trichoderma* spp.**

JEFFERSON OLIVEIRA DE SÁ

CRUZ DAS ALMAS - BAHIA

MARÇO – 2009

PATOGÊNESE DE *Aspergillus niger* E BIOCONTROLE DA
PODRIDÃO VERMELHA DO SISAL POR *Trichoderma* spp.

JEFFERSON OLIVEIRA DE SÁ

Engenheiro Agrônomo

Universidade Federal da Bahia, 2005

Dissertação submetida ao Colegiado de curso do
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Agrárias da Universidade Federal do Recôncavo
da Bahia como requisito parcial para obtenção do
Grau de Mestre em Ciências Agrárias, Área de
Concentração: Fitotecnia.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Ana Cristina Fermino Soares

Co-orientador: Prof. Dr. Jorge Teodoro de Souza

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CRUZ DAS ALMAS - BAHIA - 2009

FICHA CATALOGRÁFICA

S111 Sá, Jefferson Oliveira de.
Patogênese de *Aspergillus niger* e biocontrole da podridão vermelha do sisal por *Trichoderma* spp. / Jefferson Oliveira de Sá. - Cruz das Almas, BA, 2009.
54 f. : il., tab. graf.

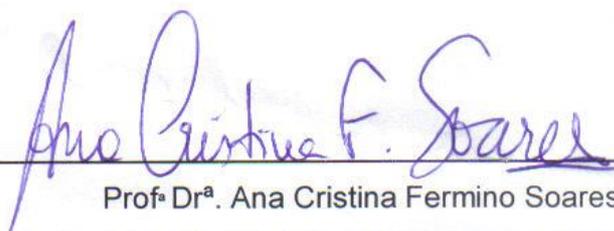
Orientador: Ana Cristina Fermino Soares.
Co-Orientador: Jorge Teodoro de Souza.
Dissertação (Mestrado) – Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

1. Agaveicultura – fitossanidade. 2. Sisal – fungos – controle.
I. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias Ambientais e Biológicas. II. Título

CDD 633.577

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS**

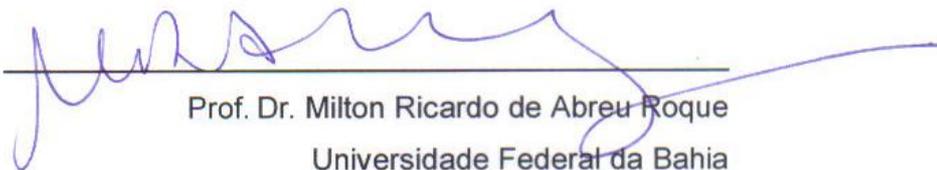
**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE
JEFFERSON OLIVEIRA DE SÁ**



Profª Drª. Ana Cristina Fermino Soares
Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas – UFRB
(Orientadora)



Dr. Harllen Sandro Alves Silva
Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical



Prof. Dr. Milton Ricardo de Abreu Roque
Universidade Federal da Bahia

Dissertação homologada pelo Colegiado do Curso de Mestrado em Ciências Agrárias em.....
Conferindo o Grau de Mestre em Ciências Agrárias em.....

A minha família que sempre acreditou e contribuiu para mais uma realização.

DEDICO

A minha companheira de todos os momentos, Ádila, por quem tenho um grande carinho e amor.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A DEUS pela força espiritual que sempre me manteve de pé nos momentos difíceis, tanto durante a realização deste trabalho como em todos os momentos durante toda minha trajetória de vida;

A Prof^a Dr^a Ana Cristina Fermino Soares, pela orientação, confiança, amizade e pela disposição em ajudar e contribuir de todas as formas possíveis para a realização do trabalho;

Ao meu Co-orientador Prof. Dr. Jorge Teodoro de Souza pelo profissionalismo, contribuições e ensinamentos, desde a idealização do projeto à pesquisa;

Ao Pesquisador Dr. Francisco Ferraz Laranjeira, pela grande ajuda na realização das análises estatísticas;

A Doutoranda Kátia Cristina Leão de Magalhães Abreu pelas sugestões, disponibilidade e viagens às áreas produtoras de sisal;

As Laboratoristas e amigas Marizete e Zozilene (meus braços no laboratório) pela amizade, colaboração, paciência e disposição em ajudar;

Aos amigos e colegas Augusto, Jurema, Carol, Darcilucia, Nailson pela amizade, força, sugestões e aprendizados;

Aos colegas e amigos do NEMA (Lica, Cristiane, Verinha, Eliane, Prof^o Rodrigo, Prof^o Phillippe, Murilo, Danilo, Tácio, Aline, Patrícia, Eveline, Claudia, Diogo, Igor, Edilla, Cleidiane, Márcia, Itamar) pela força e convívio;

Aos orientados Renata, Rafael, Caroline e Ana Claudia pela ajuda;

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciências Agrárias da UFRB pelos ensinamentos;

Aos colegas do curso de mestrado em ciências Agrárias (turma 2007) e do curso de mestrado em Microbiologia Agrícola pelo convívio e amizade;

À ADAB e, em especial, ao Gerente Regional da ADAB em Cruz das Almas, Sr. Cleômenes Nunes Torres e o técnico Sr. Erivaldo Leite Cardoso pela valiosa colaboração com as viagens às áreas produtoras de sisal;

A agência da ADAB em Miguel Calmon pela disponibilidade de áreas experimentais e auxílio dos técnicos no acompanhamento dos experimentos;

Aos produtores de sisal que disponibilizaram suas áreas para a coleta das amostras de solo e plantas;

Aos meus pais Geraldo e Graciete pela vida, apoio, incentivo e educação;

A minha avó e segunda mãe Bernadete pelo incentivo, fortalecimento e apoio;

A minha eterna companheira Ádila pelo amor e carinho;

Aos meus irmãos pelo convívio;

A todos os tios e tias que sempre incentivaram e depositaram confiança em mim;

Aos amigos Soelis Filho, Paulo, Fabio, Ariomar, Marcel, Carla, Luzia, Lícia, Márcio, Aurivan, Lerciano pela amizade e confiança em meu trabalho;

A FAPESB pela concessão da bolsa;

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Agrárias, pela disponibilidade de recurso para as viagens;

Enfim a todos que contribuíram direta e indiretamente para a realização deste trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

"O homem erudito é um descobridor de fatos que já existem. Mas o homem sábio é um criador de valores que não existem e que ele faz existir."
(Albert Einstein)

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	
ABSTRACT	
INTRODUÇÃO.....	01
Capítulo 1	
PATOGENICIDADE E AGRESSIVIDADE DE ISOLADOS DE <i>Aspergillus niger</i> , AGENTE CAUSAL DA PODRIDÃO VERMELHA DO SISAL (<i>Agave sisalana</i>).....	15
Capítulo 2	
SELEÇÃO DE <i>Trichoderma</i> spp. PARA O CONTROLE DA PODRIDÃO VERMELHA DO SISAL.....	32
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	53

PATOGÊNESE DE *Aspergillus niger* E BIOCONTROLE DA PODRIDÃO VERMELHA DO SISAL POR *Trichoderma spp.*

Autor: Jefferson Oliveira de Sá

Orientadora: Ana Cristina Fermino Soares

Co-Orientador: Jorge Teodoro de Souza

Resumo: O sisal é uma cultura de extrema importância para a região semi-árida do nordeste brasileiro, contribuindo na geração de emprego e renda em regiões com poucas alternativas para a produção agrícola. A podridão vermelha do caule do sisal causada pelo fungo *Aspergillus niger* é o principal problema fitossanitário da cultura, causando o seu declínio contínuo, expresso em redução da área cultivada, da produção e produtividade. O controle biológico é uma alternativa viável e fungos do gênero *Trichoderma spp.* têm sido destacados em trabalhos como agentes de controle de diversas fitomoléstias. A cultura do sisal ainda é muito pouco estudada e, para a adoção de medidas de controle da podridão vermelha, torna-se necessário conhecer esta doença. Sendo assim, este trabalho teve os seguintes objetivos: avaliar alguns componentes do patossistema sisal - *A. niger*, em mudas de sisal e selecionar isolados de *Trichoderma spp.* para o controle da podridão vermelha do sisal. Constatou-se que os sintomas da podridão vermelha só se expressam em plantas com lesões no caule, e que isolados de *A. niger* não oriundos de plantas doentes e nem da região sisaleira são patogênicos ao sisal, na presença de lesões no caule, porém com baixa agressividade. Foi desenvolvida a metodologia para testes de antagonismo para a seleção de isolados de *Trichoderma spp.*, por meio da utilização de discos do caule de mudas de sisal como substrato de crescimento de *A. niger* e *Trichoderma spp.*, e estes testes mostraram existir antagonismo entre esses microrganismos, destacando quatro isolados de *Trichoderma spp.* como potenciais agentes de biocontrole. Entretanto, quando avaliados em mudas de sisal nas condições ambientais do município de Miguel Calmon, em área produtora de sisal, na região semi-árida da Bahia, esses isolados não apresentaram eficiência em relação ao controle da podridão vermelha do sisal.

Palavras-chave: Agaveicultura, Fitossanidade, Semi-árido

PATHOGENESIS OF *Aspergillus niger* AND BIOCONTROL OF SISAL RED ROT DISEASE WITH *Trichoderma* spp.

Author: Jefferson Oliveira de Sá

Advisor: Ana Cristina Fermino Soares

Co-advisor: Jorge Teodoro de Souza

Abstract: Sisal (*Agave sisalana*) is a crop of great importance in the semi-arid region of Northeastern Brazil, contributing to the creation of jobs and income in areas with few alternatives for agricultural production. The red rot disease of sisal caused by the fungus *Aspergillus niger* is the main problem of the crop, causing a continuous decline of the plant, expressed as reduction in cultivated area, production and yield. The biological control is a viable alternative for control of sisal red rot, and fungi of the genus *Trichoderma* spp. have been pointed out in several studies as biocontrol agents for several plant diseases. There are very few studies about this crop and the definition of disease control methods demands a comprehensive knowledge of the disease. Thus, this work aimed at evaluating some components of the pathosystem sisal - *A. niger* in sisal seedlings and at selecting isolates of *Trichoderma* for control of sisal red rot disease. It was observed that disease symptoms only appeared in plants with lesions in the stem, and that isolates of *A. niger* obtained from the environment, and not from sisal plants, nor from sisal producing areas were pathogenic, although with lower aggressiveness when compared to strains isolated from sisal plants with red rot symptoms. A method for testing *in vitro* antagonism between *A. niger* and *Trichoderma* isolates with the use of sisal stem discs was developed. The *in vitro* testes allowed the selection of four promising *Trichoderma* spp. isolates. However, when these isolates were evaluated in the field under the semi-arid environmental conditions of the municipality of Miguel Calmon, they did not efficiently control sisal red rot disease.

Key-words: Red rot disease, Semi-arid region, *Agave sisalana*

INTRODUÇÃO

A cultura do sisal

O Sisal (*Agave sisalana* Perrine) pertence à família Agavaceae, subfamília Agavoidea e à classe das monocotiledôneas. É originário da península de Yucatan, no México, sendo vastamente distribuído nas regiões Nordeste do Brasil e Leste da África (SUINAGA et al., 2006). É uma espécie xerófila resistente a secas prolongadas e altas temperaturas. Apresenta bom desenvolvimento em locais com altitude de até 600 metros e regime de precipitação pluvial de 450 a 1200 mm/ano, e em solos alcalinos com média de pH 7,0 (BELTRÃO, 2006).

A planta adaptou-se muito bem às regiões semi-áridas do Nordeste brasileiro onde é cultivado em largas extensões, apresentando uma boa resistência ao ataque de pragas e doenças, em função da estrutura particular da folha e da rusticidade natural da planta, que parecem conferir uma proteção ao ataque de fungos e insetos (MEDINA, 1954).

O Nordeste é a única região produtora de sisal no Brasil, sendo o Estado da Bahia o maior produtor, contribuindo com aproximadamente 94 % da produção nacional de sisal. O cultivo do sisal se estende por 75 municípios baianos, atingindo uma área de 190 mil ha, em propriedades de pequeno porte, menores que 15 ha, nas quais predomina a mão-de-obra familiar, perfazendo uma população de aproximadamente 700 mil pessoas que vivem, direta ou indiretamente, em estreita relação com esta fibrosa. Em 2006, no primeiro trimestre, as exportações baianas do segmento de sisal e derivados tiveram um aumento de 36 % em relação ao mesmo período do ano anterior, passando de US\$ 18,5 milhões para US\$ 25,1 milhões. O valor médio do produto exportado também aumentou cerca de 9,3 %, chegando a US\$ 875 por tonelada, entre manufaturados e fibra beneficiada (SINDIFIBRAS, 2006).

O sisal teve seu apogeu econômico durante a Crise do Petróleo nas décadas de 60 e 70. Apesar da existência e utilização das fibras sintéticas, a necessidade de preservação da natureza e a forte pressão dos grupos ambientalistas vêm contribuindo para o incremento da utilização de fios naturais, onde se destaca a fibra de sisal (WIKIPEDIA, 2008).

Nas regiões semi-áridas do nordeste brasileiro, milhares de famílias trabalham com o sisal, desde a sua produção no campo ao seu beneficiamento nas fábricas e a comercialização de seus produtos, constituindo-se na única ou principal fonte de renda familiar. Nessas regiões, o sisal é a cultura de maior importância na renda dos produtores e na fixação do homem no meio rural.

A podridão vermelha do sisal

Apesar da rusticidade e resistência da planta ao ataque de insetos e fitopatógenos, devido à epiderme da folha possuir uma cutícula espessa e cerosa, conferindo uma barreira natural à penetração de microrganismos patogênicos, o sisal pode ser afetado por doenças capazes de causar sérios prejuízos à cultura (BOCK, 1965; MEDINA, 1954).

Várias doenças podem afetar o sisal, mas apenas duas foram relatadas até o presente no Brasil: a antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum agaves* (MEDINA, 1954), que não se constitui propriamente em um problema fitossanitário de importância econômica, e a podridão vermelha do caule, conhecida também como podridão do tronco do sisal, podridão vermelha do sisal, podridão do cepo, podridão úmida do cepo ou ainda podridão parda do colo (LIMA et al., 1998; COUTINHO et al., 2006; SOARES et al., 2006). A podridão vermelha tem afetado desde a década de 1970, a cultura do sisal nas principais áreas produtoras dos Estados da Bahia, Paraíba e Rio Grande do Norte, atingindo níveis críticos a partir de 1998. Na Bahia, a incidência da doença varia entre as regiões de cultivo, sendo que em algumas não ultrapassa 5 % da área enquanto que em outras pode alcançar 65 % de infestação.

A doença apareceu pela primeira vez no Brasil no Estado da Paraíba, segundo dados de Machado (1951), citado por Medina (1954). Na Bahia, foi constatada pela primeira vez por pesquisadores da Embrapa Semi-Árido e EBDA, na fazenda Mandacaru, município de Santaluz - BA, em um plantio comercial de

500 hectares de sisal (LIMA et al., 1998). Atualmente, na Bahia tem sido constatado um aumento significativo na incidência da podridão vermelha do caule do sisal, resultando em perdas consideráveis para os produtores.

A doença é caracterizada pelos seguintes sintomas: coloração vermelha que se estende do caule para a base das plantas, com amarelecimento das folhas. A planta infectada fica amarelada e murcha, o caule apodrece e se desprende facilmente do solo, levando a planta à morte. Devido ao clima, alguns produtores acreditam que o problema é causado pela seca (LIMA et al., 1998). Em plantas com estádios avançados da doença, as folhas ficam amareladas e o caule apodrece completamente. Apesar da doença causar a morte da planta, as plantas de sisal infectadas pelo patógeno sobrevivem por algum tempo, por que o apodrecimento do caule, resultante da colonização pelo patógeno, ocorre de forma lenta (BOCK, 1965). As folhas de plantas afetadas pela podridão vermelha não servem para o desfibramento e aproveitamento das fibras e as plantas sintomáticas morrem com o progresso da doença.

Embora os fungos *Pythium aphanidermatum*, *Lasiodiplodia theobromae* e *Aspergillus niger* tenham sido relatados como causadores de podridões no caule do sisal (BOCK, 1965; LIMA et al., 1998; IKITOO e KHAYRALLAH, 2001), Coutinho et al., (2006) e Soares et al., (2006) identificaram somente *Aspergillus niger* como o agente causal da podridão vermelha do sisal nos Estados da Paraíba e Bahia.

Aspergillus niger é um fungo mitospórico, pertencente à ordem Moniliales, típico de solo, que sobrevive normalmente como saprófita, podendo causar doenças como podridão do colo do amendoim, principalmente em solos com baixa matéria orgânica (MORAES et al., 1997).

