

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

**MANEJO DAS PODRIDÕES NEGRA E SECA DA MANDIOCA PELO  
USO DE BACTÉRIAS E FUNGOS COMO AGENTES DE  
BIOCONTROLE**

**Izis Katarina Santana Mello**

**CRUZ DAS ALMAS – BA  
OUTUBRO – 2022**

**MANEJO DAS PODRIDÕES NEGRA E SECA DA MANDIOCA PELO USO DE  
BACTÉRIAS E FUNGOS COMO AGENTES DE BIOCONTROLE**

Izis Katarina Santana Mello

Bacharel em Engenharia Agrônômica, UNEB, 2018

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Federal do Recôncavo, como parte dos requisitos parciais para obtenção do Título de Mestre em Ciências Agrárias (Área de concentração: Agricultura Tropical).

**Orientador:** Dr. Saulo Alves Santos de Oliveira

**Coorientadora:** Dr<sup>a</sup>: Maria Selma Alves Silva Diamantino

**CRUZ DAS ALMAS – BA**

**OUTUBRO – 2022**

M527m

Mello, Izis Katarina Santana.

Manejo das podridões negra e seca da mandioca pelo uso de bactérias e fungos como agentes de biocontrole / Izis Katarina Santana Mello.\_ Cruz das Almas, BA, 2022.  
87f.; il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Mestrado em Ciências Agrárias.

Orientador: Prof. Dr. Saulo Alves Santos de Oliveira.  
Coorientadora: Maria Selma Alves Silva Diamantino.

1.Mandioca – Solo – Manejo. 2.Mandioca – Doenças e pragas – Fungos. 3.Controle biológico – Análise. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.

CDD: 633.682

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

**MANEJO DAS PODRIDÕES NEGRA E SECA DA MANDIOCA PELO USO DE  
BACTÉRIAS E FUNGOS COMO AGENTES DE BIOCONTROLE**

Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação de  
Izis Katarina Santana Mello

Aprovada em 28 de outubro de 2022



Documento assinado digitalmente

SAULO ALVES SANTOS DE OLIVEIRA

Data: 24/04/2023 15:28:11-0300

Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof. Dr. Saulo Alves Santos de Oliveira  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB/  
Embrapa Mandioca e Fruticultura  
Orientador

Camila Santiago Hohenfeld  
Embrapa Mandioca e Fruticultura  
Examinadora Externa

Thiago Alves Santos de Oliveira  
Universidade Federal do Acre – UFAC  
Examinador Externo

**Ofereço a minha família,  
À que tenho toda gratidão por minha existência.**

## **Agradecimentos**

O que seria da nossa trajetória, se não fosse aqueles que cruzam nossos caminhos com o propósito de auxiliar no nosso desenvolvimento como pessoas humanas e como profissionais. Esse processo seletivo e evolutivo é árduo e nos custa muito emocionalmente, porém com a benção divina dos céus e integrado a nossas escolhas no dia a dia, eis que surge aqueles a quem devemos a gratidão de nos servir como suporte nesses processos. Eu me considero, abençoada, por Deus e pelos meus guias espirituais, por todas essas pessoas que fizeram parte do meu crescimento na vida e mais particularmente nessa fase.

A força de se reinventar é dádiva Divina. Gratidão! Quero agradecer a Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB pelo suporte acadêmico nessa fase de pós-graduação e agência de financiamento CAPES pela concessão de bolsas.

A Embrapa Mandioca e Fruticultura, pela oportunidade de desenvolver este trabalho, por intermédio do meu orientador Saulo Oliveira, há quem devo gratidão pela paciência e pelo auxílio nos momentos de dificuldade encontradas no processo. A minha co-orientadora Maria Selma, por estar sempre presente quando mais necessitei, pelas dúvidas tiradas, pela preocupação com o trabalho, nunca esquecerei desse apoio. Aos IC's Rafaela Vasques, Diego, Tábata, Clênio, que me auxiliaram nos perrengues de trabalho mais intenso, minha gratidão pelo auxílio prestado. Aos meus colegas de mestrado Bruno e Polyana pelo apoio coletivo e empatia. A equipe da mandioca em geral.

Não poderia me esquecer da equipe do Laboratório de Fitopatologia – LABFITO, Leandro Rocha que esteve sempre disponível a me auxiliar nas necessidades, facilitando meu trabalho com todo suporte técnico. Aos funcionários Seu João e Seu Sinésio por sempre auxiliarem quando podiam, ao ver minha agonia.

A equipe da banana, Julia, Kamila, Bia, Mariana, Ana Luiza, Lucas que me adotaram e me abraçaram, vou sentir falta dos nossos cafezinhos das 10:00 h. nosso momento de espairar em meio as agonias dos experimentos, em especial meu agradecimento para Flavinha, toda minha admiração pela sua pessoa e pela dedicação ao seu trabalho e pelo auxílio também em vários momentos em que estive insegura.

Não poderia deixar de agradecer a minha família, que me auxiliou indiretamente, me apoiando e compreendendo as minhas ausências. Minha mãe Marizete, meu Pai Carlos, minha madrinha Vilma e meus avós Carlos e Célia, minha madrinha espiritual Ciça, sou grata por todo apoio e amor que vocês me dão.

A família que me adotou como filha, meus sogros e cunhado Andrea, Josival, João, tenho imensa gratidão e amor pela família de vocês, meu namorado Luiz Humberto, por tanta dedicação e cuidado comigo nessa fase final do trabalho. Amo todos vocês.

## Manejo das podridões negra e seca da mandioca pelo uso de bactérias e fungos como agentes de biocontrole

### RESUMO GERAL

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz.), cultura amplamente utilizada para fins alimentícios e industriais, é afetada por diversas doenças incitadas por de diferentes grupos de fitopatógenos, comprometendo significativamente a sua produção. Entre os mais destrutivos estão aquelas associadas as podridões radiculares e que englobam diferentes espécies de fungos e oomicetos habitantes de solo. O controle biológico apresenta-se como uma das melhores alternativas para o manejo de fitopatógenos, e em especial os causadores de podridão. Sendo assim o objetivo geral do trabalho, foi avaliar o potencial antagonistas de fungos e bactérias no manejo das doenças da podridão negra e seca *in vitro* e *in planta*. Diferentes experimentos foram conduzidos na Embrapa Mandioca e Fruticultura – Cruz das Almas – BA, para tanto foram selecionados isolados de diferentes espécies de patógenos causadores de podridão seca *Fusarium oxysporum*, *F. verticillioides*, *F. lateritium*, *F. equiseti*, *F. chlamydosporum*, *F. solani* e de duas espécies causadores de podridão radicular negra na mandioca *Lasiodiplodia theobromae* e *Neoscytalidium dimidiatum*. Os microrganismos potenciais agentes de biocontrole utilizados foram isolados de *Bacillus* spp. e isolados de *Trichoderma asperellum* e *T. harzianum*. As espécies foram confrontadas por meio de pareamento direto em Placas de Petri. Os experimentos *in planta* foram realizados em ambientes controlados, sendo testados os grupos de doenças podridão negra e seca nas variedades ‘BRS Kiriris’ e ‘BRS Formosa’, sendo utilizados controle mais sete tratamentos com potenciais biocontroladores. No segundo experimento foi realizado com inoculação de mix de patógenos de podridão negra e seca da mandioca, utilizando as cultivares ‘BRS Novo horizonte’ e ‘BRS Poti Branca’ em onze tratamentos, sendo testados os mesmos agentes de biocontrole, mais tratamento com fungicida. Os dados gerados para os diferentes experimentos (inibição *in vitro* e *in planta*) foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as médias agrupadas pelo teste *Scott-Knott* à 5% de probabilidade, por meio de pacote “*ExpDes*” no programa *R* 4.2.0. Todos os microrganismos pareados apresentaram potencial de inibição significativo quando comparados ao tratamento controle. Os isolados *Bacillus* sp. APC 07 e APC 51, apresentaram médias acima de 70% de potencial de inibição em mais de uma espécie de patógeno. Todos os isolados de *Trichoderma* spp. testados foram capazes de controlar o crescimento micelial do patógeno *in vitro*, a espécie *T. asperellum* CMF 1007, possui maior capacidade de supressão dos fungos da podridão negra e seca da mandioca, com valores entre 35 e 78% de inibição dos patógenos. Os tratamentos com *Trichoderma* spp. e *Bacillus* spp. foram eficientes em suprimir em mais de 40% os patógenos causadores de podridão negra e seca. O tratamento de imersão de manivas foi eficiente para contenção do progresso das podridões radiculares. Sendo assim os tratamentos com *Trichoderma* spp. e *Bacillus* spp., foram eficientes no controle dos sintomas da podridão negra e seca da mandioca em condições de ambiente controlado.

**Palavras-chave:** Podridões radiculares, Patógenos habitantes de solo, Controle biológico.

## Management of cassava black rot and dry rot using bacteria and fungi as biocontrol agents

### GENERAL ABSTRACT

Cassava (*Manihot esculenta* Crantz.), a crop widely used for food and industrial purposes, is affected by several diseases incited by different groups of phytopathogens, significantly compromising its production. Among the most destructive are those associated with root rot and which include different species of fungi and oomycetes that live in the soil. Biological control is one of the best alternatives for the management of phytopathogens, especially those that cause rot. Thus, the general objective of the work was to evaluate the potential antagonists of fungi and bacteria in the management of black and dry rot diseases in vitro and in planta. Different experiments were conducted at Embrapa Mandioca e Fruticultura – Cruz das Almas – BA, for which isolates of different species of pathogens that cause dry rot *Fusarium oxysporum*, *F. verticillioides*, *F. lateritium*, *F. equiseti*, *F. chlamydosporum*, *F. solani* and two species that cause black root rot in cassava *Lasiodiplodia theobromae* and *Neoscytalidium dimidiatum*. The microorganisms used as potential biocontrol agents were isolated from *Bacillus* spp. and isolates from *Trichoderma asperellum* and *T. harzianum*. The species were confronted through direct pairing in Petri dishes. The in planta experiments were carried out in controlled environments, testing the black and dry rot disease groups in the 'BRS Kiriris' and 'BRS Formosa' varieties, using control plus seven treatments with potential biocontrollers. In the second experiment, inoculation of a mix of cassava black rot and dry rot pathogens was carried out using the cultivars 'BRS Novo Horizonte' and 'BRS Poti Branca' in eleven treatments, testing the same biocontrol agents plus treatment with fungicide. The data generated for the different experiments (in vitro and in plant inhibition) were submitted to analysis of variance (ANOVA) and the means grouped by the Scott-Knott test at 5% probability, using the "ExpDes" package in the R 4.2 program .0. All paired microorganisms showed significant inhibition potential when compared to the control treatment. *Bacillus* sp. APC 07 and APC 51 showed averages above 70% of inhibition potential in more than one species of pathogen. All isolates of *Trichoderma* spp. tested were able to control the mycelial growth of the pathogen in vitro, the species *T. asperellum* CMF 1007, has a greater capacity to suppress the black and dry rot fungi of cassava, with values between 35 and 78% of inhibition of the pathogens. Treatments with spp. and *Bacillus* spp. were efficient in suppressing in more than 40% the pathogens *Trichoderma* that cause black and dry rot. The immersion treatment of cuttings was efficient to contain the progress of root rot. Therefore, treatments with *Trichoderma* spp. and *Bacillus* spp., were effective in controlling cassava black and dry rot symptoms under controlled environment conditions.

**Keywords:** Root rot, Soil-dwelling pathogens, Biological control.



## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

**Tabela 1** – Classificação dos isolados de podridão radicular da mandioca e sua respectiva origem.....31

**Tabela 2** – Espécies dos isolados de *Trichoderma* spp. e *Bacillus* spp. e local de origem.....32

**Tabela 3** – Valores inibição do crescimento micelial dos patógenos pareados com isolados de *Trichoderma* spp.....39

### CAPÍTULO 2.

**Tabela 1** – Tratamentos do experimento *in planta* da podridão negra e seca da mandioca.....52

**Tabela 2** – Tratamentos do experimento do complexo podridão radicular.....56

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

- Figura 1.** Experimento de pareamento *in vitro* com todos isolados causadores de podridão negra e seca pareados com isolados de *Bacillus* spp..... 36
- Figura 2.** Médias de área (cm<sup>2</sup>) do crescimento micelial dos tratamentos *Lasiodiplodia theobromae* (A), *Neoscytalidium dimidiatum* (B) e *Neoscytalidium dimidiatum* (C) *F. equiseti* (D) *F. oxysporum* (E) *F. solani* (F), *F. lateritium* (G) *F. oxysporum* (H) *F. chlamydosporum* (I) *F. verticilloides* (J), na presença e ausência de *Bacillus* spp. Isolados pertencentes ao mesmo grupo (cor) não diferem entre si pelo teste *Scott-Knott*.....37
- Figura 3.** Mapa de calor (*heatmap*), para espécies de *Fusarium* spp. pareados com *Bacillus* spp., *L. theobromae* e *N. dimidiatum* pareadas com isolados de *Bacillus* spp. (A); *Fusarium* spp., *L. theobromae* e *N. dimidiatum* pareados com *Trichoderma* spp. (B) onde tratamentos foram agrupados hierarquicamente.....39
- Figura 4.** Experimento de pareamento *in vitro* com isolados de *Trichoderma* spp. pareados com patógenos do gênero *Fusarium* spp., *Lasiodiplodia* spp. e *Neoscytalidium* spp.....40

### CAPÍTULO 2

- Figura 1.** Boxplot das médias agrupadas pelo teste *t de student* ( $p < 0,05$ ) da doença da podridão negra (A) e (C) e podridão seca (B) e (D), baseadas nos parâmetros avaliados germinação (%) 7 e 15 dias, respectivamente, avaliados em cultivar 'BRS Formosa' e 'BRS Kiriris'. *Bacillus* mix 1 (T3B1); *Bacillus* mix 2 (T4B2); *Bacillus* mix3 (T5B3); Controle (T1C); *Trichoderma* + mix1 (T6TB1); *Trichoderma* + mix 2 (T7TB2); *Trichoderma* + mix 3 (T8TB3); *Trichoderma* (T2T).....60
- Figura 2.** Boxplot das médias agrupadas pelo teste *t de student* ( $p < 0,05$ ) da doença da podridão negra (A) e (B); podridão seca (C) e (D), baseadas nos parâmetros avaliados altura de planta (cm) e vigor (%) avaliados em cultivar 'BRS Formosa' e 'BRS Kiriris'. *Bacillus* mix 1 (T3B1); *Bacillus* mix 2 (T4B2); *Bacillus* mix3 (T5B3); Controle (T1C); *Trichoderma* + mix1 (T6TB1); *Trichoderma* + mix 2 (T7TB2); *Trichoderma* + mix 3 (T8TB3); *Trichoderma* (T2T).....62
- Figura 3.** Boxplot das médias agrupadas pelo teste *t de student* ( $p < 0,05$ ) da doença da podridão negra (A); (B); (C); (D) e podridão seca (E); (F); (G); (H), baseadas nos parâmetros avaliados peso fresco e seco da parte aérea (g) e peso fresco e seco da raiz avaliados em cultivar 'BRS Formosa' e 'BRS Kiriris'. *Bacillus* mix 1 (T3B1); *Bacillus* mix 2 (T4B2); *Bacillus* mix3 (T5B3); Controle (T1C); *Trichoderma* + mix1 (T6TB1); *Trichoderma* + mix 2 (T7TB2); *Trichoderma* + mix 3 (T8TB3); *Trichoderma* (T2T).....64
- Figura 4.** Boxplot das médias agrupadas da doença da podridão negra e podridão seca, baseadas nos parâmetros avaliados colonização interna e incidência externa (%) avaliados em cultivar 'BRS Formosa' e 'BRS Kiriris'. *Bacillus* mix 1 (T3B1); *Bacillus* mix 2 (T4B2); *Bacillus* mix3 (T5B3); Controle (T1C); *Trichoderma*