A capacidade de penetração e colonização de *A. niger* está na dependência do estado em que se encontra o hospedeiro. Quando submetidas a algum tipo de estresse, as plantas ficam mais predispostas à infecção (ROGER, 1953; citado por SOUZA FILHO et al., 1979). Segundo Wallace & Diekmahns (1952); Lock (1969) e Lima et al., (1998), o patógeno causador da podridão vermelha no sisal não penetra em tecidos não injuriados do hospedeiro, necessitando, portanto, de lesões de origem mecânica ou fisiológica.

Controle Biológico

Não existem produtos químicos registrados para o controle da podridão vermelha do sisal. Além disso, existe a grande preocupação da sociedade com a contaminação do ambiente por pesticidas e existem mercados ávidos por produtos agrícolas diferenciados, produzidos sem uso de pesticidas. Esses produtos químicos têm efeitos negativos sobre o solo, o clima, a vegetação, as águas, os animais e o homem, e ainda provocam a seleção de microrganismos resistentes a estes produtos, como resultado da forte pressão de seleção. Além disso, o tempo de degradação desses produtos químicos no ambiente é da ordem de décadas, causando o acúmulo dessas substâncias em concentrações elevadas na cadeia alimentar. Nesse contexto, os métodos do controle de doenças de plantas vêm sendo aperfeiçoados com objetivo de assegurar o uso racional de produtos químicos, bem como, garantir a rentabilidade da atividade do agricultor e diminuir os riscos à saúde humana e ao meio ambiente. Assim, o controle biológico se constitui numa alternativa para a substituição ou a diminuição da utilização de agroquímicos (SANHUEZA, 2001 citado por MENEZES, 2002; BETTIOL, 2001; FRANCESCHINI, 2001).

O Controle Biológico de doenças de plantas iniciou-se como ciência em 1926, quando B. B. Sanford publicou um trabalho sobre fatores que afetavam a patogenicidade de *Streptomyces scabies*, agente causal da sarna comum da batata. Em 1931, Sanford e W. C. Broadfoot empregaram pela primeira vez o termo 'controle biológico' em um artigo sobre o mal-do-pé do trigo, causado por *Gaeumannomyces graminis* (BACKER & COOK, 1974).

Dentre as várias definições para controle biológico, a de maior aceitação entre pesquisadores dessa área de atuação é descrita por Baker & Cook (1974) como sendo a redução da densidade do inóculo ou das atividades determinantes de doença por um patógeno ou parasita, promovida por um ou mais organismos que não o homem, favorecidos naturalmente ou pela manipulação do seu habitat ou ambiente, hospedeiros ou antagonistas ou pela manipulação em massa de um ou mais antagonistas (BETTIOL & GHINI, 1995).

O controle biológico de doenças de plantas pode também ser definido como a redução da densidade de inóculo ou das atividades determinantes da doença, através da ação de um ou mais organismos. Nesta definição, segundo

Junqueira e Gasparotto (1991), as atividades determinantes da doença envolvem crescimento, infectividade, agressividade, virulência e outros atributos do patógeno ou processos que determinam a infecção, o desenvolvimento dos sintomas e a reprodução.

O termo organismos inclui indivíduos ou populações avirulentas ou hipovirulentas dentro das espécies patogênicas, bem como outros antagonistas aos patógenos. Este termo é utilizado para designar agentes biológicos com potencial para interferir nos processos vitais dos fitopatógenos, devendo estes estar adaptados ecologicamente ao mesmo tecido das plantas que os ocupados pelos patógenos, mas sendo não patogênicas às mesmas (BETTIOL & GHINI, 1995).

Outra definição de controle biológico é o controle de um microrganismo por outro microrganismo (MELO & AZEVEDO, 1998).

O controle biológico visa manter, através de certas práticas, um equilíbrio no agroecossistema, de modo que o hospedeiro, na presença do patógeno, não sofra danos significativos, em função da ação controladora dos organismos não patogênicos do sistema (BETTIOL, 1991). Assim sendo, este método de controle inclui práticas culturais que promovem um ambiente favorável aos antagonistas e à resistência da planta hospedeira ou ambos; o melhoramento da planta para aumentar a resistência ao patógeno ou adequar o hospedeiro para as atividades antagônicas de microrganismos; a introdução em massa de antagonistas, linhagens não patogênicas ou outros organismos benéficos (CARDOSO, 1978).

Na abordagem de controle biológico, doença é mais do que uma íntima interação do patógeno com o hospedeiro, influenciada pelo ambiente. É o resultado de uma interação entre hospedeiro, patógeno e uma variedade de não-patógenos que também repousam no sítio de infecção e que apresentam potencial para limitar ou aumentar a atividade do patógeno, ou a resistência do hospedeiro. Portanto, patógeno, hospedeiro e antagonistas, interagindo num sistema biológico, são os fatores componentes do controle biológico (BACKER & COOK, 1974). O ambiente é composto de vários fatores (solo, temperatura, potencial hídrico, pH) que devem estar relacionados entre si e com os organismos habitantes do sistema. A interação entre antagonista, hospedeiro e patógeno não ocorre de maneira individual, mas mutuamente.

Os mecanismos das interações entre microrganismos patogênicos e antagonistas que fundamentam o controle biológico podem ser divididos em competição, antibiose e parasitismo, além de hipovirulência, predação e indução de defesa do hospedeiro. Para que um antagonista seja bem sucedido é preciso que ele tenha capacidade de se multiplicar e colonizar a superfície da planta, podendo este atuar por meio de um ou mais mecanismos (BETTIOL & GHINI, 1995).

A antibiose é definida como a interação entre organismos na qual um ou mais metabólitos antibióticos, voláteis ou não-voláteis, são produzidos e secretados pelo fungo antagonista, tendo efeito danoso ao fungo patogênico. A capacidade para produzir tais substâncias e o seu efeito fungicida pode variar entre espécies e entre isolados da mesma espécie. Competição é referente à interação entre dois ou mais organismos empenhados numa mesma ação ou substrato, disputando recursos tais como espaço, nutrientes, água e luz. O micoparasitismo refere-se à situação em que o microrganismo antagonista vive sobre ou dentro do fungo hospedeiro, alimentando-se e desenvolvendo-se às expensas deste. Dentre as diversas etapas do processo, merece destaque a produção e liberação no meio externo de enzimas hidrolíticas, tais como quitinases, glucanases, celulasas e proteases, cuja função principal é degradar a parede celular do patógeno (BETTIOL & GHINI, 1995).

O desenvolvimento de microrganismos na superfície foliar é afetado pela quantidade e pela qualidade dos nutrientes disponíveis no filoplano. Os microrganismos selecionados do mesmo ambiente onde serão utilizados têm melhor chance de se adaptarem e de serem eficientes, e neste caso são conhecidos como microrganismos residentes. O microrganismo estranho (exótico ou introduzido), geralmente tem pouca persistência no ambiente, devendo ser reaplicados com maior frequência (LUMSDEN & LOCKE, 1989).

Não basta o antagonista ser um potente agente de controle *in vitro*. É preciso, pois, conhecer os fatores ecológicos que podem afetar o desempenho e, adotar práticas de manejo adequadas para favorecer a sua permanência e atividade no ambiente (LUMSDEN & LOCKE, 1989).

Os testes de seleção de microrganismos com potencial antagonista podem ser realizados *in vitro* e *in vivo*. Neste caso, em condições controladas ou em condições naturais. Ambos os métodos são complementares.

Antes que o controle biológico chegue a ser um componente importante no manejo de enfermidades de plantas, ele deve ser efetivo, confiável, consistente e econômico. E para alcançar esses critérios, devem ser selecionadas cepas superiores (por escrutínio e seleção de isolados, ou por manipulação genética), juntamente com sistemas de aplicação que complementem a atividade biocontroladora (LUMSDEN & LOCKE, 1989).

A maioria dos estudos publicados ressalta a utilização de fungos pertencentes ao gênero *Trichoderma* como agentes de controle biológico efetivo de enfermidade importantes que acometem culturas de importância econômica e mundial, pois atuam como antagonistas naturais de vários fungos fitopatogênicos (BENITEZ et al., 1998; STEYAERT et al., 2003). Bastos (1996) relatou que espécies de *Trichoderma* em geral destacam-se tanto no controle de fitopatógenos habitantes do solo como no controle da parte aérea de plantas.

***Trichoderma* spp.**

Diversos microrganismos têm revelado potencial antagônico a diferentes fitopatógenos, principalmente fungos habitantes do solo. Entre os fungos do solo com ação comprovada contra patógenos do solo, têm-se destacado isolados selvagens e melhorados de *Trichoderma* spp. (REIS et. al., 1995). Estes são reconhecidamente os hiperparasitas mais importantes e mais estudados, pois exibem variabilidade entre as linhagens com relação à atividade de biocontrole, espectro de ação contra hospedeiros, propriedades fisiológicas e bioquímicas, como também, adaptabilidade ecológica e ambiental (SILVA, 2000). Esse hiperparasita tem a fase sexuada no Phylum Ascomycota, Classe Euasmycetes, Ordem Hypocreales, Família Hypocreaceae, gênero *Hypocrea* (MONTE, 2001), sendo as espécies *T. Harzianum*, *T. virens*, e *T. viride* as mais utilizadas como agentes de controle biológico de fitopatógenos (HERMOSA et. al, 2000). Segundo esses autores algumas espécies de *Trichoderma* são morfologicamente similares ao estágio anamórfico (fase sexuada), apresentando proximidade taxonômica. Entretanto muitas linhagens, incluindo as utilizadas para biocontrole, são classificadas como fungo imperfeito (MONTE, 2001).

O gênero *Trichoderma* é representado por fungos não patogênicos, habitantes do solo, que exercem antagonismo a vários fitopatógenos, através do

micoparasitismo e/ou antibiose, bem como por hiperparasitismo (MELO, 1998). Também colonizam materiais de plantas herbáceas e lenhosas, onde o estágio sexual teleomorfo (*Hypocrea*) freqüentemente tem sido encontrado (HARMAN et al, 2004).

O fungo *Trichoderma* é um agente de controle biológico por ser antagonista a vários fungos fitopatogênicos, podendo exercer o controle indiretamente, competindo por espaço e nutrientes, modificando as condições ambientais, produzindo antibióticos, inativando as enzimas do patógeno ou, diretamente, mediante o micoparasitismo (BENITEZ et al, 2004).

Diversos trabalhos têm demonstrado o sucesso do uso de *Trichoderma* no controle de diversos patógenos do solo como *Pythium* spp. (NASEBY et al, 2000; THRANE et al, 2000), *Rhizoctonia solani*. (CÚNDOM et al, 2003), *Phytophthora* spp. (ETEBARIAN et al., 2000, EZZIYYANI et al, 2007) e *Sclerotinia sclerotiorum*, agente causal do mofo-branco do feijoeiro (ETHUR et al. 2001); e da parte aérea como *Botrytis cinerea*. (HJELJORD et al, 2001, LISBOA et al, 2007) e *Moniliophthora perniciosa*, agente causal da vassoura-de-bruxa do cacauero (BEZERRA et al. 2003) entre outros fitopatógenos.

O gênero *Trichoderma* compreende espécies de fungos filamentosos, mesofílicos com alta capacidade de tolerar ampla faixa de temperatura, sendo mais efetivos em temperaturas próximas a 25°C (MCBEATH & ADELMA, 1991; HJELJORD et al, 2001), que normalmente habitam o solo estando amplamente distribuídos por todo o mundo, ocorrendo em quase todos os tipos de solo e ambientes naturais, especialmente naqueles contendo matéria orgânica. Muitas espécies do gênero são encontradas na rizosfera de plantas. O fato das espécies de *Trichoderma* se desenvolverem em um amplo espectro de substratos e condições ambientais torna este fungo de grande interesse biotecnológico (ESPOSITO & SILVA, 1998; SAMUELS, 1996).

Os fungos do gênero *Trichoderma* são excelentes hiperparasitas, pois atacam hifas e estruturas de reprodução e sobrevivência dos patógenos de plantas, reduzindo a infecção e o inóculo do patógeno. A capacidade saprofítica de *Trichoderma* está na quantidade de enzimas hidrolíticas produzidas e liberadas. Estas enzimas apresentam efeito sinérgico com os antibióticos visto que a ação antifúngica de ambos compostos tende a ser superior a qualquer um deles agindo separadamente (BETTIOL & GHINI, 1995).

Entre os modos de ação, o micoparasitismo é o que mais se destaca, pela complexidade e número de etapas envolvidas (LIMA et al, 2001).

As enzimas hidrolíticas são aquelas produzidas e liberadas pelos fungos antagonistas durante o seu processo micoparasítico para degradar os componentes constituintes da parede celular dos patógenos. Estas devem manter-se presentes para exercer o papel lítico significativo (LORITO et al., 1994).

A viabilidade celular depende da integridade dos componentes de sua parede celular, a qual funciona como barreira seletiva ante as pressões físico-químicas exercidas pelo meio ambiente em que o microorganismo sobrevive. Tal barreira é o ponto inicial das interações envolvidas no processo de antagonismo entre fungos (LORITO et al., 1994). As enzimas hidrolíticas capazes de causar a lise dos componentes da parede celular desempenham, portanto, papel fundamental no processo antagônico do micoparasitismo.

As enzimas de alguns fitopatógenos são responsáveis pela hidrólise dos componentes pécticos da parede celular das plantas. Quando presente, *Trichoderma harzianum*, por exemplo, secreta proteases sobre a superfície da planta que inibem a ação das enzimas hidrolíticas desses fitopatógenos (ELAD et al, 1999).

Os efeitos indiretos incluem a indução de resistência, na qual plantas são capazes de produzir uma resposta imune após uma primeira infecção por patógenos, que é conhecida como resistência sistêmica adquirida - SAR (VAN LOON et al, 1998). Linhagens de fungos do gênero *Trichoderma* colonizam e penetram tecidos das raízes de plantas, causando alterações morfológicas e bioquímicas nas plantas, consideradas como parte de defesa da planta, que no final, leva a mesma a induzir SAR (BAILEY & LUMSDEN, 1998). A ativação do sistema de defesa da planta na associação da raiz tratada com *T. harzianum* foi sugerida por Yedidia et al (1999).

Outros efeitos indiretos também são citados como a tolerância ao estresse devida ao desenvolvimento de raízes e tronco, bem como a solubilização e absorção de nutrientes inorgânicos. Os mecanismos não são excludentes, mas atuam sinergicamente no controle dos patógenos. A importância relativa de cada um deles depende de cada interação antagonista - patógeno e das condições ambientais (HARMAN & KUBICEK, 1998).

Diante das características positivas de *Trichoderma* spp., este trabalho teve como objetivos principais, selecionar isolados de *Trichoderma* spp. para o controle da podridão vermelha do sisal e estudar alguns componentes do patossistema *Aspergillus niger* - sisal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAILEY, B.A. & LUMSDEN, R.D. Direct effects of *Trichoderma* and *Gliocladium* on plant growth and resistance to pathogens. In: KUBICEK, C.P.; HARMAN, G.E.; ONDIK, K.L. (Eds). ***Trichoderma and Gliocladium: Enzymes, Biological Control and Commercial Applications***. Taylor and Francis, London, pp.185-204, 1998.

BAKER, K. F.; COOK, J. **Biological control of plant pathogens**. San Francisco. American Phytopathological Society. 1974.

BASTOS, C.N. Mycoparasitic nature of the antagonism between *Trichoderma viride* and *Crinipellis pernicioso*. **Fitopatol Bras**, v. 21, p. 50-54, 1996.

BELTRÃO, N.E.M. A planta. In: ANDRADE, W.(Ed.). **O Sisal do Brasil**. 1.ed. Salvador: SINDIFIBRAS; Brasília: APEX-Brasil, 2006. p.25-28.

BENITEZ, T.; LIMÓN, C.; DELGADO-JARANA, J.; REY, M. Glucanolytic and other enzymes and their genes. In: HARMAN, G.E.; KUBICEK, C.P., (Eds). ***Trichoderma and Gliocladium – enzymes, biological control and commercial applications***. London, Taylor & Francis, v.2, p. 101-127, 1998.

BETTIOL, W. Componentes do Controle biológico de doenças de plantas. In: BETTIOL, W. (Org.). **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: Embrapa-Cnpda, 1991. 338p. (Embrapa-Cnpda. Documentos, 15).

BETTIOL, W. Métodos alternativos para o controle de doenças de plantas. In: MICHEREFF, S. J.; BARROS, R. (Eds). **Proteção de plantas na agricultura sustentável**. Recife: UFRPE, p. 123-139, 2001.