+ mix1 (T6TB1); Trichoderma + mix 2 (T7TB2); Trichoderma + mix 3 (T8TB3); Trichoderma (T2T).....67

**Figura 5.** Correlação de Pearson entre variedades 'BRS Kiriris' e 'BRS Formosa' inoculadas com patógenos de podridão negra (A) e inoculadas com patógenos de podridão seca (B). A parte superior do correlograma se refere a significância da correlação entre as variáveis. Na diagonal estão as variáveis, com a distribuição dos tratamentos. Na parte inferior estão os mapas de pontos. GERM7 (Germinação 7 dias); GERM15 (Germinação 15 dias); AP (Altura de planta); PFPA (Peso fresco da parte aérea); PFR (Peso fresco da raiz); PSPA (Peso seco da parte aérea); PSR (Peso seco da raiz); CI (Colonização interna); IEX: (Incidência externa); VI (Vigor de planta).....69

**Figura 6.** Boxplot das médias agrupadas de podridão radicular, baseadas nos parâmetros avaliados germinação (%) 7 e 15 dias (A) e (B); altura de plantas (cm) 30 e 60 dias (C) e (D); diâmetro do caule (mm) 30 e 60 dias (E) e (F); Número de hastes - 60 dias (G); Vigor de plantas (%) 60 dias (H) em cultivar 'BRS Novo horizonte' e 'BRS Poti branca'. Bacillus mix 1 (T6B1); Bacillus mix 2 (T7B2); Bacillus mix3 (T3F); Controle(T1C); Controle Absoluto% (T2CA); Fungicida (T3F); Fungicida Absoluto (T4FA); Trichoderma + mix1 (T9TB1); Trichoderma + mix 2 (T10TB2); Trichoderma + mix 3 (T11TB3); Trichoderma (T5T).....72

**Figura 7.** Boxplot das médias agrupadas de podridão radicular, baseadas nos parâmetros peso fresco e seco da parte aérea (g) (A) e (B) e peso fresco e seco da raiz (g) (C) e (D) em cultivar 'BRS Novo horizonte' e 'BRS Poti branca'. Bacillus mix 1 (T6B1); Bacillus mix 2 (T7B2); Bacillus mix3 (T3F); Controle(T1C); Controle Absoluto% (T2CA); Fungicida (T3F); Fungicida Absoluto (T4FA); Trichoderma + mix1 (T9TB1); Trichoderma + mix 2 (T10TB2); Trichoderma + mix 3 (T11TB3); Trichoderma (T5T).....76

**Figura 8.** Boxplot das médias agrupadas de podridão radicular, baseadas nos parâmetros Colonização interna; Incidência interna; Incidência externa (%) e Índice de doença ( $\omega$ ) em cultivar 'BRS Novo horizonte' e 'BRS Poti branca'. Bacillus mix 1 (T6B1); Bacillus mix 2 (T7B2); Bacillus mix3 (T3F); Controle(T1C); Controle Absoluto% (T2CA); Fungicida (T3F); Fungicida Absoluto (T4FA); Trichoderma + mix1 (T9TB1); Trichoderma + mix 2 (T10TB2); Trichoderma + mix 3 (T11TB3); Trichoderma (T5T).....74

**Figura 9.** Coloração de raízes realizada através da clarificação com corante azul de tripan 0,4%. (A) Tratamento Controle (B) Tratamento Fungicida (C) Tratamento Trichoderma + mix 2 (D) Tratamento Trichoderma (E) Tratamento Fungicida absoluto (F) Trichoderma + mix 1. cla = clamidósporos; hif = hifas; cel.veg = células vegetais.....77

**Figura 10.** Manivas abertas após avaliação de colonização interna.....79

**Figura 11.** Boxplot das médias agrupadas de experimento de patogenicidade de manivas, baseadas nos parâmetros colonização interna; (%) em cultivar 'BRS Novo horizonte' e 'BRS Poti branca'. Bacillus mix 1; Bacillus mix 2; Bacillus mix 3; Controle; Fungicida.....79

## SUMÁRIO

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1.0 INTRODUÇÃO GERAL.....</b>   | <b>14</b> |
| <b>2.0 REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>  | <b>15</b> |
| 2.1 Mandioca.....  | 15        |
| 2.2 Podridões radiculares.....   | 16        |
| 2.3 Manejo biológico: Fungos e Bactérias.....  | 19        |
| <b>3.0 REFERÊNCIAS.....</b>  | <b>22</b> |
| <b>CAPÍTULO 1 – Antagonismo <i>in vitro</i> de isolados de <i>Trichoderma</i> spp. e <i>Bacillus</i> spp. à fungos causadores de podridões negra e seca da mandioca (<i>Manihot esculenta</i> Crantz).....</b> | <b>27</b> |
| <b>RESUMO.....</b>   | <b>27</b> |
| <b>ABSTRACT.....</b>   | <b>28</b> |
| <b>1.0 INTRODUÇÃO.....</b>   | <b>29</b> |
| <b>2.0 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>   | <b>31</b> |
| 2.1 Local de desenvolvimento.....  | 31        |
| 2.2 Obtenção de isolados de podridão radicular.....  | 31        |
| 2.3 Agentes de biocontrole.....  | 31        |
| 2.4 Antagonismo <i>in vitro</i> com isolados de <i>Bacillus</i> spp. a fungos causadores de podridões radiculares da mandioca.....   | 32        |
| 2.5 Antagonismo <i>in vitro</i> com isolados de <i>Trichoderma</i> spp. a fungos causadores de podridões radiculares da mandioca.....  | 33        |
| 2.6 Análise estatística.....   | 34        |
| <b>3.0 RESULTADOS.....</b>   | <b>34</b> |
| 3.1 Antagonismo <i>in vitro</i> com isolados de <i>Bacillus</i> spp. a fungos causadores de podridões radiculares da mandioca.....   | 34        |
| 3.2 Antagonismo <i>in vitro</i> com isolados de <i>Trichoderma</i> spp. a fungos causadores de podridões radiculares da mandioca.....  | 38        |
| <b>4.0 DISCUSSÃO.....</b>  | <b>41</b> |
| <b>5.0 CONCLUSÕES.....</b>   | <b>44</b> |
| <b>6.0 REFERÊNCIAS.....</b>  | <b>44</b> |
| <b>CAPÍTULO 2 – Potencial de agentes de biocontrole na supressão <i>in planta</i> das podridões negra e seca da mandioca.....</b>  | <b>48</b> |
| <b>RESUMO.....</b>   | <b>48</b> |
| <b>ABSTRACT.....</b>   | <b>49</b> |
| <b>1.0 INTRODUÇÃO.....</b>   | <b>50</b> |
| <b>2.0 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>   | <b>52</b> |
| 2.1 Testes <i>in planta</i> : Podridão negra e seca da mandioca .....  | 52        |
| 2.2 Testes <i>in planta</i> : Controle biológico do complexo podridão radicular.....   | 55        |
| 2.3 Avaliação da colonização interna de manivas.....   | 58        |
| 2.4 Análise estatística.....   | 58        |
| <b>3.0 RESULTADOS.....</b>   | <b>59</b> |
| 3.1 Testes <i>in planta</i> - podridão negra e seca da mandioca.....   | 59        |
| 3.2 Testes <i>in planta</i> : Controle biológico do complexo podridão radicular.....   | 70        |
| 3.3 Avaliação da colonização interna das manivas.....  | 78        |
| <b>4.0 DISCUSSÃO.....</b>  | <b>83</b> |

|                             |           |
|-----------------------------|-----------|
| <b>5.0 CONCLUSÕES.....</b>  | <b>84</b> |
| <b>6.0 REFERÊNCIAS.....</b> | <b>84</b> |

## 1.0 INTRODUÇÃO GERAL

A produção de mandioca exerce expressiva importância mundial, estando atrás das culturas da soja, trigo, arroz, milho e batata (NOTARO et al., 2013). Por ser uma cultura com alta plasticidade fenotípica e adaptabilidade à diferentes condições edafoclimáticas, o seu cultivo está espalhado em todos estados do Brasil (IBGE, 2020). Infelizmente como toda planta cultivada a mandioca tem seu potencial produtivo limitado pela incidência de doenças, sendo a podridão radicular mais destrutiva da cultura, tendo em vista as dificuldades encontradas para seu manejo (SILVA et al., 2021).