BETTIOL, W.; GHINI, R. Controle biológico . In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L (Eds). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Agrônômica Ceres, p. 717-727, 1995.

BEZERRA, J. L; COSTA, J. C. B; BASTOS, C. N; FALEIRO, F. G. *Hypocrea stromatica* sp. nov. teleomorfo de *Trichoderma stromaticum*. **Fitopatologia Brasileira**. v. 28, p.408-412, 2003.

BOCK, K.R. Diseases of sisal. **World Crops**, v.17, n.1, p.64-67, 1965.

CARDOSO, E. J. B. N. Relações ecológicas entre microorganismos. In: GALLI, F. (ed) **Manual de Fitopatologia**. São Paulo, SP, Ceres, v.1. 1978. 373 p.

COUTINHO, W.M.; SUASSUNA, N.D.; LUZ, C.H.; SUINAGA, F.A.; SILVA, O.R.R.F. Bole rot of sisal caused by *Aspergillus niger* in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n. 6, p. 605, 2006.

CÚNDOM, M.A.; MAZZA, S.M. & GUTIÉRREZ, S.A. Short communication. Selection of *Trichoderma* spp. Isolates against *Rhizoctonia solani*. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v.1, n.4, p.79-81, 2003.

ELAD, Y., DAVID, D.R., LEVI, T., KAPAT, A. & KIRSHNER, B. *Trichoderma harzianum* T-39-mechanisms of biocontrol of foliar pathogens. In: LYR, H.; RUSSEL, P.E.; DEHNE, H.W.; SISLER, H.D. (Eds.) **Modern fungicides and antifungal compounds II**. Andover, MA, UK: Intercept, p.459-467, 1999.

ESPOSITO, E., SILVA, M. Systematics and environmental application of the genus *Trichoderma*. **Critical Reviews in Microbiology**, v.24, n.2, p.89-98, 1998.

ETEBARIAN, H.R.; SCOTT, E.S. & WICKS, T.J. *Trichoderma harzianum* T39 and *T. virens* DAR 74290 as potencial biological control agent for *Phytophthora erythroseptica*. **European Journal of Plant Pathology**, v.106, p.329-337, 2000.

ETHUR, L.Z; CEMBRANEL, C.Z; SILVA, A. C. F. Seleção de *Trichoderma* spp. visando ao controle de *Sclerotinia sclerotiorum*, in vitro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.31, n.5, p.885-887, 2001.

EZZIYYANI, M.; REQUENA, M. E.; EGEA-GILABERT, C. & CANDELA, M. E. Biological Control of *Phytophthora* Root Rot of Pepper Using *Trichoderma harzianum* and *Streptomyces rochei* in Combination. **Journal of Phytopathology**, v.155, n.6, p.342-349, 2007.

FRANCESCHINI, M. Biotecnologia aplicada ao controle biológico. **Biotecnologia, ciência e desenvolvimento**, n.23, p.32-37, 2001.

HARMAN, G.E. & KUBICEK, C.P. ***Trichoderma and Gliocladium***. London, Taylor and Francis, 1998. 393 p.

HARMAN, G.E., HOWEL, C.R., VITERBO, A.; CHET, I. & LORITO, M. *Trichoderma* species- opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews/Microbiology**, v.2, 43-56, 2004.

HERMOSA, M.R., GRONDONA, I., ITURRIAGA, E.A., DIAZ-MINGUEZ, J.M., CASTRO, C., MONTE, E. & GARCIA-ACHA, I. Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. **Applied Environmental Microbiology**, v.66, p.1890-1898, 2000.

HJELJORD, L.G., STENSVAND, A. & TRONSMO, A. Antagonism of nutriente-activated conidia of *Trichoderma harzianum* (*atroviride*) P1 against *Botrytis cinerea*. **Phytopathology**, v.91, n.12, p.1172-1180, 2001.

IKITOO, E.C., KHAYRALLAH, W.A. **Sisal: Past research results and present production practices in East Africa – present status, problems, opportunities and future prospects.** Vienna: United Nations Industrial Development Organization, Common Fund for Commodities, 2001. (Technical Paper nº 8).

JUNQUEIRA, N.T.V; GASPAROTTO, L. Controle biológico de fungos estomáticos causadores de doenças foliares em seringueira. In: BETTIOL, W., (Ed.). **Controle biológico de doenças de plantas.** Jaguariúna, CNPDA/EMBRAPA, p. 307- 331, 1991.

LARANJEIRA, D. Utilização de micorrizas no manejo de doenças de plantas. In: MICHEREFF, S. J., BARROS, R. (Org.). **Proteção de Plantas na Agricultura Sustentável.** 1ed. Recife: Imprensa Universitária, 2001, v.1, p.105-125.

LIMA, E.F.; MOREIRA, J. de A.N.; BATISTA, F.A.S.; SILVA, O.R.R.F.da; FARIAS, F.J.C.; ARAÚJO, A.E. Podridão vermelha do tronco do sisal (*Agave sisalana* Perr.) causada por *Botryodiplodia theobromae* Pat. **Revista de Oleaginosas e Fibrosas**, Campina Grande, v.2, n.2, p.109-112, 1998.

LIMA, L.H.C., DE MARCO, J.L.; QUEIROZ, P.R., ULHOA, C.J. & FELIX, C.R. **Método de purificação de uma endoquitinase de *Trichoderma harzianum* com atividade sobre a parede celular de fungos fitopatogênicos.** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001. 32p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 11).

LISBOA, B.B.; BOCHESSE, C.C.; VARGAS, L.K.; SILVEIRA, J.R.P.; RADIN, B. & OLIVEIRA, A.M.R. DE O. Eficiência de *Trichoderma harzianum* e *Gliocladium viride* na redução da incidência de *Botrytis cinerea* em tomateiro cultivado sob ambiente protegido. **Ciência Rural**, v.37, n.5, p.1255-1260, 2007

LOCK, G.W. **Sisal.** London: Longman, 1969. 365p.

LORITO, M.; HARMAN, G.E; HAYES, C.K; BRODWAY, R.M; TROSMO, A.; WOO, S.L; PIETRO, A. Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*, antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase. **Phytopathology**, v.83, p. 302-307, 1994.

LUMSDEN, R.D; LOCKE, J.C. Biological control of damping-off caused by *Phytophthora ultimum* and *Rhizoctonia solani* in soilless mix. **Phytopathology**, v.79, p.361-366, 1989.

MCBEATH, J. & ADELMAN, M. Taxonomy of a new *Trichoderma* found in Alaska. Abstract. **Phytopathology**, v.81, n.10, p.1151, 1991.

MEDINA, J. C. **O Sisal.** São Paulo: Secretaria da Agricultura, Diretoria de Publicidade Agrícola, 1954, 286p.

MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L.; (ed.). **Controle biológico:** v. 1. Jaguariúna, SP, Embrapa, 1998. 262p.

MENEZES, J. P. **Trichoderma spp - microrganismo utilizado no controle de fitopatógenos**. 2002. Disponível em: <<http://www.agronline.com.br/artigos/artigo.php?id=91>> Acesso em: 07 de abril de 2007.

MONTE, E. Understanding *Trichoderma*: between biotechnology and microbial ecology. **International of Microbiology**, v.4, n.1-4, 2001.

MORAES, S. A.; GODOY, I.J. Amendoim (*Arachis hypogaea* L.) Controle de doenças. In: VALE, F. X. R.; ZAMBOLIN, L. (Eds). **Controle de doenças de plantas: grandes culturas**. Ed. UFV, Viçosa, Minas Gerais, p.1-43, 1997.

NASEBY, D.C.; PASCUAL, J.A. & LYNCH, J.M. Effect of biocontrol strains of *Trichoderma* on plant growth, *Phitium ultimum* populations, soil microbial communities and soil enzyme activities. **Journal of Applied Microbiology**, v.88, p.161-169, 2000.

REIS, A.; OLIVEIRA, S. M. A.; MENEZES, M. et al. Potencial de isolados de *Trichoderma* para biocontrole da murcha de *Fusarium* do feijoeiro. **Summa Phytopathologica**, São Paulo, v.21, n.1, p.16-20, 1995.

SAMUELS, G. J. *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. **Mycology Research**, v.100, p.923-935, 1996.

SILVA, P. R. Q. da. Transformação de *Trichoderma harzianum* com os genes da proteína fluorescente verde e de resistência ao fungicida benomil. **Tese de doutorado**, Brasília, UnB, 2000, 130p.

SINDIFIBRAS. **O Projeto Sisal-Apex traz resultados positivos para as exportações baianas de sisal no primeiro trimestre do ano, que cresceram quase 40%**. Disponível em: <www.braziliansisal.com> Acesso em 08 jun 2006.

SOARES, A. C. F.; SALOMÃO, M. S.; ALMEIDA, N. de S.; PEREZ, J. O.; GARRIDO, M. da S. *Aspergillus niger* como agente causal de manchas foliares e podridão do pseudocaule do sisal. In: **XXXIX Congresso Brasileiro de Fitopatologia**, 2006, Salvador, BA.

SOUZA FILHO, F.B.; SANTOS FILHO, H.P.; ROBBS, C.F. Etiologia da queima das folhas do coqueiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.4, n.1, p.5-10, 1979.

STEYAERT, J.M.; RIDGWAY, H.J.; ELAD, Y.; STEWART, A. Genetic basis of mycoparasitism: a mechanism of biological control by species of *Trichoderma*. **New Zeal J Crop Horti Sci**, v.31, p.281-91, 2003.

SUINAGA, F.A.; SILVA, O.R.R.F.; COUTINHO, W.M. A história. In: ANDRADE, W. (Ed.) **O Sisal do Brasil**. 1.ed. Salvador: SINDIFIBRAS; Brasília: APEX-Brasil, p.19-21, 2006.

THRANE, C.; FUNCK JENSEN, D. & TRONSMO, A. Substrate colonization, strains competition, enzyme production in vitro, and biocontrole of *Pythium*

ultimatum by *Trichoderma* spp. Isolates P1 and T3. **European Journal of Plant Pathology**, v.106, p.215-220, 2000.

VAN LOON, L.C., BAKKER, P.A.H.M. & PIETERSE, C.M.J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v.36, p.453-483, 1998.

WALLACE, M.M., DIECKMAHNS, E.C. Bole rot of sisal. **The East African Agricultural Journal**, v.18, n.1, p.24-29, 1952.

WIKIPEDIA. **Sisal**. Disponível em: < <http://pt.wikipedia.org/wiki/Sisal>> Acesso em: 28/12/2008.

YEDIDIA, I., BENHAMOU, N. & CHET, I. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p.1061-1070, 1999.

CAPÍTULO 1

**PATOGENICIDADE E AGRESSIVIDADE DE ISOLADOS DE *Aspergillus niger*,
AGENTE CAUSAL DA PODRIDÃO VERMELHA DO SISAL (*Agave sisalana*)**

**PATOGENICIDADE E AGRESSIVIDADE DE ISOLADOS DE *Aspergillus niger*,
AGENTE CAUSAL DA PODRIDÃO VERMELHA DO SISAL (*Agave sisalana*)**

Jefferson Oliveira de Sá
Ana Cristina Fermino Soares
Jorge Teodoro de Souza

RESUMO

O sisal (*Agave sisalana*) é uma cultura de grande importância para a região semi-árida brasileira, sendo responsável pela geração de emprego e renda em regiões com poucas alternativas agrícolas. Nos últimos anos a podridão vermelha do sisal, cujo agente causal foi identificado como *Aspergillus niger*, tem causado significativos prejuízos aos produtores. Estudos no Estado da Bahia têm demonstrado 100 % de prevalência e incidência variando entre 5 e 65 % nos municípios produtores de sisal. Entretanto, ainda se conhece muito pouco a respeito dessa doença. Testes de patogenicidade e agressividade foram conduzidos em mudas de sete meses de idade, com e sem ferimento induzido, inoculadas com diferentes isolados de *A. niger*. O desenvolvimento de sintomas foi observado 10 dias após a inoculação, em todos os tratamentos, exceto no controle sem o patógeno e nas mudas sem ferimento. O re-isolamento do patógeno nos tecidos da planta indicou que cinco dias após a inoculação, embora não se observassem sintomas, o fungo já colonizava os tecidos da planta. Plantas mortas foram observadas 15 dias após a inoculação. Foi demonstrado também que para que ocorra a doença é necessário o ferimento no caule, e que a infecção não ocorre pelas raízes. Adicionalmente, observou-se que isolados de *A. niger* considerados contaminantes, obtidos no laboratório, do ar e não de plantas doentes, são patogênicos ao sisal, porém com baixa agressividade.

Palavras chave: Agaveicultura, Fitossanidade, Semi-árido

**PATHOGENICITY AND AGGRESSIVENESS OF *A. niger* , CAUSAL AGENT OF
SISAL (*Agave sisalana*) RED ROT DISEASE**

Jefferson Oliveira de Sá
Ana Cristina Fermino Soares
Jorge Teodoro de Souza

ABSTRACT

Sisal (*Agave sisalana*) is a crop of great importance for the Brazilian Semi-Arid region. It is responsible for the generation of jobs and income in agricultural areas with few economic alternatives. In recent years, the red rot disease of sisal, caused by the fungus *Aspergillus niger*, has caused significant yield losses for sisal producers. Studies in the State of Bahia have demonstrated 100% prevalence of sisal red rot disease and incidence ranging from 5 to 65% in sisal producing areas. However, very little is known about this disease. Pathogenicity and aggressiveness tests were conducted with seven-month old sisal plants, with and without mechanical wounds, inoculated with different isolates of *A. niger*. The development of symptoms occurred 10 days after inoculation in all treatments, except for the control and plants without injury. The re-isolation of the pathogen from the plant stem tissue indicated that 5 days after inoculation the fungus had already colonized the tissues of the plant, although symptoms were not present yet. Dead plants were observed 15 days after inoculation. It was also shown that, for disease to occur, stem injury is necessary, and that infection does not occur through plant roots. In addition, it was shown that *A. niger* strains, considered as contaminants, obtained from the laboratory air environment, and not from diseased plants, were pathogenic to sisal plants, but with lower aggressiveness.

Keywords: Agaveiculture, plant health, Semi-arid

INTRODUÇÃO

O sisal (*Agave sisalana*) destaca-se no Nordeste brasileiro por ser uma cultura que gera muitos empregos, por meio de uma cadeia de serviços que abrange, desde os trabalhos de manutenção das lavouras (baseados na mão-de-obra familiar), a extração e o processamento da fibra para o beneficiamento, até as atividades de industrialização de diversos produtos, bem como seu uso para fins artesanais. O segmento do sisal é intensivo em mão-de-obra, em todas as fases de implantação, a exemplo da manutenção, colheita e desfibramento, sendo uma das únicas fontes de geração de renda nas regiões semi-áridas onde existem poucas alternativas para a produção agrícola. A resistência do sisal ao clima adverso tem sido uma das razões por que, em algumas áreas do Nordeste, os agricultores optaram pelas explorações sisaleiras, apresentando-se como uma das melhores alternativas de desenvolvimento para o semi-árido baiano, uma das regiões mais secas e pobres do Nordeste brasileiro (PROSSIGA, 2007).

Apesar dessas características, atualmente na Bahia, tem sido constatado um aumento significativo na incidência da podridão vermelha do caule do sisal, resultando em perdas consideráveis para os produtores. A podridão vermelha do caule do sisal é também conhecida como podridão vermelha do sisal, podridão do cepo e podridão úmida do cepo ou ainda podridão parda do colo. A doença apareceu pela primeira vez no Brasil no Estado da Paraíba, segundo Machado (1951), citado por Medina (1954). Na Bahia, foi constatada pela primeira vez por pesquisadores da Embrapa Semi-Árido e EBDA, na fazenda Mandacaru, município de Santaluz - BA, em um plantio comercial de 500 hectares de sisal (LIMA et al. 1998).

A doença induz o aparecimento dos seguintes sintomas: coloração vermelha que se estende do caule para a base das plantas, com amarelecimento das folhas. A planta infectada fica amarelada e murcha, o caule apodrece e se desprende facilmente do solo, levando a planta à morte. Devido ao clima, alguns produtores acreditam que o problema é causado pela seca (LIMA et al., 1998).

O fungo *Aspergillus niger* foi identificado como o agente causal da podridão vermelha do sisal nos estados da Paraíba e Bahia (COUTINHO et al., 2006a; SOARES et al., 2006). *A. niger* é um fungo mitospórico típico de solo, pertencente à ordem Moniliales, vive normalmente como saprófita, podendo causar doenças

como podridão do colo do amendoim, ocorrendo prevalecentemente em solos com baixa matéria orgânica (MORAES et al., 1997). A capacidade de penetração e colonização de *A. niger* está na dependência do estado em que se encontra o hospedeiro. Quando submetidas a algum tipo de estresse, as plantas ficam mais predispostas à infecção (ROGER, 1953; citado por SOUZA FILHO et al., 1979), apesar do fungo poder penetrar diretamente nos tecidos sadios do hospedeiro.

Apesar da grande importância para as regiões semi-áridas brasileiras, o sisal ainda é uma cultura pouco estudada e existem poucos relatos na literatura científica de estudos sobre a podridão vermelha do sisal e métodos de controle dessa doença. Estudos que permitam a melhor compreensão sobre o patossistema *A. niger* – sisal e sobre medidas para o manejo racional da podridão vermelha do sisal são necessários. Neste contexto, esse trabalho teve o objetivo de avaliar a patogenicidade e a agressividade de diferentes isolados de *A. niger* em mudas de sisal, bem como caracterizar a sintomatologia e algumas condições necessárias para o desenvolvimento da doença.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção de isolados de *A. niger*

Os isolados de *A. niger* foram obtidos de plantas de sisal com sintomas de podridão vermelha, oriundas da região sisaleira, dos municípios de Capela e Riachão do Jacuípe, no Estado da Bahia. Para o isolamento de *A. niger*, foram retirados pequenos fragmentos de tecido do caule dessas plantas de sisal, na região limítrofe das lesões causados pela doença. Em seguida, os pedaços de tecido vegetal foram lavados em água corrente, desinfestados em álcool 70 % durante dois minutos, seguido de hipoclorito de sódio (1 %) durante dois minutos e três lavagens com água destilada e esterilizada. Posteriormente, esses fragmentos foram secos em papel de filtro esterilizado e transferidos para placas de Petri contendo meio de cultivo BDA salino (Batata, Dextrose, Ágar com 6 % de cloreto de sódio), sendo incubados em temperatura ambiente por aproximadamente cinco dias.

Para obtenção de culturas puras fez-se a repicagem de *A. niger* em meio BDA. Após dez dias, pequenos fragmentos da cultura de *A. niger* foram

transferidos para frascos de vidro (tipo penicilina) esterilizados, contendo 4 mL de água destilada e esterilizada, sendo estes tampados hermeticamente e identificados, permitindo a conservação dos isolados à temperatura ambiente.

Para o estudo da patogenicidade e agressividade de diferentes isolados de *A. niger* presentes em ambientes distintos da região do cultivo do sisal, utilizou-se também um isolado considerado contaminante, obtido de uma placa com meio de cultura BDA, contaminada pelo ar no Laboratório em Cruz das Almas, Bahia.

Obtenção de mudas de sisal

Para a obtenção de mudas, bulbilhos de plantas de sisal foram colhidos no município de Retirolândia, Bahia, e plantados na área experimental do Centro de Ciências Agrárias Ambientais e Biológicas da UFRB, no município de Cruz das Almas, Bahia.

Obtenção de suspensão de esporos de *Aspergillus niger*

Cada isolado de *A. niger* foi multiplicado em placas de Petri contendo meio de cultivo BDA, à temperatura ambiente. Após 10 dias de incubação das culturas, acrescentou-se 20 mL de água destilada esterilizada e uma gota de Tween 20[®] em cada placa e, com o auxílio de uma alça de Drigalsky, as colônias foram raspadas e a suspensão contendo esporos e micélio do fungo foi filtrada em gaze esterilizada. O ajuste da concentração de esporos na suspensão filtrada foi realizado com a contagem de esporos em câmara de Neubauer com auxílio de microscópio ótico marca Zeiss Axiostar, com aumento 100X, e ajuste da diluição com água destilada esterilizada para 10^7 conídios. mL⁻¹.

Inoculação de mudas de sisal com e sem lesão

Mudas de sisal com sete meses de idade foram cuidadosamente retiradas da área experimental. Estas mudas tiveram suas raízes lavadas e, em metade das mudas, foram feitos ferimento padronizados (quatro perfurações eqüidistantes, com 2 cm de profundidade e 1 mm de diâmetro) no caule. Em

seguida, as mudas com e sem ferimento foram imersas até a altura de aproximadamente 1 cm, durante 15 minutos, na suspensão de esporos de *A. niger* (isolado de *A. niger* oriundo de planta doente do município de Riachão do Jacuípe), previamente ajustada para a concentração de 10^7 conídios . mL⁻¹. Logo após a inoculação das mudas, realizou-se o plantio destas em sacos de polietileno perfurados, com dimensões de 21 cm de altura x 14,5 cm de largura contendo 1 dm³ de solo.

Trinta dias após o plantio das mudas foi avaliada a incidência da doença, colhendo e cortando-se a muda transversalmente, 0,5 cm acima do ponto de lesão, e observando-se a presença do sintoma de podridão vermelha no caule.

Os tratamentos consistiram de mudas inoculadas com lesão e sem lesão. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 20 repetições. Para avaliação da incidência da doença, para cada tratamento, foram contadas as plantas sintomáticas e os dados transformados para percentagem de plantas com sintomas.

Infecção e colonização de mudas de sisal por *A. niger*

Mudas de sisal com sete meses de idade foram colhidas da área experimental do Laboratório de Fitopatologia e Microbiologia Agrícola do Centro de Ciências Agrárias Ambientais e Biológicas da UFRB e separadas quanto ao tamanho (cinco grupos de mudas com altura de aproximadamente 10,13,16,19 e 22 cm). Em seguida as mudas tiveram suas raízes lavadas e foram inoculadas com ferimento, conforme descrito acima, e plantadas em sacos de polietileno perfurados, também como descrito acima. Os tratamentos consistiram em dois isolados de *A. niger* de diferentes municípios do Estado da Bahia (Riachão do Jacuípe e Capela) e um isolado de Cruz das Almas (definido como contaminante). O controle consistiu de mudas imersas em água destilada. O delineamento experimental foi em blocos casualizados com três tratamentos e cinco repetições, com duas plantas por parcela. Os blocos foram instalados com mudas padronizadas pelo tamanho.

Para avaliar a colonização de *A. niger* no tecido da planta, foram realizadas amostragens destrutivas, sendo coletadas 10 plantas de cada tratamento, durante 30 dias em intervalos de cinco dias, retirando-se a planta, cortando-se

transversalmente o caule (0,5 cm acima do ponto da lesão) e pedaços de raiz, fazendo a desinfestação do tecido vegetal em álcool 70 % (2 minutos) e hipoclorito de sódio 1 % (2 minutos), com posterior lavagem em água esterilizada (três lavagens) e transferência de cinco fragmentos em placas de Petri contendo meio de cultivo BDA salino. A avaliação da colonização pelo fungo foi feita com base na contagem do número de fragmentos de raiz e de caule de sisal com crescimento micelial de *A. niger*, sendo determinada a frequência de fragmentos colonizados pelo fungo (fragmentos colonizados em relação ao número total de fragmentos analisados). Esses dados foram transformados para $\text{ArcoSen}^{-1}x$ e analisados quanto a variância através de teste F a 5 % de probabilidade, através do software Statistica.

Agressividade de isolados de *Aspergillus niger*

Mudas de sisal com oito meses de idade tiveram suas raízes lavadas e sofreram lesões padronizadas (quatro perfurações) ao redor do caule, conforme descrito acima. Em seguida, as raízes e o caule foram borrifados com as diferentes suspensões de *A. niger*, preparadas conforme descrito acima, na concentração de 10^7 conídios . mL⁻¹. Os tratamentos consistiram de dois isolados de *A. niger* de diferentes municípios do Estado da Bahia (Riachão do Jacuípe e Capela) e um isolado de Cruz das Almas (definido como contaminante). O tratamento controle consistiu na aspersão de água destilada.

Após 20 dias de inoculação, foram avaliados a severidade dos sintomas e incidência da doença, cortando-se transversalmente 0,5 cm acima do ponto de lesão e observando-se a presença de sintomas da podridão vermelha no caule, com a seguinte escala de notas: 0 - sem sintoma; 1- escurecimento dos tecidos internos do caule; 2 - vermelhidão nos tecidos internos do caule; 3 - planta morta (Figura 1). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 50 repetições.

Como a severidade foi avaliada através de escala de notas, fez-se análise de Kruskal-Wallis a 5 % de probabilidade, que é uma análise de variância não paramétrica. Os tratamentos foram comparados pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, a 5 % de probabilidade.

Para avaliação da incidência da doença para cada tratamento, somaram-se as plantas sintomáticas dividindo pelo número total de plantas, obtendo-se os dados em porcentagem.

Para as análises estatísticas utilizou-se o software Systat 12 (Systat Software Inc.).

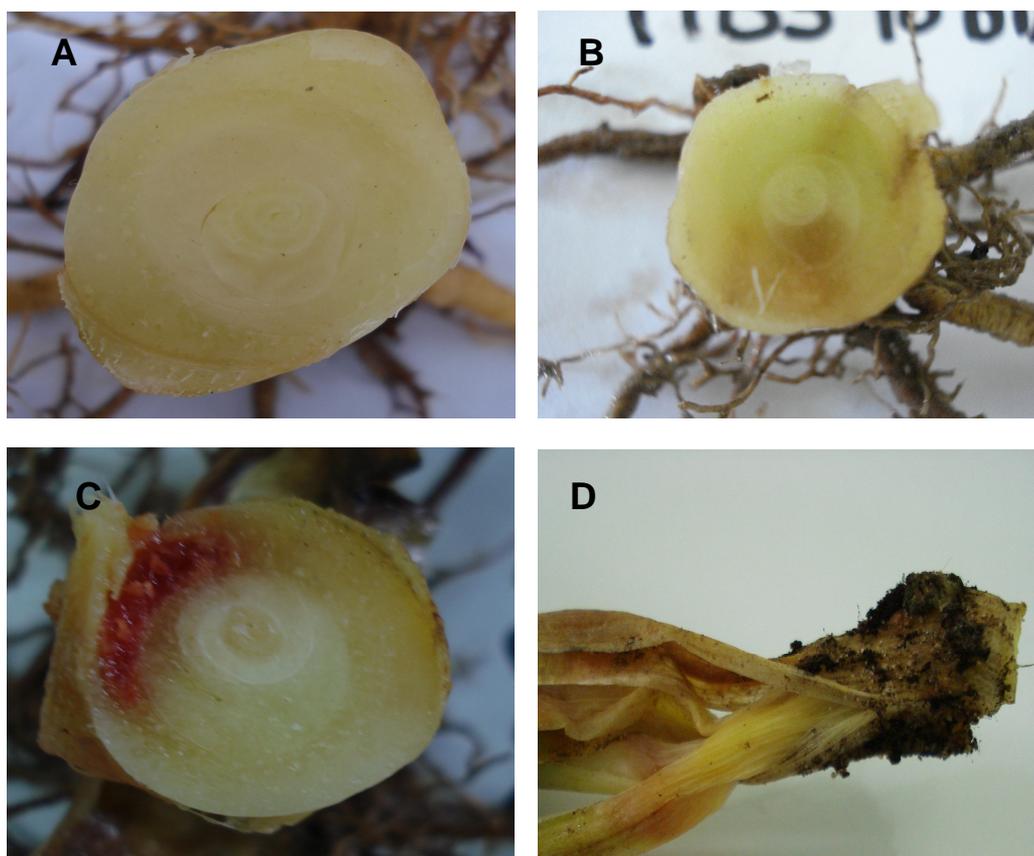


Figura 1. Escala de notas adotada para avaliar a severidade da podridão vermelha de sisal em mudas inoculadas. **(A)** Nota 0 - Planta sadia; **(B)** Nota 1 - Sintoma inicial, escurecimento dos tecidos internos do caule; **(C)** Nota 2 - Vermelhidão dos tecidos internos do caule; **(D)** Nota 3 - Planta morta.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os sintomas de podridão vermelha só ocorreram nas mudas com ferimentos no caule e inoculadas, enquanto que mudas inoculadas sem lesão não apresentaram sintomas, indicando a necessidade da lesão para a penetração do fungo. A incidência da doença nas mudas inoculadas foi de 80 %. Coutinho et al., (2006b) também observaram que mudas sem lesão, inoculadas com chumaços de algodão embebido com suspensão conidial de *A. niger*, não apresentaram

sintomas da doença. Roger, (1953) citado por Souza Filho et al., (1979) relatou que a capacidade de penetração e colonização de *A. niger* depende do estado em que se encontra a planta hospedeira. Quando submetidas a algum tipo de estresse, as plantas ficam mais predispostas à infecção.

A necessidade da lesão para a ocorrência da doença está relacionada provavelmente à morfologia da planta. As características xerófilas da planta de sisal, ou seja, cutícula cerosa e espessa são barreiras naturais à penetração de microrganismos e, enquanto elas se mantiverem intactas, a entrada de patógenos é impedida (WALLACE e DIEKMAHNS, 1952; LOCK, 1962; LIMA et al., 1998).

Lock (1962), citado por Coutinho et al., (2006b), sugere que o ferimento causado na base da folha por ocasião do corte destas para o desfibramento é a principal via de penetração do agente etiológico da podridão do caule em plantas de sisal. Entretanto, Bock (1965) afirma que esses fungos podem penetrar na planta através de injúrias causadas abaixo do nível do solo por instrumentos utilizados nos tratos culturais, causando a infecção na base ou na parte lateral do caule. Estes autores indicam que ferimentos causados por capinas, desbaste de touceiras e retirada de rebentos da planta-mãe podem ser importantes vias de penetração de patógenos que causam os sintomas de podridão em plantas de sisal.

As lesões fisiológicas, causadas por situações de extremo estresse (período de seca) também podem se constituir num importante fator, contribuindo para a infecção da planta não injuriada mecanicamente, pois observações em diversas áreas de sisal têm demonstrado maior incidência da doença durante o período chuvoso, após um longo período de seca (dados não publicados). Estudos deverão ser conduzidos para comprovar esta hipótese.

Foi observada a presença do patógeno na superfície das raízes (rizoplano), nas mudas inoculadas. Porém, as observações do crescimento do fungo na superfície das raízes das mudas de sisal coletadas durante o experimento, as quais foram desinfestadas e inoculadas em meio de cultura BDA, indicam que este fungo não possui a capacidade de penetrar nestes tecidos e causar infecção, mesmo com uma elevada densidade de inóculo no rizoplano (Figura 2). Além disso, após a remoção da epiderme das raízes e inoculação destas em meio de cultura BDA, não foi observado o crescimento do fungo no meio de cultura, o que

também demonstra que o patógeno coloniza os tecidos mais externos das raízes, mas não possui a capacidade de infectá-las e causar doença.

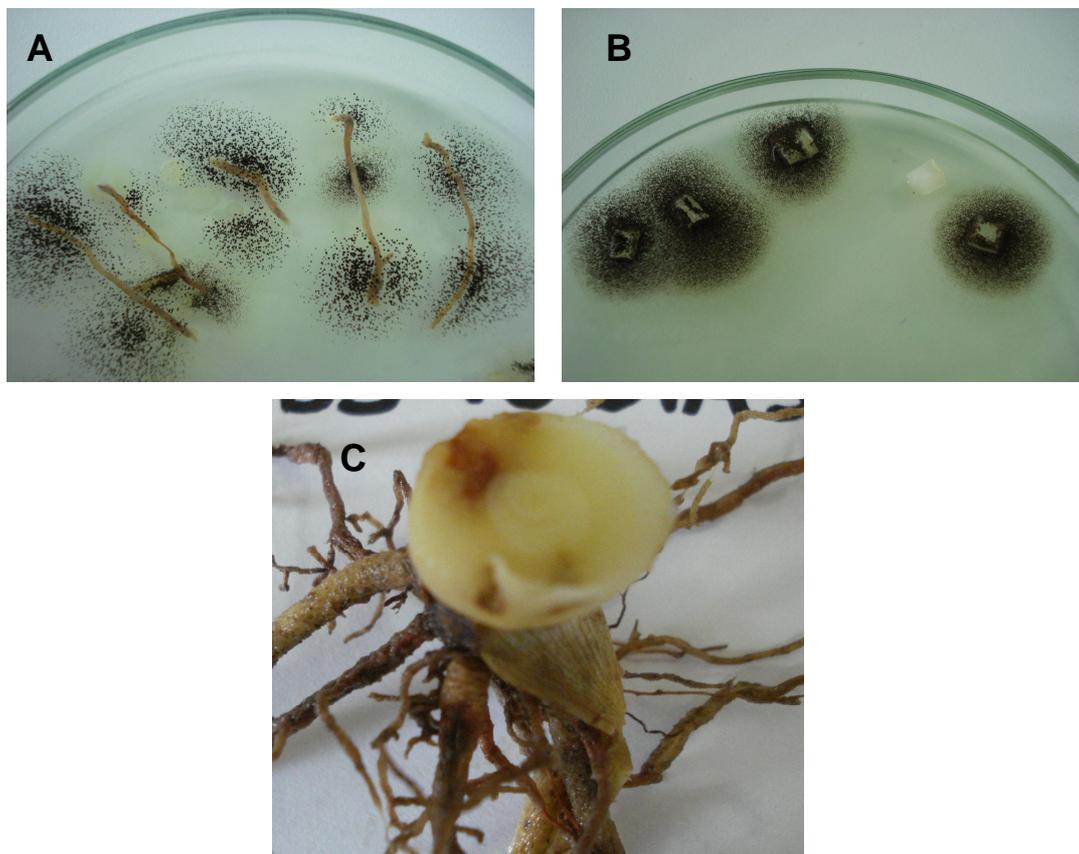


Figura 2. (A) Crescimento de *A. niger* após cinco dias de semeio em placas de Petri com BDA salino de raízes desinfestadas coletadas de mudas de sisal inoculadas com *A. niger*; (B) Crescimento de *A. niger* após cinco dias de semeio de fragmentos de pseudocaule desinfestados, coletados de mudas de sisal inoculadas com *A. niger*; (C) Sintoma da podridão vermelha do sisal no interior do caule, dez dias após inoculação.