Ainda não existe controle químico para doença e uma vez que o uso inadequado de fungicidas pode ocasionar desequilíbrios ao agroecossistema, (LEITE & LOPES, 2018), e que até o momento poucas são as variedades comerciais de mandioca com resistência a este complexo de doenças (HOHENFELD et al., 2022), é fundamental a busca de outras vias de soluções, dentre estas o uso de agentes de biocontrole (SILVA et al., 2021).

Os agentes de biocontrole são organismos benéficos que podem ser aplicados em culturas agrícola, visando o aproveitamento de suas atividades de supressão de doenças via produção de substâncias biologicamente ativas, que exercem efeitos negativos diretos e de indução de resistência aumentada sobre pragas e patógenos. Diante dessas características tornam-se alternativas adequadas para o manejo de doenças de plantas (STENBERG et al., 2021; SINGH et al., 2020; KÖHL; KOLNAAR; RAVENSBERG, 2019).

Ainda existem poucos trabalhos relacionados ao uso de microrganismos no manejo das podridões negra e seca da mandioca, o que se sabe é que espécies de *Bacillus* sp. e *Trichoderma* sp. tem exercido efeitos supressores de modo geral em outros fitopatógenos (SÁ et al., 2019), o que torna seu uso uma estratégia para desenvolvimento de práticas de manejo eficientes para a cultura. Diante do exposto, o foco deste foi o de selecionar microrganismos com potencial antagonista para o manejo da doença da podridão radicular negra e seca da mandioca.

## 2.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Mandioca

A mandioca é uma cultura pertencente à família Euphorbiaceae, gênero *Manihot* e espécie *Manihot esculenta* Crantz, originária da América do Sul é uma planta perene, rústica e arbustiva, que exibe um sistema radicular rico em amido, sendo de grande importância para a alimentação humana, animal e para a indústria, sendo um dos principais alimentos para mais de 700 milhões de pessoas. O Brasil participa com parte de 10% da produção mundial, dentro de mais 100 países que cultivam a mandioca, atualmente com sua produção em redução, já caiu de para a sexta posição (IBGE, 2021; EMBRAPA, 2020; FAO, 2020; FUKUDA, 2002).

Cultivada por pequenos agricultores, a mandioca é rica em carboidratos, é utilizada tanto na alimentação humana quanto no animal. Sua principal parte são as raízes tuberosas, onde se concentra maior quantidade de fécula. Por isso serve como base para alimentação humana (*in natura* e na fabricação de farinhas, polvilhos, entre outros). Para alimentação animal aproveitam-se tanto as raízes quanto a parte aérea (FAO, 2013; AGUIAR et al., 2011).

Possui papel de destaque importante na alimentação humana, podendo ser consumidas frescas após cozimento, processadas em produtos alimentícios ou dadas como ração aos animais. O amido da mandioca pode ser usado numa ampla gama de indústrias, na indústria alimentícia, metalúrgica, mineração, construção, cosmética, na fabricação produtos farmacêuticos até a produção de madeira compensada, papel e papelão, têxtil e bioetanol entre outras (FAO, 2013; JESUS, 2013).

Na safra de 2020 o rendimento médio da cultura no país foi de 14.951 kg/ha (IBGE, 2020), no ano de 2021 a produção conseguiu alcançar o rendimento de 15.000 kg/ha. A Bahia corresponde a maior produção da cultura no Nordeste, mesmo com o declínio, com uma redução de mais de 10% no ano de 2021, totalizando 861.502 t de produção. O Nordeste já foi destaque na produção da cultura, ocupando hoje o 3º lugar no ranking de produção, a região Norte hoje segue liderando a produção, seguido da região Sul (IBGE, 2021), sendo o maior consumo destinado ao subproduto da farinha de mandioca, produto que exerce

um papel importante na base alimentar da dieta brasileira. Consumida pelas mais variadas classes de renda do país, é o produto de maior popularidade da cultura da mandioca (AGUIAR et al., 2011).

Apesar de ser uma cultura tolerante a diversas condições climáticas, a realização de práticas inadequadas de manejo e conservação do solo na cultura, podem vir a limitar o desenvolvimento da cultura, sendo água, pH e fertilização do solo, fatores indispensáveis para sanidade e produtividade da planta, podendo a mandioca, apesar da sua rusticidade, ser infestada por diferentes grupos de fitopatógenos, que vem a comprometer significativamente a sua produção. A mandioca pode ser atacada por mais de 30 agentes etiológicos diferentes, como bactérias, fungos, vírus e fitoplasmas (PINHEIRO et al., 2021; ANJOS et al., 2011; FUKUDA, 2002).

O caule da mandioca é atacado por diversos agentes fitopatogênicos, que geralmente induzem podridões internas ou externas (SOUZA & SOUZA, 2002). Dentre as principais doenças que acometem a cultura da mandioca no Brasil, destacam-se a bacteriose e mancha bacteriana causadas por bactérias; a antracnose e podridões radiculares causadas por fungos; superbrotamento causada por fitoplasmas; couro de sapo e doença do mosaico que são causadas por vírus, todas elas podendo levar a perdas consideráveis de produção na cultura (OLIVEIRA et al., 2020; MCCALLUM et al., 2017; TREMACOLDI, 2016; PEREIRA et al., 2015; FAO, 2013).

## **2.2 Podridões radiculares**

As podridões radiculares são causadas por fungos dos gêneros *Phytophthora*, *Fusarium*, *Pythium*, *Neoscytalidium*, *Rosellinia* e *Diiploia*, que ocorrem especialmente em áreas de solos argilosos, mal drenados durante períodos de chuvas intensas e com elevado teor de matéria orgânica. Sua disseminação pode ocorrer de várias maneiras, das quais a principal é a introdução de material propagativo contaminado em área livre da doença (VILAS-BOAS, 2015; FAO, 2013; ANJOS, et al., 2011; FUKUDA, 2002).

Algumas espécies de fungos associados a doença se manifestam em outras culturas, sendo relatadas também nas de interesse agrônomo, inhame (MELLO et al., 2019), batata-doce (MELLO et al., 2021), pitaya (NGUYEN et al., 2019) palma forrageira (BRITO et al., 2022), seringueira (SAJITHA et al., 2017),



melancia (SANTOS et al., 2022), fava (SOUSA et al., 2017), soja (WRATHER et al., 1997), dentre outras. Na mandioca as espécies *Lasiodiplodia euphorbicola*, *Lasiodiplodia pseudotheobomae* e *Neoscytalidium hyalinum*, pertencentes à família Botryosphaeriaceae foram descritas pela primeira vez no Brasil como agentes infecciosos da podridão negra na cultura (MACHADO et al., 2014), *Phytophthora melonis* foi relatada pela primeira vez na Bahia por Oliveira et al. (2016), causando podridão radicular mole nas plantas.

Os sintomas de podridão de raízes de mandioca são variáveis, e dependem fundamentalmente dos agentes causais (FUKUDA, 2002), sendo oomicetos e fungos os de redução de rendimento mais frequentes. Oomicetos relatados são *Aphanomyces* spp., *Pythium* spp. e *Phytophthora* spp. (BODAH, 2017).

No geral, as podridões radiculares apresentam, como sintoma primário, o apodrecimento das raízes e, como sintomas secundários, o amarelecimento e a murcha da parte aérea das plantas (MACHADO et al., 2018; ANJOS et al., 2011). Os danos causados pelos fitopatógenos de sistema radicular trazem prejuízos no rendimento total da cultura, o que conseqüentemente dificulta a comercialização do produto trazendo danos econômicos. Há relatos de redução de rendimento de até 85%, dependendo do fungo causador da doença, da suscetibilidade das cultivares e das condições de drenagem da área sob cultivo. Em condições favoráveis, as perdas causadas pela doença podem chegar a 100% (OLIVEIRA et al., 2013; ANJOS et al., 2011).