Entretanto, é comum observar-se no campo, rebentos pequenos e plantas novas em touceiras de sisal com sintomas de podridão vermelha (Figura 3). Estas observações sugerem que o fungo pode ser transferido da planta mãe para o rebento, através do rizoma, sendo as mudas contaminadas uma importante fonte de inóculo e veículo de disseminação para plantios novos e aqueles já existentes. É necessário investigar se a penetração do fungo nos rebentos de sisal ocorre via tecidos do caule ou das raízes novas.



Figura 3. Mudanças rebento de sisal apresentando sintomas da doença. **(A)** Sintoma externo: amarelecimento da planta. **(B)** Sintoma interno: podridão vermelha nos tecidos do caule e na base das folhas.

Quanto à colonização das plantas inoculadas com *A. niger*, a análise de variância entre os tratamentos indicou não haver diferença mínima significativa entre os três isolados testados, exceto o controle que diferiu estatisticamente de todos os tratamentos. Também não houve interação significativa entre isolado e tempo, sendo a frequência de colonização de todos isolados igual durante o período de avaliação. Assim, conclui-se que cinco dias após a inoculação, embora não sejam observados sintomas característicos da doença, o fungo já coloniza os tecidos da planta mantendo-se constante a frequência de colonização de todos os isolados durante 30 dias, que se constituiu no período máximo de avaliação (Figura 4).

Apesar do tratamento controle não ter sido inoculado, a lesão causada e a utilização de solo não estéril para o transplante das mudas, permitiu que ocorresse pequena frequência de infecção por *A. niger* nos tecidos do pseudocaule das mudas (Figura 4).

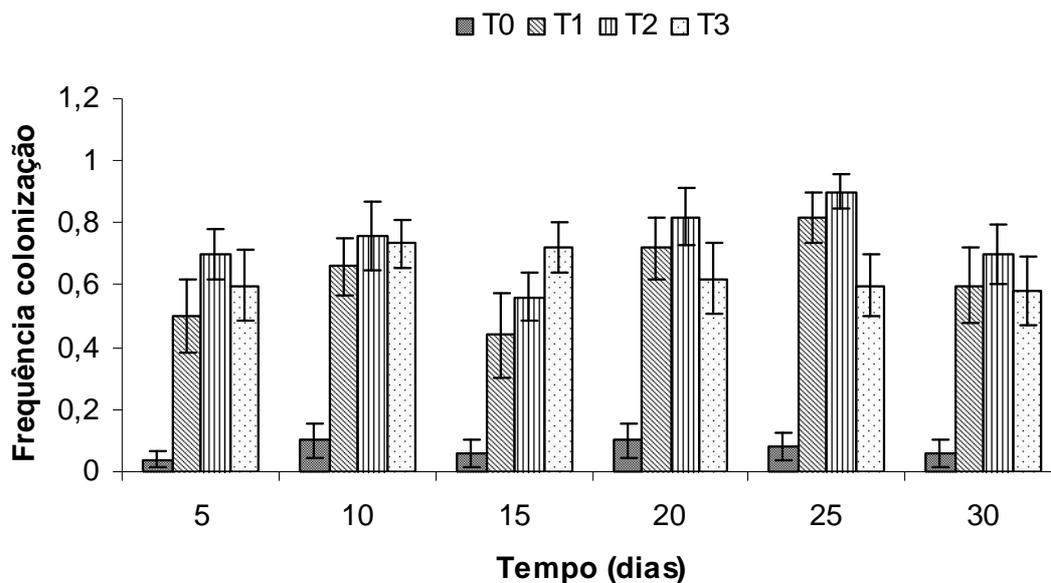


Figura 4. Frequência de colonização por *A. niger* de fragmentos de caule de sisal desinfestados, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 dias após inoculação por diferentes isolados de *A. niger*. **T0** - Controle, somente lesão; **T1** - Isolado do Município de Capela; **T2** - Isolado do Município de Riachão do Jacuípe; **T3** - Isolado contaminante da coleção de microrganismos do Laboratório de Microbiologia da UFRB. Os dados foram transformados para ArcSen \sqrt{x} e submetidos a ANOVA. O teste F não foi significativo a 5% de probabilidade quando analisado somente os tratamentos (exceto controle). Não houve interação significativa entre tratamento e tempo.

As avaliações de patogenicidade e agressividade de diferentes isolados de *A. niger* inoculados em mudas de sisal demonstraram o desenvolvimento de sintomas dez dias após a inoculação, em todos os tratamentos exceto no controle. Plantas mortas foram observadas a partir de 15 dias após a inoculação, nos tratamentos com os isolados das regiões de Capela e Riachão do Jacuípe. O isolado contaminante não causou a morte de plantas durante o período de avaliação do experimento (30 dias).

Todos os isolados avaliados foram patogênicos, sendo que os isolados de Riachão do Jacuípe e Capela causaram 100 % de incidência da doença, enquanto que o isolado considerado contaminante causou 38 % de incidência (Figura 5).

Quanto à severidade, os isolados de Riachão do Jacuípe e Capela não apresentaram diferença mínima significativa quando comparados pelo teste de Kolmogorov-Smirnov a 5 % de probabilidade. Somente o tratamento com o isolado contaminante apresentou diferença significativa, sendo a agressividade deste isolado menor, quando comparada aos demais isolados testados (Figura 5).

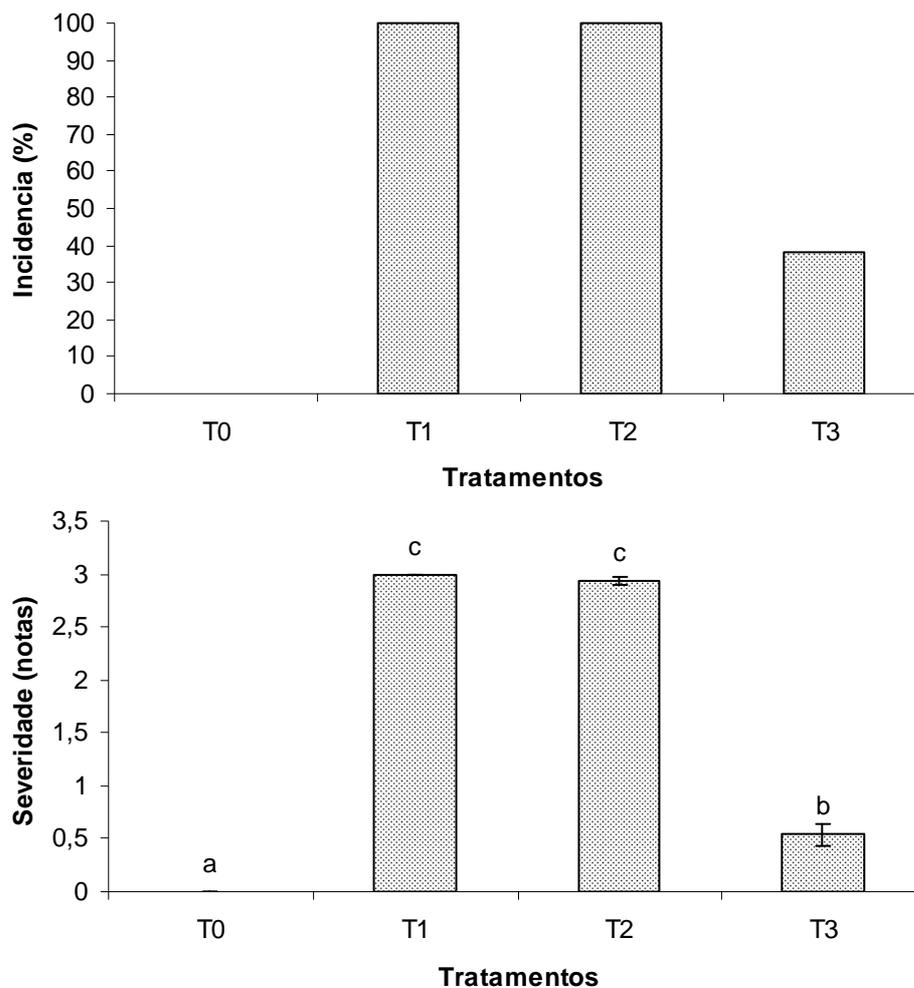


Figura 5. Incidência e severidade de diferentes isolados de *A. niger* inoculados em mudas de sisal. **T0** - Controle; **T1** - Isolado do Município de Capela; **T2** - Isolado do Município de Riachão do Jacuípe; **T3** - Isolado contaminante da coleção de microrganismos do Laboratório de Microbiologia da UFRB. A incidência foi avaliada através da porcentagem de plantas sintomáticas. A severidade foi avaliada através de escala de notas: (0) sem sintoma; (1) Sintoma inicial; (2) Vermelhidão do pseudocaule; (3) Planta morta. Os tratamentos foram comparados pelo teste não paramétrico de Kolmogorov-Smirnov a 5% de probabilidade.

Esses resultados demonstram que isolados obtidos de plantas doentes apresentam maior agressividade quando submetidos a condições favoráveis (hospedeiro suscetível e com lesão). Já no tratamento com o isolado considerado contaminante, apesar de este apresentar a capacidade de causar doença, sendo portanto, considerado patogênico, esta ocorre com menor incidência e severidade, possivelmente por este isolado não estar adaptado a planta.

Não é comum fungos do gênero *Aspergillus* causarem doença em plantas, pois estes são geralmente saprófitas. Entretanto, estes fungos causam podridão

do colo na cultura do amendoim (*Arachis hypogaea*) e doenças de pós-colheita e armazenamento de produtos agrícolas (LIMA & ARAÚJO, 1999).

Para o crescimento deste fungo no interior do tecido hospedeiro é necessário a ação de enzimas hidrolíticas capazes de degradar a parede celular das células vegetais (AGRIOS, 2004). A ação dessas enzimas pode estar intimamente relacionada à patogenicidade e agressividade de *A. niger*, pois é possível que os isolados mais agressivos, por estarem mais adaptados à planta, apresentem ativação de genes que expressam tais enzimas, ao contrário do isolado contaminante que, por estar em ambiente diferenciado (fora da planta), não necessita de tais genes ativos para sua sobrevivência. Estudos de diversidade genética e atividade enzimática de isolados de *A. niger*, combinados com estudos de inoculação e re-isolamento sucessivos em plantas de sisal, poderiam explicar se esses isolados com baixa agressividade têm capacidade de se adaptar à planta, aumentando a severidade da doença ao longo do contato com a planta e apontar para as alterações genéticas que ocorrem nesse processo.

Foi constatado por Coutinho et al., (2006a) e Soares et al., (2006), que o agente etiológico da podridão vermelha do sisal na Bahia é o fungo *A. niger*. Entretanto, durante os experimentos pôde-se observar diferenças morfológicas e de crescimento entre os isolados cultivados nas mesmas condições, o que sugere variabilidade genética entre os isolados ou a ocorrência de outras espécies de *Aspergillus* e não apenas de *A. niger*, como vem sendo relatado na literatura, com base em observações morfológicas da cultura. Abarca et al., (2004) destacou a existência de diferentes espécies de *Aspergillus* com características morfológicas semelhantes, porém através de análise filogenética, estas apresentaram-se como espécies completamente distintas dentro do gênero. Isso implica na possibilidade da doença ser causada por diferentes espécies de *Aspergillus*, e na necessidade de estudos de sequenciamento do material genético e identificação desses isolados obtidos de plantas sintomáticas de diversas regiões.

CONCLUSÕES

1. É necessária a presença de lesão no caule do sisal para o desenvolvimento da doença em mudas inoculadas.

2. A infecção por *A. niger* não ocorre pelas raízes, mesmo que estas tenham lesões.

3. Um isolado de *A. niger* obtido do ar foi patogênico a plantas de sisal, apesar da agressividade ter sido mais baixa, quando comparada com isolados obtidos de sisal.

4. A colonização do caule por *A. niger* ocorre cinco dias após a inoculação, enquanto que os sintomas de podridão nos tecidos internos do caule tornam-se perceptivos 10 dias após a inoculação e a morte das plantas se inicia 15 dias após a inoculação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABARCA, M. L.; ACCENSI, F.; CANO, J.; CABAÑES, F. J. Taxonomy and significance of black aspergilli. **Antonie van Leeuwenhoek**. v.86, p.33-49, 2004.

AGRIOS, G.N. How pathogens attack plants. In: AGRIOS, G.N. (Ed.). **Plant Pathology**. 5th. Elsevier Academic Press, 2004, p.177-203.

BOCK, K.R. **Diseases of sisal**. World Crops, v.17, n.1, p.64-67,1965.

COUTINHO, W.M.; LUZ, C.H.; SUASSUNA, N.D.; SILVA, O.R.R.F.; SUINAGA, F.A. A podridão do tronco do sisal. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2006b. 4p. (**Comunicado Técnico, 281**).

COUTINHO, W.M.; SUASSUNA, N.D.; LUZ, C.H.; SUINAGA, F.A.; SILVA, O.R.R.F. Bole rot of sisal caused by *Aspergillus niger* in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n. 6, p. 605, 2006a.

LIMA, E. F.; ARAÚJO, A. E. Fungos causadores de tombamento, transportados e transmitidos através da semente de amendoim. **Revista Oleaginosas e Fibrosas**, Campina Grande, v. 3, n. 2, p. 71-76, 1999.

LIMA, E.F.; MOREIRA, J. de A.N.; BATISTA, F.A.S.; SILVA, O.R.R.F.da; FARIAS, F.J.C.; ARAÚJO, A.E. Podridão vermelha do tronco do sisal (*Agave sisalana* Perr.) causada por *Botryodiplodia theobromae* Pat. **Revista de Oleaginosas e Fibrosas**, Campina Grande, v.2, n.2, p.109-112, 1998.

LOCK, G.W. **Sisal**, London: Longmans, 1962. 355p.

MEDINA, J. C. **O Sisal**. São Paulo: Secretaria da Agricultura, Diretoria de Publicidade Agrícola, 1954. 286p.

MORAES, S. A.; GODOY, I. J. Amendoim (*Arachis hypogaea* L.) Controle de doenças. In: VALE, F.X.R.; ZAMBOLIN, L. (Eds). **Controle de doenças de plantas: grandes culturas**. Ed. UFV, Viçosa, Minas Gerais, cap.1 p.1-43, 1997.

PROSSIGA. **Panorama do Setor de Sisal no Estado da Bahia**. Disponível em: <<http://www.prossiga.br/arranjos/ba-sisal.html>> Acesso em: 07 de abril de 2007.

SOARES, A. C. F.; SALOMÃO, M. S.; ALMEIDA, N. de S.; PEREZ, J. O.; GARRIDO, M. da S. *Aspergillus niger* como agente causal de manchas foliares e podridão do pseudocaule do sisal. In: **XXXIX Congresso Brasileiro de Fitopatologia**, 2006, Salvador, BA.

SOUZA FILHO, F.B.; SANTOS FILHO, H.P.; ROBBS, C.F. Etiologia da queima das folhas do coqueiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.4, n.1, p.5-10, 1979.