Como consequência da podridão das raízes, podem ocorrer queda das folhas, amarelecimento, seca, murcha parcial ou total foliar e a morte das plantas. Dentre as podridões radiculares que afetam a mandioca estão: podridão-negra; podridão-seca e podridão-mole. As perdas da produção costumam ser menores para a podridão-seca, quando comparada à podridão-mole e podridão negra, mas em alguns plantios há perda quase total das raízes, se as cultivares plantadas forem muito suscetíveis aos patógenos (TREMACOLDI, 2016; ANJOS et al., 2011).

Os sintomas de podridão negra se caracterizam por lesões enegrecidas nas raízes e caule da planta, diferentemente dos sintomas de podridão seca onde consiste no aparecimento de estrias marrom escura e raízes com aspecto seco, sendo relacionada com áreas de solo arenosos e ácidos, já a podridão mole

apresenta características semelhantes a podridão seca, porém as lesões amarronzadas acabam necrosando o tecido vegetal e gerando odor fétido, são doenças comuns em cultivos localizados em áreas com solo argiloso e mal drenado, que pode acumular bastante água durante o período chuvoso (VILAS BOAS et al., 2017; FUKUDA, 2002), podendo causar prejuízos na produção de 50 a 100%. A perda total está relacionada ao plantio de variedades suscetíveis à doença (TREMACOLDI, 2016).

Fungos associados a manifestação da doença da podridão negra estão ligados a espécies de Botryosphaeriaceae sendo os principais patógenos causadores da podridão tuberosa da raiz e do caule no Brasil (MELLO et al., 2021). Se manifestam em situações oportunas, como estresse hídrico, danos físicos/mecânicos, estresses biológicos causados por infecção de insetos ou outros patógenos, além da superlotação de plantas num determinado espaço, tipo de solo e temperatura do local. Um aspecto que diferencia a família dos demais fungos endofíticos, é o potencial de algumas espécies que caracterizam patógenos mais agressivos, quando as plantas estão em situação de estresse, sendo estes microrganismos potenciais em causar maiores danos em larga escala, tendo em vista o agravante das mudanças climáticas (SLIPPERS & WINGFIELD, 2007).

Machado et al. (2018), constatou uma elevada incidência de podridão-negra-das-raízes em diversas áreas cultivadas na região Nordeste do Brasil e em algumas áreas do Sudeste. Porém mesmo diante desta situação, nenhum estudo epidemiológico foi realizado, ainda sendo relativo as porcentagens de perdas de rendimento na cultura pela doença.

Espécies pertencentes ao gênero *Fusarium* são um dos principais causadores de danos, exibindo conjunto significativo de fungos associados as podridões radiculares da mandioca, causando grandes impactos econômicos nas lavouras da cultura ao redor do mundo, sua colonização direta nas raízes tuberosas é o que causam a podridão de consistência seca. Ao menos 13 grupos de *Fusarium* associados a raízes apodrecidas da mandioca foram distinguíveis, sendo cada grupo uma provável espécie distinta, sendo a sua maioria *F. oxysporum* e *F. solani*. (PAIVA et al., 2022; OLIVEIRA et al., 2013; BANDYOPADHYAY et al., 2006).

A adoção de práticas para que se elimine a chance de entrada/desenvolvimento da doença, inclui a utilização de manejo integrado, incluindo uso de variedades resistentes e de práticas culturais, como plantio em áreas bem drenadas, sem histórico de ocorrência de doenças radiculares, plantio de manivas sem foco da doença, destruição e queima de manivas e de raízes provenientes de áreas com podridões radiculares e a rotação de cultura (FIGUEIREDO, 1970; MATTOS; FARIAS; FERREIRA FILHO, 2006). Hoje o desenvolvimento de material resistente tem sido investigado e aplicado, porém pode ser superada pelo alto fluxo gênico e reprodução sexual dessas espécies fúngicas. A melhor abordagem de controle é, portanto, a prevenção da entrada de espécies patogênicas (SLIPPERS & WINGFIELD, 2007).

Essas doenças são altamente influenciadas pelo ambiente, com uma ampla gama de hospedeiros, patógenos que chegam a sobreviver muitos anos no solo, através da produção de escleródios e clamidósporos. Os sintomas que se manifestam a princípio na raiz da planta, tornam a podridão radicular doença mais grave da cultura da mandioca no mundo todo, tendo em vista a alta complexidade destes microrganismos. Até agora, não existe um controle efetivo da doença, ainda há escassez de trabalhos relacionados à epidemiologia e as características intrínsecas de cada patógeno, que podem vir a modificar o manejo da doença, porém de um modo geral a aplicação de agentes de controle biológico hoje é uma alternativa viável, principalmente em conjunto com outras práticas de manejo integrado (BELLÉ & FONTANA, 2018, BODAH, 2017; SILVA, 2017).

O controle de doenças biológico surgiu diante de preocupações frequentes sobre o uso exagerado de produtos químicos. Sendo assim, o controle biológico hoje é definido como a ação e a combinação de mecanismos dos microrganismos que sejam antagonistas sobre fitopatógenos. Essa diversidade de microrganismos e suas relações antagônicas, constituem uma alternativa para o controle biológico aplicado. (BRAGA JUNIOR et al., 2016; WHIPPS, 2001).

### **2.3 Manejo biológico: fungos e bactérias**

O uso de agentes de controle biológico se dá pela ação de microrganismos que vão competir por espaço e nutrientes com patógenos, interagindo por meio de mecanismos de antibiose, secretando agentes antimicrobianos contra patógenos

que irão matar e invadir as estruturas principais sendo elas esporos de patógenos, bem como micélio, células e endosporos. (SINGH, 2020).

Estas características que conferem aos microrganismos a designação de antagonistas, têm sido amplamente exploradas para controle biológico, como *Trichoderma* spp. e *Bacillus* spp., entre outros, como uma alternativa eficiente para reduzir o uso de fungicidas químicos no controle de doenças de culturas (RIOS-VELSACO et al., 2015).

As espécies de *Trichoderma* spp. têm se mostrado eficazes na redução de incidência de doenças em diversas culturas, sendo eles fungos muito difundidos na natureza, de hábito saprófito e rápido crescimento, o que facilita o seu cultivo, com características em produzir grande quantidade de conídios de longa vida útil (JAHAN et al., 2013).

A espécie exerce atividades antagonistas eficientes em relação a podridão negra da raiz da mandioca causada por *Scytalidium lignicola*, através de diferentes mecanismos, como antagonismo *in vitro*, produção de quitinase, redução de severidade da podridão-negra da mandioca na parte aérea e nas raízes. O fungo também é capaz de gerar aumento na massa de raízes por planta, para a espécie de fungo causador da podridão mole, sob plantio convencional (SILVA et al., 2017; STEFANELLO et al., 2017).

Um dos gêneros de rizobactérias com poder antagonista de maior relevância é o *Bacillus* spp., onde apresenta efeito inibidor de crescimento micelial do fungo *Fusarium subglutinans* e efeito inibidor significativo em *F. oxysporum* e *F. solani*, a bactéria se destaca por formar endósporo resistentes a condições adversas e apresentar uma multiplicidade de mecanismos antagônicos, sendo eles competição de substrato de produtos químicos inibitórios, como metabólitos com atividades microbianas termoestáveis, resistindo a altas temperaturas sem que se perca suas características antifúngicas e a indução de resistência sistêmica (DORIGHELLO et al., 2020; GABARDO et al., 2020; SOBRINHO et al., 2018; SILVA et al., 2017; BRAGA JUNIOR et al., 2016)

Diversas cepas de *Bacillus* spp. foram caracterizadas e identificadas atividades antibacterianas e antifúngicas fortes contra fitopatógenos, esta característica confere eficiência de biocontrole, levando a atividade inibitória sobre o crescimento desses patógenos. Estas bactérias têm 5 a 8% do seu genoma ligado a biossíntese de metabólitos secundários, tendo como principais moléculas

bioativas os peptídeos, lipopetídeos, bacteriocinas e sideróforos. Em geral, eles têm um amplo espectro de atividade antagônica contra bactérias patogênicas de plantas, fungos e vírus (FIRA et al., 2018).

Sendo assim o uso de microrganismos como bactérias e fungos com potencial antagônico baseado em estudos realizados em outras culturas visando o controle de fungos fitopatogênicos e demais patógenos, vem se tornando cada vez mais recorrente. Visto a necessidade de se buscar alternativas de manejos eficientes em doenças da mandioca o controle biológico se torna uma alternativa viável a ser utilizado na cultura.

### 3.0 REFERÊNCIAS

AGUIAR, E. B. et al. Efeito da densidade populacional e época de colheita na produção de raízes de mandioca de mesa. **Bragantia**, v.70, p.561–569, 2011.

ANJOS, M. S. S. et al. Principais doenças da mandioca no Cerrado. In: **Mandioca no Cerrado: orientações técnicas**, 2ed. Planaltina, DF: EMBRAPA Cerrados, 2013. p.120.

BANDYOPADHYAY, R. et al. *Fusarium* Species from the cassava root rot complex in West Africa. **Phytopathology**, v.96, n.6, p.673–676, 2006.

BELLÉ, R.; FONTANA, D. Patógenos de solo: principais doenças vasculares e radiculares e formas de controle. **Enciclopédia Biosfera**, v.15, n.28, p.779–803, 2018.

BETTIOL, W. et al. Supressividade a fitopatógenos habitantes do solo. In: **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. 1ed. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, 2009. p.187-204

BODAH, E. T. Root rot diseases in plants: a review of common causal agents and management strategies. **Agricultural Research & Technology: Open Access Journal**, v.5, n.3, p.1-8, 2017.

BRAGA JUNIOR, G. M. B. et al. Controle biológico de fitopatógenos por *Bacillus subtilis* in vitro. **Biota Amazônia**, v.7, n.3, p.45-51, 2017.

BRITO, F. da S. et al. Selection and control efficacy of *Trichoderma* spp. against *Fusarium solani* and *Lasiodiplodia theobromae* causing root rot in forage cactus. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.122, p.101900, 2022.

DORIGHELLO, D. V. et al. Management of Asian soybean rust with *Bacillus subtilis* in sequential and alternating fungicide applications. **Australasian Plant Pathology**, v.49, p.79-86, 2020.

EMBRAPA. **Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura**, 2020. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/mandioca-e-fruticultura/cultivos/mandioca>>. Acesso em: 23 jan. 2021.

FAO. Produzir mais com menos. Mandioca um guia para a intensificação sustentável da produção. **Informe de política**, 2013. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-i2929o.pdf>>. Acesso em: 02 fev. 2021.

FIGUEIREDO, M. M. Podridão mole das raízes da mandioca (*Manihot esculenta*). **Pesquisa agropecuária**, v.5, n.1, p.389-393, 1970. Disponível em: <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/373086/1/17829764191SM.pdf>>. Acesso em: 24 set. 2021.

FIRA, D. et al. Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. **Journal of biotechnology**, v.285, p.44-55, 2018.

FUKUDA, W.M. et al. Cassava Breeding. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.2, n.4 p.617-638, 2002.

FUKUDA, C. Principais doenças da mandioca. **In: Aspectos do Cultivo da Mandioca em Mato Grosso do Sul**. 1ed. Dourado – MS: EMBRAPA Agropecuária Oeste, 2002. p.191-204. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/38819/1/LV20021.pdf#page=109>>. Acesso em: 12 nov. 2021.

GABARDO, G. et al. *Trichoderma asperellum* e *Bacillus subtilis* como antagonistas no crescimento de fungos fitopatogênicos *in vitro*. **Brazilian Journal of Development**, v.6, n.8, p.55870-55885, 2020.

HOHENFELD, C. S. et al. Genome-wide association study and selection for field resistance to cassava root rot disease and productive traits. **PLOS ONE**, v. 17, n. 6, p. e0270020, 2022.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE – **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola – LSPA**, 2020. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/188#resultado>>. Acesso em: 20 jan. 2021.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE – **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola – LSPA**, 2021. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/188#resultado>>. Acesso em: 13 ago. 2022.

JAHAN, N. et al. Evaluation of the growth performance of *Trichoderma harzianum* (Rifai.) on different culture media. **Journal of Agriculture and Veterinary Science**, v. 3, p. 44-50, 2013.

JESUS, A. M. S et al. Avaliação agrônômica de cultivares e clones de mandioca em área irrigada no Norte de Minas Gerais. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 12, n. 3, p.205-210, 2013.

KÖHL, J.; KOLNAAR, R.; RAVENSBERG, W. J. Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: Relevance beyond efficacy. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p.845, 2019.

LEITE, I. C. H.; LOPES, U. P. Controle químico de patógenos radiculares. **In: Desafios do Manejo de Doenças Radiculares Causadas por Fungos**. 1ed. Recife: Editora Universitária da Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, v. 11, p. 179-192, 2018.

MACHADO, A. R. et al. Podridões fúngicas de raízes tuberosas no Nordeste brasileiro: etiologia e manejo. **In: Desafios do Manejo de Doenças Radiculares Causadas por Fungos**. Recife: Editora Universitária da Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE. v.11, p. 95–109, 2018.

MACHADO, A. R. et al. New occurrences of Botryosphaeriaceae causing black root rot of cassava in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 39, n. 6, p. 464–470, dez. 2014.

MATTOS, P. L. P; FARIA, A. R. N.; FERREIRA FILHO, J. R. **Mandioca: o produtor pergunta, a Embrapa responde**. 1ed. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical; Brasília, DF: **Embrapa Informação Tecnológica**. 2006. p.183.

MCCALLUM, E. J. et al. Tackling agriculturally relevant diseases in the staple crop cassava (*Manihot esculenta*). **Current opinion in plant biology**, v.38, p.50-58, 2017.

MELLO, J. F. et al. First report of *Neoscytalidium dimidiatum* causing root rot in sweet potato in Brazil. **Plant Disease**, v. 103, n. 2, p. 373, 2019.

MELLO, J. F. et al. Identification and pathogenicity of Botryosphaeriaceae species associated with root and stem rot of sweet potato in Brazil. **Plant Pathology**, v. 70, n. 7, p. 1601–1615, 2021.

NGUYEN, N. N. et al. Isolate *Neoscytalidium dimidiatum* fungal pathogens from pytaya (*Hylocereus undatus*) and research controlling by microorganisms. **VNUHCM Journal of Natural Sciences**, v. 3, n. 4, p. 286–293, 2019.

NOTARO, K. A. et al. Prospecção de fitopatógenos associados à podridão radicular da mandioca em Pernambuco, Brasil. **Biosci. j. (Online)**, v.29, n.6, p.1832–1839, 2013.

OLIVEIRA, S. A. S. de et al. Resistance to *Fusarium* dry root rot disease in cassava accessions. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, n. 10, p. 1414–1417, out. 2013.

OLIVEIRA, S. A. S. de et al. First report of *Phytophthora melonis* causing cassava wilt and root rot in Bahia State, Brazil. **Summa Phytopathologica**, v. 42, p. 107–107, 2016.

OLIVEIRA, S. A. S. et al. **Escala de notas inespecíficas para seleção de plantas de mandioca resistentes a doenças foliares**. Cruz das Almas – BA: EMBRAPA Mandioca e Fruticultura - Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E), 2020. p.16

PAIVA, G. F. et al. Avaliação de resistência a *Fusarium solani* em genótipos de mandioca. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 9, p. e23911931734–e23911931734, 2022.

PEREIRA, J. dos S. et al. Identificação e diagnose molecular de patógenos associados ao couro-de-sapo da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). 9ed., Cruz das Almas – BA: EMBRAPA Mandioca e Fruticultura - Anais de congresso **In: 9ª JORNADA CIENTÍFICA EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA**, Cruz das Almas, BA, 2015.



PINHEIRO, W. L. et al. Características agronômicas e produção da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz cv. BRS-Poti) submetida a tratos culturais. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 2, p. 18314-18325, 2021.