WALLACE, M.M.; DIECKMAHNS, E.C. Bole rot of sisal. **The East African Agricultural Journal**, v.18, n.1, p.24-29, 1952.

CAPÍTULO 2

SELEÇÃO DE *Trichoderma* spp. PARA O CONTROLE BIOLÓGICO DA PODRIDÃO VERMELHA DO SISAL¹

¹ Artigo ajustado e submetido ao Comitê Editorial do periódico científico Pesquisa Agropecuária Brasileira.

SELEÇÃO DE *Trichoderma* spp. PARA O CONTROLE BIOLÓGICO DA PODRIDÃO VERMELHA DO SISAL (*Agave sisalana*).

Jefferson Oliveira de Sá
Ana Cristina Fermino Soares
Jorge Teodoro de Souza

RESUMO

A cultura do sisal (*Agave sisalana*) ocupa uma extensa área na região semi-árida dos Estados da Bahia, Paraíba e Rio Grande do Norte, gerando atividade econômica por meio da sua cadeia produtiva, para um contingente de mais de meio milhão de pessoas. Apesar da importância da cultura do sisal, existem poucos estudos sobre esta cultura. Na Bahia, tem sido constatado um aumento significativo na incidência da podridão vermelha do pseudocaule do sisal causado pelo fungo *Aspergillus niger*. O controle biológico se constitui numa ferramenta viável, já que existem microrganismos a exemplo de fungos do gênero *Trichoderma*, que vem sendo utilizados para o controle de vários fitopatógenos em diversas culturas. Assim o objetivo deste trabalho foi isolar e selecionar isolados de *Trichoderma* spp. para o controle biológico da podridão vermelha do sisal. Foi desenvolvida uma metodologia para seleção *in vitro* de isolados *Trichoderma* spp. antagonísticos à *A. niger*, utilizando discos desinfestados de caule de sisal como substrato de crescimento de ambos os fungos. Este teste *in vitro* permitiu selecionar quatro isolados de *Trichoderma* spp. como potenciais agentes de biocontrole. Dos 44 isolados de *Trichoderma* spp. obtidos da região sisaleira Semi-Árida da Bahia, quatro inibiram significativamente o crescimento micelial e esporulação de *A. niger*. Os padrões de crescimento dos isolados de *Trichoderma* nos discos de caule de sisal com *A. niger* sugere a ocorrência de diferentes mecanismos de ação desses isolados. Em campo, os isolados selecionados como antagonísticos a *A. niger* não foram eficientes no controle da podridão vermelha do sisal, nas condições edafoclimáticas do município de Miguel Calmon, Bahia. As condições edafoclimáticas das regiões produtoras de sisal na Bahia têm que ser avaliadas nos trabalhos futuros com *Trichoderma* spp. e controle da podridão vermelha.

Palavras chave: *Agave sisalana*, controle biológico, fitossanidade

SELECTION OF *Trichoderma* spp. FOR CONTROL OF SISAL (*Agave sisalana*) RED ROT DISEASE

Jefferson Oliveira de Sá
Ana Cristina Fermino Soares
Jorge Teodoro de Souza

ABSTRACT

Sisal (*Agave sisalana*) cultivation occupies a large area in the semiarid region of the States of Bahia, Paraíba and Rio Grande do Norte, generating economic activity through its supply chain for more than half a million people. Despite its importance, there are very few studies about this crop. Yet, in Bahia State a significant increase in the incidence of sisal red rot disease caused by the fungus *Aspergillus niger* has been reported. Biological control can be a potential tool since several microorganisms, such as fungi from the genus *Trichoderma*, have been tested and used for the control of several plant pathogens in several crops. Thus, this study aimed at isolating and selecting *Trichoderma* spp. for the biological control of sisal red rot disease. A methodology for *in vitro* selection of *Trichoderma* isolates antagonistic to *A. niger* was developed with the use of desinfested sisal stem discs as growth substrate for both fungi. This *in vitro* test allowed the selection of four out of 44 tested *Trichoderma* isolates as potential biocontrol agents. These isolates, which were obtained from sisal producing areas in the Semi-Arid region of Bahia were able to significantly inhibit micelium growth and spore germination of *A. niger*. The growth pattern of *Trichoderma* isolates in sisal stem discs inoculated with *A. niger* suggest the occurrence of different mechanisms of antagonistic action by these microorganisms. In field experiments, the *Trichoderma* isolates selected *in vitro* as antagonists to *A. niger* were not efficient in controlling sisal red rot disease in sisal plants grown in the Semi-Arid environmental conditions of the municipality of Miguel Calmon, State of Bahia. The environmental conditions of the sisal producing regions in Bahia must be considered in future field research with *Trichoderma* and control of sisal red rot disease.

Keywords: *Agave sisalana*, biocontrol, plant health

INTRODUÇÃO

A cultura do sisal (*Agave sisalana*) ocupa uma extensa área na região semi-árida dos Estados da Bahia, Paraíba e Rio Grande do Norte, sendo uma das principais fontes de geração de emprego e renda dessas regiões com poucas alternativas para produção agrícola. Apesar da sua relevância, tem-se constatado nos últimos anos, um declínio contínuo desta cultura, expresso em redução da área cultivada, de produção e produtividade, devido à ocorrência da podridão vermelha do caule, que causa a morte da planta, constituindo-se no principal problema fitossanitário da cultura. Dados obtidos no estado da Bahia têm demonstrado 100 % de prevalência e incidência variando entre 5 e 65 % nos municípios produtores.

A doença induz o aparecimento dos seguintes sintomas: coloração vermelha que se estende do caule para a base das plantas, com amarelecimento das folhas. A planta infectada fica amarelada e murcha, o caule apodrece e se desprende facilmente do solo, levando a planta à morte. Devido ao clima, alguns produtores acreditam que o problema é causado pela seca (LIMA et al., 1998).

O fungo *Aspergillus niger* foi identificado como o agente causal da podridão vermelha do sisal nos estados da Paraíba e Bahia (COUTINHO et al., 2006; SOARES et al., 2006). A capacidade de penetração e colonização de *A. niger* está na dependência do estado em que se encontra o hospedeiro. Quando submetidas a algum tipo de estresse, as plantas ficam mais predispostas à infecção (ROGER, 1953; citado por SOUZA FILHO et al., 1979).

O estabelecimento de métodos de controle desta doença é de importância vital para a economia da região sisaleira, visto que esta doença causa a morte da planta e a sua disseminação, sem a implementação de estratégias de controle, pode inviabilizar o cultivo do sisal no Brasil, comprometendo toda a cadeia produtiva. Para a cultura do sisal, não existe o registro de produtos para o controle químico e nem a descrição de métodos eficientes de controle.

No controle de doenças de plantas, os métodos vêm sendo aperfeiçoados com objetivo de assegurar o uso racional de produtos químicos, bem como, garantir a rentabilidade da atividade do agricultor e diminuir os riscos à saúde humana e ao meio ambiente.

Doenças de plantas causadas por patógenos de solo, principalmente fungos, são de difícil controle, devido às estratégias de sobrevivência desses microrganismos no solo. Nestes casos é fundamental a adoção de táticas de manejo integrado, destacando-se o controle cultural e biológico de fitopatógenos.

Neste contexto, uma alternativa para o controle de fitopatógenos é o uso de microrganismos antagonistas, os quais oferecem potencialmente respostas para muitos problemas enfrentados na agricultura. O controle biológico de patógenos veiculados pelo solo pode ser obtido através da introdução de antagonistas, tanto no solo quanto nos órgãos de propagação ou através da manipulação do ambiente (LARANJEIRA, 2001).

Entre os fungos do solo com ação comprovada contra patógenos do solo, têm-se destacado isolados selvagens e melhorados de *Trichoderma* spp. (REIS et al., 1995). O gênero *Trichoderma*, pertencente à Ordem Hypocreales, é representado por fungos não patogênicos, habitantes do solo, que exercem antagonismo a vários fitopatógenos, através do parasitismo e/ou antibiose, bem como, por hiperparasitismo (MELO, 1998).

O fungo *Trichoderma* spp. é um agente de controle biológico por ser antagonista a vários fungos fitopatogênicos, podendo exercer o controle indiretamente, competindo por espaço e nutrientes, modificando as condições ambientais, produzindo antibióticos, inativando as enzimas do patógeno ou, diretamente, mediante o micoparasitismo (BENITEZ et al, 2004).

O sisal ainda é uma cultura pouco estudada. Não existem relatos na literatura sobre o controle da podridão vermelha do sisal. Entretanto, diversos trabalhos têm demonstrado o sucesso do uso de *Trichoderma* no controle de diversos patógenos do solo como *Pythium* sp. (NASEBY et al, 2000; THRANE et al, 2000), *Rhizoctonia solani*. (CÚNDOM et al, 2003), *Phytophthora* spp. (ETEBARIAN et al., 2000, EZZIYYANI et al, 2007) e *Sclerotinia sclerotiorum*, agente causal do mofo-branco do feijoeiro (ETHUR et al. 2001); e da parte aérea como *Botrytis cinerea* (HJELJORD et al, 2001, LISBOA et al, 2007) e *Moniliophthora perniciosa*, agente causal da vassoura-de-bruxa do cacauero (BEZERRA et al. 2003) entre outros fitopatógenos.

O gênero *Trichoderma*, apesar das dificuldades em sua classificação é um fungo de fácil cultivo e de manutenção, sendo uma alternativa de baixo custo e de fácil implantação quando comparado com o controle químico que requer a

obtenção de moléculas complexas que demandam um grande período de tempo e tem um custo muito elevado, além dos impactos ambientais que causam.

O manejo da cultura do sisal causa lesões mecânicas nas plantas e o ambiente de estresse devido ao clima e as características físicas e químicas dos solos cultivados com sisal na região Semi-árida facilitam a infecção pelo patógeno, e torna outras estratégias de controle complexas e inviáveis. Assim, o uso de microrganismos antagonistas se constitui numa alternativa de controle da doença, por meio da diminuição da densidade de inóculo do patógeno, diminuindo assim, a incidência da doença e mortandade de plantas.

Portanto, é necessário se estudar o potencial de *Trichoderma* spp. no controle de *A. niger*, agente causal da podridão vermelha do sisal. Assim, o presente trabalho teve o objetivo de isolar e selecionar isolados de *Trichoderma* spp. para o controle desta doença na região sisaleira da Bahia.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção de isolados de *Trichoderma*

Os isolados de *Trichoderma* spp. foram obtidos a partir de amostras de solo coletadas na região próxima as raízes de plantas de sisal e de plantas de sisal dos municípios da região sisaleira da Bahia (Araci, Barrocas, Campo Formoso, Conceição do Coité e Retirolândia). O isolamento foi feito pela técnica da diluição seriada e plaqueamento em meio BDA (Batata, Dextrose, Ágar) 1/5 com 1 mL . L⁻¹ de Tormicina. As culturas puras dos isolados foram conservadas à temperatura ambiente em frascos de vidro esterilizados, contendo 4 mL de água destilada e esterilizada, sendo estes identificados e fechados hermeticamente.

Seleção de *Trichoderma* spp. em discos do caule de plantas de sisal

Para a seleção desses isolados quanto ao antagonismo à *A. niger*, discos horizontais do caule de sisal em forma de discos de 17 mm de diâmetro x 0,5 cm de altura foram cortados, lavados e desinfestados em álcool 70 % e hipoclorito de sódio 1 %, ambos por cinco minutos, seguido de duas lavagens com água

destilada e esterilizada. Posteriormente, os discos do caule foram acondicionados em potes de plástico (capacidade para 100 mL) descartáveis, contendo uma fina camada de papel toalha esterilizado no fundo. Em seguida, os discos de caule foram inoculados por aspersão, dentro dos potes de plástico, com uma suspensão de esporos de *A. niger* ($\pm 1,6$ mL) na concentração de 10^7 conídios . mL⁻¹. Os tratamentos consistiram de 44 isolados de *Trichoderma* spp., aplicados duas horas após inoculação de *A. niger* via aspersão de suspensão de esporos na mesma concentração. O controle negativo consistiu apenas da aplicação de *A. niger*. Além disso, foi utilizado um controle positivo composto por discos de caule não inoculados, com o propósito de verificar a eficiência do processo de desinfestação dos discos de caule. O material foi incubado a temperatura ambiente, por um período de cinco dias.

Após a incubação, os discos de caule foram transferidos para frascos de Erlenmeyer com capacidade de 50 mL, contendo 20 mL de solução salina (0,85 % NaCl), com 100 μ L de Tween20[®], agitados durante 1 minuto para obtenção da suspensão dos esporos presentes no disco de caule. Em seguida, realizou-se a contagem de esporos de *A. niger* dessa suspensão, com auxílio de câmara de Neubauer e microscópio ótico marca Zeiss Axiostar, com aumento 100X, calculando-se a concentração de esporos no volume total de 20 mL da solução salina.

O experimento foi dividido em cinco etapas, sendo cada etapa constituída de dez tratamentos mais o tratamento padrão (controle negativo), exceto a quinta etapa que possuiu quatro tratamentos e o tratamento padrão, totalizando assim a avaliação dos 44 isolados de *Trichoderma* spp..

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro repetições. Os dados foram transformados para $\log(x + 1)$ e submetidos à análise de variância. A comparação dos tratamentos com a testemunha (tratamento padrão) foi feita pelo teste de Dunnett a 5 % de probabilidade. Para análises estatísticas utilizou-se o software Systat 12 (Systat Software Inc.).

Seleção *in vivo* de isolados de *Trichoderma* spp. nas condições da região semi-árida da Bahia, produtora de sisal.

Mudas de sisal com 10 meses, oriundas de bulbilhos colhidos no município de Retirolândia-BA e plantadas em área experimental no município de Cruz das Almas-BA, foram coletadas e conduzidas ao município de Miguel Calmon, Bahia. Foram feitos ferimentos padronizados nas mudas (quatro perfurações eqüidistantes, com 2 cm de profundidade e 1 mm de diâmetro) e estas foram inoculadas com *A. niger* via aspersão de suspensão de esporos na concentração 10^7 conídios . mL⁻¹ nas raízes e no local dos ferimentos, exceto no tratamento controle onde foi aplicado somente água destilada esterilizada. Duas horas após a inoculação com *A. niger*, as mudas foram borrifadas com uma suspensão de esporos de isolados de *Trichoderma* spp. (TCS01, TCS16, TCS03 e TCS35) na concentração 10^7 conídios . mL⁻¹, exceto na testemunha que somente foi inoculada *A. niger*. Posteriormente, as mudas foram plantadas em sacos de polietileno (21 x 14,5 cm) com capacidade para 1 dm³ de solo, contendo solo da região de Miguel Calmon, área produtora de sisal, sendo mantidas no campo, em área aberta, durante 30 dias para avaliação da severidade e incidência da doença.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 50 repetições, e seis tratamentos: quatro isolados de *Trichoderma*, um controle positivo (somente lesão) e um controle negativo (somente *A. niger*).

A severidade dos sintomas da doença foi avaliada por meio de corte transversal à 0,5 cm acima do ponto de lesão e observação da presença de podridão vermelha no caule, adotando-se a seguinte escala de notas: 0 - sem sintoma; 1 - escurecimento dos tecidos internos do caule; 2 - vermelhidão dostecidos internos do caule; 3 - planta morta. Como a severidade foi avaliada através de escala de notas, fez-se análise de Kruskal-Wallis a 5 % de probabilidade, que é uma análise de variância não paramétrica. Os tratamentos foram comparados pelo teste de Kolmogorov-Smirnov a 5 % de probabilidade.

Para avaliação da incidência da doença em cada tratamento, foram contadas as plantas sintomáticas e fez-se o cálculo, dividindo o número de plantas sintomáticas pelo número total de plantas. Para as análises estatísticas utilizou-se o software Systat 12 (Systat Software Inc.).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidos 44 isolados de *Trichoderma* do solo da região sisaleira dos municípios de Araci, Campo Formoso e Retirolândia. Não foi encontrado *Trichoderma* endofítico do sisal nas amostras de raízes e caule, coletadas de plantas dos municípios da região sisaleira (Tabela 1).

Tabela 1. Isolados de *Trichoderma* spp. obtidos por diluição seriada de amostras de solo de diferentes localidades de municípios da região sisaleira.

Município	Localidade	Isolados	Quantidade de isolados
Campo Formoso	Morrinhos	TCS01, TCS09, TCS10, TCS11	4 isolados
	Lagoa do Porco	TCS02, TCS03, TCS04, TCS05, TCS06, TCS07	6 isolados
	Belas	TCS12, TCS13, TCS13, TCS14, TCS15, TCS16, TCS17, TCS18, TCS19, TCS20, TCS21, TCS22	12 isolados
	Toca da Novilha	TCS23, TCS24, TCS25, TCS26, TCS27, TCS28, TCS29	7 isolados
Araci		TCS30, TCS31, TCS32, TCS33, TCS34, TCS35	6 isolados
Retirolândia	Área 1*	TCS36, TCS37, TCS38, TCS39	4 isolados
	Área 2*	TCS40, TCS41, TCS42, TCS43, TCS44	5 isolados

* Não foi possível identificar o nome da localidade, então foram definidos numericamente para diferenciar.

As colônias desses isolados apresentaram características como micélio hialino e esporulação intensa de coloração variando do verde claro ao verde escuro, sendo em alguns casos, essa esporulação distribuída em toda área da placa ou formando anéis ao redor do centro das placas de Petri (Figura 1).

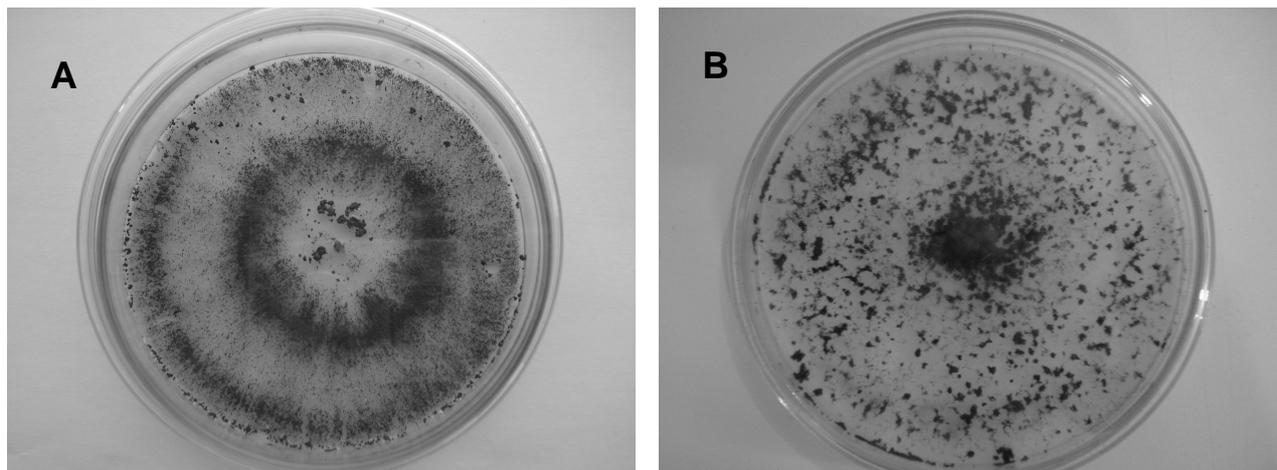


Figura 1. Culturas de *Trichoderma* spp. apresentando características diferenciadas de crescimento e esporulação. **(A)** Esporulação abundante em forma de anéis. **(B)** Esporulação distribuída aleatoriamente ao longo da placa de Petri com o meio de cultivo.

Quanto à seleção de *Trichoderma* spp. nos discos de caule de sisal, pôde-se observar o antagonismo desses isolados à *Aspergillus niger*, onde cada isolado apresentou comportamento diferenciado em relação à inibição do patógeno, crescimento micelial e esporulação no tecido da planta (Figura 2). Possivelmente, essas diferenças de comportamento estejam relacionadas ao mecanismo de inibição utilizado por esses isolados de *Trichoderma* spp. e à capacidade de crescimento desses nos fragmentos de caule de sisal e de competir com o patógeno.

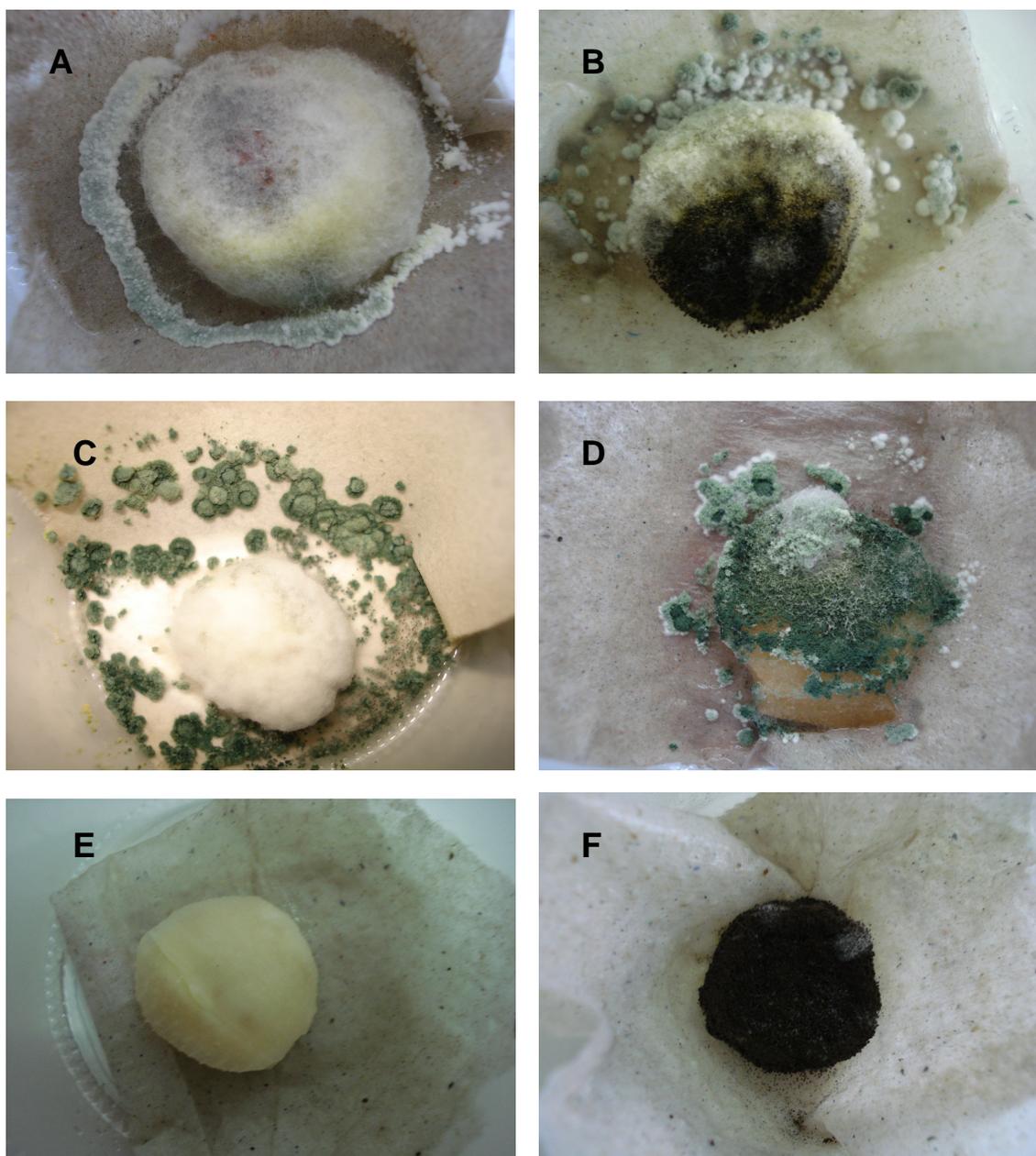


Figura 2. Antagonismo de *Trichoderma* spp. à *Aspergillus niger* em discos de caule de sisal. **(A)** Crescimento micelial intenso com esporulação verde claro fora do disco de caule; **(B)** Crescimento micelial e esporulação pouco intensa permitindo desenvolvimento do patógeno; **(C)** Crescimento micelial intenso no disco de caule com esporulação verde escura fora do tecido da planta; **(D)** Crescimento micelial pouco intenso com esporulação verde escura no disco de caule; **(E)** Controle positivo: não inoculado; **(F)** Controle negativo: inoculado apenas com *Aspergillus niger*.

Observou-se que os isolados TCS01 e TCS32 de *Trichoderma* spp. permitem o crescimento menos intenso de *A. niger*. Porém, após o desenvolvimento, ocorre o micoparasitismo pelo antagonista e impedimento do crescimento de forma mais intensa do patógeno. Enquanto que os isolados TCS16 e TCS23 de *Trichoderma* spp. crescem rapidamente no disco de caule de

sisal, causando 100% de inibição do crescimento micelial e esporulação de *A. niger* (Figura 3).

As espécies de *Trichoderma* são geralmente consideradas competidoras agressivas, apresentando rápido crescimento e colonização, excluindo muitos patógenos (MARCHETTI et al, 1992).

Segundo Benitez et al, (2004), o controle de fitopatógenos por *Trichoderma* pode ocorrer pela competição por espaço e nutrientes, modificação das condições ambientais, produção de antibióticos e inativação das enzimas do patógeno, ou mediante o micoparasitismo.

O crescimento micelial e esporulação de isolados de *Trichoderma* spp. observado nos discos de caule mostram mais um ponto positivo deste antagonista, pois além de ter atividade antagônica ao patógeno, ainda sobrevive e cresce nos tecidos da planta. Bettiol & Ghini, (1995) destacam que para um antagonista ser bem sucedido é preciso que ele tenha capacidade de multiplicar e colonizar a superfície da planta, podendo atuar por meio de um ou mais mecanismos, permitindo uma maior eficiência.

Em relação à inibição da esporulação de *A. niger*, os isolados TCS01, TCS16, TCS23, TCS32, comparados com a testemunha (tratamento padrão) apresentaram diferença significativa, de acordo com o teste de Dunnet a 5 % de probabilidade (Figura 3). Os demais isolados (40 isolados) de *Trichoderma* spp., apesar de inibirem o crescimento do patógeno, não diferiram significativamente do tratamento controle.

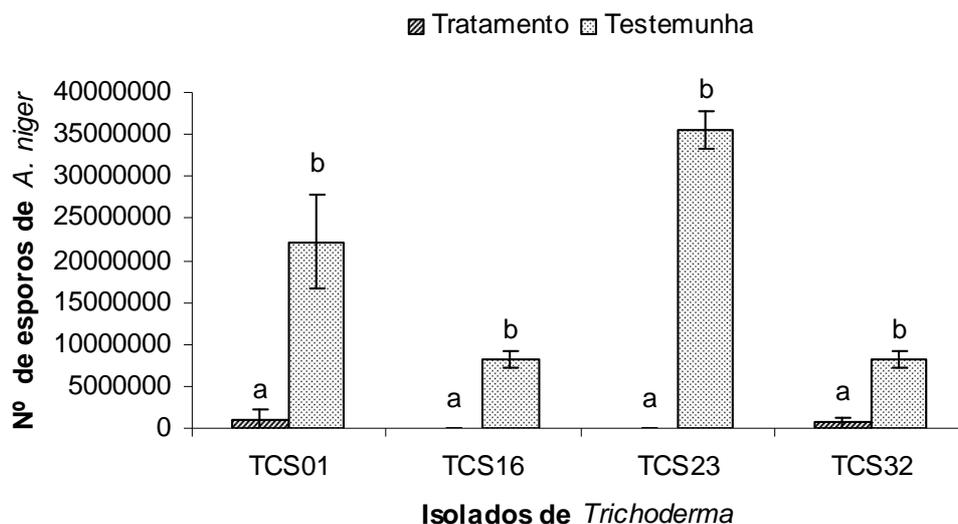


Figura 3. Inibição de esporulação de *A. niger* em discos de caule por diferentes isolados de *Trichoderma*. Médias seguidas de mesma letra comparando-se tratamentos e testemunhas não diferem entre si pelo teste de Dunnet a 5 % de probabilidade.

Os isolados TCS01 e TCS32, apesar de inibirem o crescimento e esporulação de *A. niger*, ainda permitem um pequeno desenvolvimento do patógeno, para que posteriormente ocorra o micoparasitismo e a destruição de suas estruturas como hifas e conídios. Provavelmente, nestes casos prevaleça o mecanismo de micoparasitismo, que apesar de não inibir completamente e destruir imediatamente o patógeno, contribui para a diminuição de inóculo, o que pode contribuir para a redução da infecção e estabelecimento da doença nas plantas de sisal (Figura 4).



Figura 4. *Trichoderma* (Isolado TCS01) micoparasitando conidioforo de *A. niger*.

Para Lorito (1998), o micoparasitismo parece ser o mecanismo mais eficiente de antagonismo do controle biológico natural, pois os hiperparasitas por viverem às custas do patógeno estão sujeitos às mesmas variações ambientais e dependem das mesmas condições do organismo parasitado. O micoparasitismo está relacionado à capacidade de *Trichoderma* em produzir enzimas hidrolíticas capazes de degradar os constituintes da parede celular do patógeno, possibilitando a digestão da parede celular e utilização dos nutrientes intracelulares do hospedeiro (LORITO et al., 1994). As enzimas hidrolíticas capazes de lisar os componentes da parede celular desempenham, portanto, papel fundamental no processo antagônico do micoparasitismo. As quitinases (endoquitinases, exoquitinases e β -1,4-N-acetilglucosaminidases), as exoglucanases e endoglucanases do tipo β -glucanases (β -1,3 e β -1,6), as

proteases e as celulases (β -1,4- D-glucosidases), são as hidrolases identificadas nos fungos do gênero *Trichoderma* (DE MARCO et al., 2000).

Os níveis de enzimas hidrolíticas produzidas são diferentes para cada interação hospedeiro-parasita analisada. Este fenômeno se correlaciona com a habilidade que cada isolado de *Trichoderma* possui para controlar um patógeno específico. Entretanto, a especificidade do processo não pode ser explicada apenas por uma simples diferença de atividade enzimática, já que os isolados não antagonistas também produzem quantidades significativas de enzimas líticas, apesar de serem em níveis mais baixos (HJELJORD & TRONSMO, 1998).

Os isolados TCS16 e TCS23 inibiram em 100 % o crescimento e esporulação do patógeno nos discos de caule. Esses isolados apresentaram maior agressividade e capacidade competitiva, crescendo mais rapidamente sobre os discos de caule, quando comparados ao patógeno.

Espécies do gênero *Trichoderma* são conhecidas como produtoras de diversos metabólitos secundários, voláteis e não voláteis, com amplo espectro de atividade antimicrobiana (PUNJA & UTKHEDE, 2003). Vários autores têm mostrado que essas espécies podem secretar diversos antibióticos antifúngicos como as pironas, isocianatos, tricotecenos, dentre outros (SCHIRMBOCK et al, 1994). A secreção desses metabólitos não foi avaliada no presente trabalho, podendo esta estar associada à inibição exercida pelos isolados TCS16 e TCS23 ao crescimento micelial e esporulação de *A. niger*.

A avaliação em campo da eficiência de *Trichoderma* no controle da podridão vermelha do sisal não apresentou resultados positivos, como foi observado nos estudos conduzidos em laboratório nos discos de caule de sisal. A severidade da doença nos tratamentos com os isolados TCS01, TCS03 e TCS16 não diferiu estatisticamente da testemunha (inoculação apenas com *A. niger*), com base no teste não paramétrico de Kolmogorov-Smirnov a 5 % de probabilidade. A incidência da podridão vermelha do sisal foi de 100 % nos tratamentos, exceto o tratamento com o isolado TCS35 que apresentou 84 % de incidência. A severidade da doença também foi mais baixa nas plantas tratadas com este isolado de *Trichoderma*.

Os tratamentos com os isolados TCS01 e TCS16 apesar de apresentarem bons resultados nos testes de laboratório, nas condições de campo da região sisaleira, no semi-árido baiano, não contribuíram para o controle da doença. Já no

tratamento com o isolado TCS35, que não inibiu significativamente *A. niger* nos testes em laboratório, houve uma diminuição na severidade da doença (Figura 5).