RIOS-VELSACO, C. et al. Identification and antagonistic activity in vitro of *Bacillus* spp. and *Trichoderma* spp. isolates against common phytopathogenic fungi. **Revista Mexicana de Fitopatología**, v.34, n.1, p.85-99, 2015.

SÁ, M. N. F. de et al. Efeito de *Bacillus* sp. e *Trichoderma* sp. no crescimento micelial de *Sclerotium rolfsii*. **Acta Brasiliensis**, v. 3, n. 2, p. 79–81, 2019.

SAJITHA, K. L.; DEV, S. A.; MARIA FLORENCE, E. J. Biocontrol potential of *Bacillus subtilis* B1 against sapstain fungus in rubber wood. **European Journal of Plant Pathology**, v. 150, n. 1, p. 237–244, 4 jul. 2017.

SANTOS, C. P. de S. et al. First Report of *Lasiodiplodia brasiliensis* Causing Root Rot on Watermelon in Brazil. **Plant Disease**, v.107, n.2, p.573, 2022.

SILVA, J. A. T. et al. Antagonistic activity of *Trichoderma* spp. against *Scytalidium lignicola* CMM 1098 and antioxidant enzymatic activity in cassava. **Phytoparasitica**, v.45, n.2, p.219-225, 2017.

SILVA, I. O. et al. Antagonismo de *Trichoderma* spp a fitopatógenos causadores de podridão de raiz de mandioca em Alagoas. **Revista científica multidisciplinar núcleo do conhecimento**, v.12, p.149-177, 2020. Disponível em: <<https://www.nucleodoconhecimento.com.br/agronomia/antagonismodetrichoderm>>. Acesso em: 23 fev. 2021.

SINGH, S. et al. Biological control agents: diversity, ecological significances, and biotechnological applications. **Natural Bioactive Products in Sustainable Agriculture**, p. 31–44, 2020.

SLIPPERS, B.; WINGFIELD, M. J. Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. **Fungal Biology Reviews**, v. 21, n. 2-3, p. 90–106, 2007.

SOBRINHO, G. et al. Atividade antagonista de *Bacillus subtilis* sobre dois isolados de *Fusarium solani* do maracujazeiro, por diferentes métodos. **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA**, v.15, n.28, p.131-138, 2018.

SOUSA, E. S. et al. First Report of *Fusarium falciforme* (FSSC 3 + 4) Causing Root Rot in Lima Bean (*Phaseolus lunatus* L.) in Brazil. **Plant Disease**, v. 101, n. 11, p. 1954–1954, nov. 2017.

SOUZA, L. D. S. & SOUZA, L. S. Manejo do Solo para Mandioca In: **Aspectos do Cultivo da Mandioca em Mato Grosso do Sul**. 1ed. Dourado – MS: EMBRAPA Agropecuária Oeste, 2002. p.191-204. Disponível em:<<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/38819/1/LV20021.pdf#page=109>>. Acesso em: 12 nov. 2021.

STEFANELLO, L. et al. Manejo da podridão radicular da mandioca pela combinação de manejo de solo, variedade resistente e controle biológico com *Trichoderma harzianum*. **Raízes e Amidos Tropicais, Botucatu**, v.13, n.1, p.31-45, 2017.

STENBERG, J. A. et al. When is it biological control? A framework of definitions, mechanisms, and classifications. **Journal of Pest Science**, v.94, n.3, p.665–676, 2021.

TREMACOLDI, C.R. Manejo das principais doenças da cultura da mandioca no Estado do Pará. In: **Cultura da mandioca: aspectos socioeconômicos, melhoramento genético, sistemas de cultivo, manejo de pragas e doenças e agroindústria**. 21ed. Brasília: EMBRAPA Amazônia Oriental, 2016. Acesso em: 23 jan. 2021. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/150251/1/LV-Mandioca-cap9.pdf>>.

VILAS BOAS, S. A. V. et al. Survey of fungi associated with cassava root rot from different producing regions in Brazil. **Scientia Agricola**, v. 74, p. 60–67, 2017.

VISCONTI, A. et al. Métodos alternativos para o controle de fitopatógenos habitantes do solo: parte II – controle biológico. **Agropecuária Catarinense**, v.30, n.3, p.33–36, 2017.

WHIPPS, J. M. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, n.1, p. 487–511, 2001. Disponível em: <[https://academic.oup.com/jxb/article/52/suppl\\_1/487/2907083?login=false](https://academic.oup.com/jxb/article/52/suppl_1/487/2907083?login=false)>. Acesso em: 23 fev. 2021.

WRATHER, J. A. et al. Soybean Disease Loss Estimates for the Top 10 Soybean Producing Countries in 1994. **Plant Disease**, v. 81, n. 1, p. 107–110, 1997.

## CAPÍTULO 1

### **Antagonismo *in vitro* de isolados de *Trichoderma* spp. e *Bacillus* spp. à fungos causadores de podridões negra e seca da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz)**

O uso de microrganismos benéficos é uma alternativa eficiente, tendo em vista os resultados positivos em diversas culturas e a dificuldade no manejo e controle das podridões radiculares da mandioca. Portanto o objetivo deste trabalho foi o de avaliar o potencial antagonista *in vitro* de isolados de *Trichoderma* spp. e *Bacillus* spp. a espécies fúngicas causadoras das podridões negra e seca da mandioca. Um total de sete isolados de seis espécies causadoras de podridão seca *Fusarium oxysporum*, *F. verticillioides*, *F. lateritium*, *F. equiseti*, *F. chlamydosporum*, *F. solani* e três isolados de duas espécies causadores de podridão radicular negra da mandioca um da espécie *Lasiodiplodia theobromae* e dois isolados de *Neoscytalidium dimidiatum*. Os microrganismos potenciais agentes de biocontrole utilizados foram dez isolados de *Bacillus* spp. (BAC 2, BAC 3, BAC 4, BAC 5, BAC 6, APC 07, APC 51, 01 C, PA 05, 399) e três isolados de duas espécies de *Trichoderma* spp. (CMF1006, CMF1007, T.CANA). O experimento foi realizado em delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC), contendo dez repetições cada. Foi utilizado método de pareamento de culturas, foi colocado disco de micélio (5 mm) no centro da placa e Petri e em quatro pontos equidistantes foi colocado papel filtro onde foi pipetado 3 µL da solução contendo *Bacillus* spp. No pareamento com *Trichoderma* spp. os discos de micélio (5 mm) foram colocados em bordas opostas da placa, para o controle de ambos os pareamentos foi repicado o patógeno na placa, com ausência dos antagonistas. As análises foram realizadas após o crescimento micelial do controle atingir as bordas da placa seguindo para avaliação de potencial de inibição (%) de *Trichoderma* spp. e *Bacillus* spp. e a área do crescimento micelial para confronto com espécies de *Bacillus* spp. Todos os dados obtidos foram submetidos a análise de variância e as médias obtidas foram agrupadas em teste *Scott-Knott* à 5%. Todos os microrganismos pareados apresentaram potencial de inibição significativo quando comparados ao tratamento controle. Os isolados *Bacillus* sp. APC 07 e APC 51, apresentaram médias acima de 70% em mais de uma espécie de patógeno. A espécie *F. equiseti*, foi a mais susceptível aos isolados de *Bacillus* sp com 77,7% quando pareado com APC 51 e 75,3% quando pareado com APC 07 e *N. dimidiatum* CBPPR1010 mais resistente aos tratamentos com 26,9% para APC 51 e 17,9% para APC 07 de potencial de inibição. Todos os isolados de *Trichoderma* spp. testados foram capazes de controlar o crescimento micelial do patógeno *in vitro*, a espécie *T. asperellum* CMF 1007, possui maior capacidade de supressão dos fungos da podridão negra e seca da mandioca.