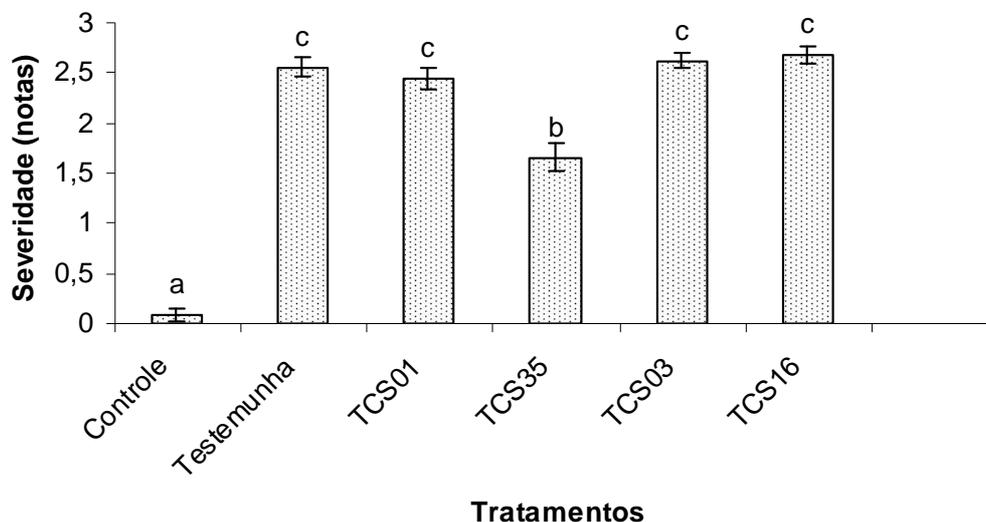


Figura 5. Severidade de *Aspergillus niger* em mudas de sisal tratadas com *Trichoderma* spp. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste não paramétrico de Kolmogorov-Smirnov a 5 % de probabilidade.

Para Lumsden & Locke, (1989) não basta apenas que o antagonista seja um potente agente de controle em condições de laboratório. É preciso também se conhecer os fatores ecológicos que podem afetar o desempenho e, via de conseqüência, adotar práticas de manejo adequadas para favorecer a sua permanência e atividade no ambiente.

Sendo assim, o comportamento e eficiência desses microrganismos no controle biológico estão estreitamente condicionados aos fatores ambientais e à relação das plantas com os microrganismos e entre os microrganismos.

Vale salientar que apesar dos testes em laboratório serem realizados em discos da planta, o que de certa maneira é uma tentativa de aproximação da realidade, é também de extrema importância considerar as relações ecológicas entre os microrganismos presentes no solo, pois as interações ecológicas não ocorrem isoladamente, mas mutuamente e com grande complexidade, do que as condições de laboratório (BETTIOL & GHINI, 1995). O controle biológico de doenças de plantas deve ser considerado uma íntima interação do patógeno com o hospedeiro, influenciada pelo ambiente (BACKER & COOK, 1974).

Outro fator que interferiu nos resultados em campo foi o aumento da agressividade do patógeno quando submetido às condições de alta umidade (mudas irrigadas) e temperatura do semi-árido. Isto indica a adaptabilidade do patógeno a esta condição. Segundo Schuster et al. (2002), o gênero *Aspergillus* sobrevive em ampla escala de temperatura, variando de 6 a 47 °C, enquanto que *Trichoderma* spp., apesar de também sobreviver em ampla faixa de temperatura, é mais efetivo em temperaturas próximas a 25 °C (MCBEATH & ADELMA, 1991; HJELJORD et al, 2001).

Apesar do experimento de campo não ter apresentado resultados satisfatórios de controle da podridão vermelha do sisal, não podemos desconsiderar a eficiência desses isolados no controle desta doença do sisal, considerando que foi avaliada apenas uma condição de temperatura, umidade, concentração de inóculo, forma de inoculação e um tipo de solo. Nas condições em que o experimento foi conduzido em campo, o patógeno foi aplicado primeiro e numa concentração de inóculo muito elevada, além do ambiente favorecer a doença, o que não permitiu que os isolados de *Trichoderma* spp. demonstrassem seu potencial antagônico. Testes com aplicações preventivas de *Trichoderma* spp. em intervalos de tempo mais amplos entre as aplicações de *Trichoderma* spp. e *A. niger*, podem demonstrar resultados satisfatórios se o isolado de *Trichoderma* spp. apresentar a capacidade de sobreviver na planta e no solo neste período e nessas temperaturas, protegendo a planta e impedindo o crescimento populacional do patógeno no solo, quando este estiver em condição ambiental favorável.

A avaliação da sobrevivência e antagonismo de *Trichoderma* spp. no solo também poderia demonstrar a eficiência na redução de inóculo de *A. niger*, o que consequentemente diminuiria a incidência da doença, pelo efeito supressivo desses microrganismos no solo. Como esses isolados de *Trichoderma* spp. foram obtidos das áreas produtoras de sisal, esperava-se que estes fossem tolerantes a temperaturas elevadas. Outros estudos sobre a sobrevivência desses isolados em diferentes condições ambientais devem ser conduzidos.

Diversos trabalhos têm demonstrado que agentes de controle biológico de doenças de plantas não respondem de maneira semelhante aos resultados obtidos em laboratório, devido às grandes variações nas condições ambientais. O uso combinado de microrganismos para o controle biológico pode se constituir

numa boa estratégia para amenizar os efeitos do ambiente. Isso devido a diferentes condições ambientais em que cada microrganismo sobrevive e atua, diminuindo assim os efeitos das características do ambiente no inoculante, aumentando sua eficiência com a compensação de um microrganismo na ausência de ação do outro, além também de relação sinérgicas que podem torná-los mais eficientes (GUETSKY et al. 2001).

Estudos mais aprofundados da sobrevivência desses isolados nos solos da região semi-árida e os mecanismos de ação e avaliações bioquímicas destes isolados, são necessários para a melhor compreensão da ação destes isolados e de seu potencial para o controle da podridão vermelha do sisal. Estudos de identificação por técnicas moleculares também são necessários para a identificação ao nível de espécie.

CONCLUSÃO

1. Existe antagonismo e ao que tudo indica, por diferentes mecanismos, de isolados de *Trichoderma* da região sisaleira da Bahia à *Aspergillus niger*, agente causal da podridão vermelha do sisal e o potencial de controle desta doença com *Trichoderma*.
2. Foi definida a metodologia com discos de caule de sisal para testes *in vitro* de antagonismo ao patógeno *A. niger*.
3. A não reprodutibilidade no campo dos resultados de antagonismo *in vitro*, nas condições ambientais do município de Miguel Calmon, Bahia, indicam que fatores ambientais como temperatura e umidade são decisivos para o sucesso do controle da podridão vermelha com isolados de *Trichoderma* e estes devem ser avaliados em trabalhos futuros.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAKER, K. F.; COOK, J. **Biological control of plant pathogens**. San Francisco. American Phytopathological Society. 1974.

BENÍTEZ, T., RINCÓN, A.M., LIMÓN, M.C. & CODÓN, A.C. **Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains**. *International Microbiology*, v.7, n. 4, p.249-260, 2004.

BETTIOL, W.; GHINI, R. Controle biológico . In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L (Eds). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres, p. 717-727, 1995.

BEZERRA, J. L; COSTA, J. C. B; BASTOS, C. N; FALEIRO, F. G. *Hypocrea stromatica* sp. nov. teleomorfo de *Trichoderma stromaticum*. **Fitopatologia Brasileira**. v.28, p.408-412, 2003.

COUTINHO, W.M.; SUASSUNA, N.D.; LUZ, C.H.; SUINAGA, F.A.; SILVA, O.R.R.F. Bole rot of sisal caused by *Aspergillus niger* in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n. 6, p. 605, 2006.

CÚNDOM, M.A.; MAZZA, S.M. & GUTIÉRREZ, S.A. Short communication. Selection of *Trichoderma* spp. Isolates against *Rhizoctonia solani*. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v.1, n.4, p.79-81, 2003.

DE MARCO, J.L.; LIMA, L.H.C; SOUZA, M.V.; FELIX, C.R. A *Trichoderma harzianum* chitinase destroys the cell wall of the phytopathogen *Crinipellis pernicioso*, the causal agent of witches' broom disease of cocoa. **World J. Microbiol. Biotechnol**, v.16, p.383-86, 2000.

ETEBARIAN, H.R.; SCOTT, E.S. & WICKS, T.J. *Trichoderma harzianum* T39 and *T. virens* DAR 74290 as potencial biological control agent for *Phytophthora erythroseptica*. **European Journal of Plant Pathology**, v.106, p.329-337, 2000.

ETHUR, L.Z; CEMBRANEL, C.Z; SILVA, A. C. F. Seleção de *Trichoderma* spp. visando ao controle de *Sclerotinia sclerotiorum*, in vitro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.31, n.5, p.885-887, 2001

EZZIYYANI, M.; REQUENA, M. E.; EGEA-GILABERT, C. & CANDELA, M. E. Biological Control of *Phytophthora* Root Rot of Pepper Using *Trichoderma harzianum* and *Streptomyces rochei* in Combination. **Journal of Phytopathology**, v.155, n.6, p.342-349, 2007.

GUETSKY, D. R.; SHTIENBERG, Y. E.; DINOOR, A. Combining Biocontrol Agents to Reduce the Variability of Biological Control. **Biological Control**. v. 91, n. 7, p. 621-627, 2001.

HJELJORD, L.; TRONSMO, A. *Trichoderma* and *Gliocladium* in biological control: an overview. In: HARMAN, G.E.; KUBICEK, C.P., (Eds). **Trichoderma and Gliocladium – enzymes, biological control and commercial applications**. London, Taylor & Francis, v.2, p.131-151, 1998.

HJELJORD, L.G., STENSVAND, A. & TRONSMO, A. Antagonism of nutriente-activated conidia of *Trichoderma harzianum* (atroviride) P1 against *Botrytis cinerea*. **Phytopathology**, v.91, n.12, p.1172-1180, 2001.

LARANJEIRA, D. Utilização de micorrizas no manejo de doenças de plantas. In: MICHEREFF, S. J., BARROS, R. (Org.). **Proteção de Plantas na Agricultura Sustentável**. 1ed. Recife: Imprensa Universitária, 2001, v.1, p.105-125.

LIMA, E.F.; MOREIRA, J. de A.N.; BATISTA, F.A.S.; SILVA, O.R.R.F.da; FARIAS, F.J.C.; ARAÚJO, A.E. Podridão vermelha do tronco do sisal (*Agave sisalana* Perr.) causada por *Botryodiplodia theobromae* Pat. **Revista de Oleaginosas e Fibrosas**, Campina Grande, v.2, n.2, p.109-112, 1998.

LISBOA, B.B.; BOCHESI, C.C.; VARGAS, L.K.; SILVEIRA, J.R.P.; RADIN, B. & OLIVEIRA, A.M.R. DE O. Eficiência de *Trichoderma harzianum* e *Gliocladium viride* na redução da incidência de *Botrytis cinerea* em tomateiro cultivado sob ambiente protegido. **Ciência Rural**, v.37, n.5, p.1255-1260, 2007

LORITO, M. Chitinolytic enzymes and their genes. In: HARMAN, G.E.; KUBICEK, C.P. (Eds). **Trichoderma and Gliocladium – enzymes, biological control and commercial applications**. London, Taylor & Francis, v.2, p. 73-99, 1998.

LORITO, M.; HARMAN, G.E; HAYES, C.K; BRODWAY, R.M; TROSMO, A.; WOO, S.L; PIETRO, A. Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*, antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase. **Phytopathology**, v.83, p. 302-307, 1994.

LUMSDEN, R.D; LOCKE, J.C. Biological control of damping-off caused by *Phytophthora ultimum* and *Rhizoctonia solani* in soilless mix. **Phytopathology**, v.79, p.361-366, 1989.

MARCHETTI, R., NIPOTI, P., D'ERCOLE, N. & GUERZONI, M.E. Competition at atmosphere level as biocontrol mechanism in *Trichoderma* spp. **Petria**, v.2, p.137-147, 1992.

MCBEATH, J. & ADELMAN, M. Taxonomy of a new *Trichoderma* found in Alaska. Abstract. **Phytopathology**, v.81, n.10, p.1151, 1991.

MELO, I. S. de, AZEVEDO, J. L. de, ed. Controle biológico : v. 1. Jaguariúna, SP, Embrapa, 1998. 262p.

MENEZES, J. P. **Trichoderma spp - microrganismo utilizado no controle de fitopatógenos**. 2002. Disponível em: <<http://www.agronline.com.br/artigos/artigo.php?id=91>> Acesso em: 07 de abril de 2007.

NASEBY, D.C.; PASCUAL, J.A. & LYNCH, J.M. Effect of biocontrol strains of *Trichoderma* on plant growth, *Phytophthora ultimum* populations, soil microbial communities and soil enzyme activities. **Journal of Applied Microbiology**, v.88, p.161-169, 2000.

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

REIS, A., OLIVEIRA, S.M.A. de, MENEZES, M. et al. Potencial de isolados de *Trichoderma* para biocontrole da murcha de *Fusarium* do feijoeiro. **Summa Phytopathologica**, São Paulo, v.21, n.1, p.16-20, 1995.

SCHIRMBOCK, M., LORITO, M., WANG, Y.L., HAYES, C.K., ARISAN-ATAC, I., SCALA, F., HARMAN, G.E. & KUBICEK, C. Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi. **Applied Environmental Microbiology**, v.60, p.4363-4370, 1994.

SCHUSTER, E., DUNN-COLEMAN, D., FRISVAD, J.C., VAN DIJCK, P. W. M. On the safety of *Aspergillus niger* – a review. **Applied Microbiology Biotechnology**. v.59, p.426–435. 2002.

SOARES, A. C. F.; SALOMÃO, M. S.; ALMEIDA, N. de S.; PEREZ, J. O.; GARRIDO, M. da S. *Aspergillus niger* como agente causal de manchas foliares e podridão do pseudocaule do sisal. In: **XXXIX Congresso Brasileiro de Fitopatologia**, 2006, Salvador, BA.

SOUZA FILHO, F.B.; SANTOS FILHO, H.P.; ROBBS, C.F. Etiologia da queima das folhas do coqueiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.4, n.1, p.5-10, 1979.

THRANE, C.; FUNCK JENSEN, D. & TRONSMO, A. Substrate colonization, strains competition, enzyme production in vitro, and biocontrole of *Pythium ultimum* by *Trichoderma* spp. Isolates P1 and T3. **European Journal of Plant Pathology**, v.106, p.215-220, 2000.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A cultura do sisal tem importante papel econômico e social nas regiões semi-áridas da Bahia, onde outras atividades agrícolas são limitadas ou inviáveis. A cultura representa o principal segmento econômico dos municípios dessa região, sendo responsável pela geração de emprego direto e indireto. Sua produção envolve principalmente o segmento de agricultura familiar, contribuindo na renda e sobrevivência dessas famílias.

Apesar da importância da cultura do sisal, poucos estudos vêm sendo desenvolvidos para a melhoria da produção e produtividade, principalmente sobre um dos maiores problemas da cultura, a podridão vermelha do sisal, que vem causando perdas consideráveis de qualidade, produção e produtividade, causando grandes prejuízos nas regiões produtoras de sisal.

Os resultados deste estudo demonstram que para a ocorrência da doença é necessário a lesão no caule e que existe patogenicidade de isolados de *Aspergillus niger* não nativos da região sisaleira, porém com baixa agressividade. De acordo com a literatura científica é necessário alguma injúria na planta, seja ela mecânica ou fisiológica, para que ocorra a doença, considerando que o fungo *Aspergillus niger* é um saprófita que infecta a planta em condições de estresse.

Este trabalho permitiu compreender melhor esta doença, uma das condições da planta para que ocorra a patogenicidade do fungo (*A. niger*), o período necessário para que ocorra a colonização dos tecidos do caule pelo fungo e o desenvolvimento dos sintomas, resultando na morte da planta. Estes resultados também deram subsídio a outros trabalhos de pesquisa, principalmente de controle da doença.

Este se constitui no primeiro trabalho de controle biológico da podridão vermelha do sisal relatado na literatura científica. Foram selecionados isolados de *Trichoderma* spp. antagonistas à *A. niger*. Foi também desenvolvida uma metodologia para seleção de *Trichoderma* spp. antagonistas ao patógeno, em que

os fungos são avaliados na superfície de discos desinfestados de caule de sisal, uma tentativa de aproximação da realidade, que permitiu avaliar a ação desses microrganismos no tecido vegetal.

Apesar dos resultados em laboratório não terem sido semelhantes aos obtidos em campo, a metodologia descrita anteriormente subsidia outros trabalhos com controle biológico da doença, além de sugerir a necessidade de ajustes metodológicos como variação das condições ambientais (umidade e temperatura), para os estudos do comportamento de *Trichoderma* spp. e *A. niger* nos discos de caule.

Trabalhos futuros deverão ser conduzidos em diferentes condições edafoclimáticas do semi-árido baiano para avaliar o comportamento dos isolados de *Trichoderma* spp. obtidos, permitindo identificar com precisão isolados promissores. Além disso, testes em solo (em microparcelas) também devem ser conduzidos para avaliar a sobrevivência de *Trichoderma* spp. e a capacidade em diminuir a população do patógeno no solo, com conseqüente diminuição de inóculo e do desenvolvimento da doença.