**Palavras-chave:** *Bacillus* spp., *Trichoderma* spp., Fitopatógeno

### **In vitro antagonism of *Trichoderma* spp. and *Bacillus* spp. to fungi that cause black and dry rot of cassava (*Manihot esculenta* Crantz)**

Studies with the use of beneficial microorganisms have become an alternative, in view of the positive results in different cultures and the difficulty in handling and controlling cassava root rot. Therefore, the objective of this work was to evaluate the in vitro antagonistic potential of *Trichoderma* spp. and *Bacillus* spp. to fungal species that cause cassava black and dry rot. A total of seven isolates of six species causing dry rot *Fusarium oxysporum*, *F. verticillioides*, *F. lateritium*, *F. equiseti*, *F. chlamydosporum*, *F. solani* and three isolates of two species causing black root rot of cassava *Lasiodiplodia theobromae* and two from *Neoscytalidium dimidiatum*. The microorganisms used as potential biocontrol agents were ten isolates of *Bacillus* spp. (BAC 2, BAC 3, BAC 4, BAC 5, BAC 6, APC 07, APC 51, 01 C, PA 05, 399) and three isolates of two species of *Trichoderma* spp. (CMF1006, CMF1007, T.CANA). The experiment was carried out in a completely randomized experimental design (DIC), with ten replications each. A culture pairing method was used, a mycelium disc (5 mm) was placed in the center of the Petri dish and filter paper was placed at four equidistant points where 3  $\mu$ L of the solution containing *Bacillus* spp was pipetted. In pairing with *Trichoderma* spp. the mycelium discs (5 mm) were placed on opposite edges of the plate, to control both pairings, the pathogen was spiked on the plate, with the absence of antagonists. The analyzes were carried out after the mycelial growth of the control reached the edges of the plate, proceeding to evaluate the inhibition potential (%) of *Trichoderma* spp. and *Bacillus* spp. and the mycelial growth area for confrontation with *Bacillus* spp. All data obtained were subjected to analysis of variance and the means obtained were grouped in the Scott-Knott test at 5%. All paired microorganisms showed significant inhibition potential when compared to the control treatment. *Bacillus* spp. APC 07 and APC 51 showed averages above 70% in more than one species of pathogen. The *F. equiseti* species was the most susceptible to *Bacillus* spp. isolates with 77.7% when paired with APC 51 and 75.3% when paired with APC 07 and *N. dimidiatum* CBPPR1010 more resistant to treatments with 26.9% for APC 51 and 17.9% for APC 07 of inhibition potential. All isolates of *Trichoderma* spp. tested were able to control the mycelial growth of the pathogen in vitro, the species *T. asperellum* CMF 1007, has a greater capacity to suppress black and dry rot fungi of cassava.

**Keywords:** *Bacillus* spp., *Trichoderma* spp., Phytopathogens.

## 1.0 INTRODUÇÃO

As podridões radiculares em mandioca (*Manihot esculenta* Crantz.) estão entre as principais doenças que mais causam danos a cultura, trazendo prejuízos socioeconômicos àqueles que se dedicam a cultivá-la (CORREIA & MICHEREFF, 2018). Atualmente ainda há dificuldades para manejo adequado desta doença, devido aos seus sintomas se expressarem à princípio nas raízes, resultando em um diagnóstico apenas na colheita, o que dificulta o manejo da doença (BRITO et al., 2019; CORREIA et al., 2014).

A utilização de material resistente às podridões considerada a estratégia de manejo mais eficaz da doença, tem demandado tempo para o desenvolvimento e avaliação da variedade, o que acaba trazendo a necessidade de se buscar outra via para solucionar e complementar com esta técnica, uma vez que a mandioca é uma cultura de elevado valor socioeconômico. (LOPES & MICHEREFF, 2018; BELLÉ & FONTANA, 2018; HOHENFELD et al., 2013).

Desta forma, o controle biológico apresenta-se como uma das alternativas mais eficazes para manejo de patógenos radiculares da mandioca, visto que vem se comprovando sua eficiência como controle positivo para outras culturas de interesse agrônomo, se tornando uma alternativa para o manejo das podridões na cultura da mandioca (SILVA et al., 2017)

Dentre os agentes de interesse para manejo biológico de culturas as bactérias do gênero *Bacillus* spp. têm sido mais comumente utilizadas, as espécies mais exploradas são *B. subtilis* e *B. amyloliquefaciens*, que apresentam uma capacidade genética total de síntese de metabólitos secundários e potencial para produzir mais de duas dúzias de compostos antimicrobianos estruturalmente diversos. As atividades antagônicas de *Bacillus* spp. estão frequentemente relacionadas com a produção de metabólitos com propriedades antibióticas (MILJAKÓVIC et al., 2020).

Outros promissores agentes de controle biológico são os fungos do gênero *Trichoderma* spp., particularmente *T. harzianum* e *T. viride* têm apresentado grandes potenciais como microrganismos agentes de biocontrole através de seus mecanismos diretos e indiretos, através de micoparasitismo, produções de enzimas, competição e antibiose (SILVA et al., 2016; SRIVASTAVA et al., 2014). É um fungo saprofítico, habitante natural do solo interagindo com as plantas

geralmente na região da rizosfera em diferentes níveis rizosféricos, possuem ação direta e indireta no controle, podem se estabelecer endofiticamente nos espaços intercelulares das primeiras camadas da epiderme, permanecendo em associação com as raízes por longos períodos, podendo perdurar por semanas ou meses (STEFANELLO, 2016).

A utilização de controle biológico, além de reduzir a população de patógenos no solo, não causa desequilíbrio nem contaminação ambiental a seres humanos constituindo se uma nova alternativa de manejo de doenças radiculares da mandioca (FONSÊCA NETO et al., 2016). Portanto o objetivo deste trabalho foi de avaliar o potencial antagonista *in vitro* de fungos e bactérias no controle das doenças de podridões negra e seca da mandioca, visando a utilização destes agentes de biocontrole no manejo das podridões em condições de campo.

## 2.0 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Local de desenvolvimento

O Experimento foi desenvolvido na cidade de Cruz das Almas, na empresa Embrapa Mandioca e Fruticultura, Laboratório de Fitopatologia – LABFITO.

### 2.2 Obtenção dos isolados de podridão radicular

Os isolados foram escolhidos de acordo com suas diferentes espécies sendo eles de podridão seca: *F. oxysporum*; *F. equiseti*; *F. verticillioides*; *F. lateritium*; *F. chlamydosporum*; *F. solani* e causadores de podridão negra: *Lasiodiplodia theobromae*; *Neoscytalidium dimidiatum* (Tabela 1), todos os isolados utilizados são pertencentes à coleção do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Mandioca e Fruticultura.

Os fungos foram reativados para crescimento em meio BDA (Batata Dextrose e Ágar) e foram submetidos à uma temperatura de  $\pm 25^{\circ}\text{C}$  em câmara BOD por 7 dias, para testes posteriores.

Tabela 1. Classificação dos isolados de podridão radicular da mandioca

| CÓDIGO*   | CLASSIFICAÇÃO              |
|-----------|----------------------------|
| CBPPR0008 | <i>F. chlamydosporum</i> . |
| CBPPR0031 | <i>F. equiseti</i>         |
| CBPPR0006 | <i>F. oxysporum</i>        |
| CBPPR0007 | <i>F. oxysporum</i>        |
| CBPPR0012 | <i>F. lateritium</i>       |
| CBPPR0048 | <i>F. verticillioides</i>  |
| CBPPR0059 | <i>F. solani</i>           |
| CBPPR1002 | <i>L. theobromae</i>       |
| CBPPR1010 | <i>N. dimidiatum</i>       |
| CBPPR1011 | <i>N. dimidiatum</i>       |

\*Coleção Microbiológica do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Mandioca e Fruticultura, isolados da rizosfera de mandioca – isolados da região de Umbaúba – Sergipe.

### 2.3 Agentes de biocontrole

Foram utilizados dez isolados bactérias do gênero *Bacillus*, sendo eles: BAC 2, BAC 3, BAC 4, BAC 5, BAC 6, 399, 01C, APC 07, APC 51, PA 05 (Tabela 2). Os isolados de fungos, fazem parte do gênero *Trichoderma* spp. sendo três isolados utilizados: CMF 1006, CMF 1007, T.CANA (Tabela 2), sendo todos isolados cedidos da coleção de microrganismos do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Mandioca e Fruticultura – Cruz das Almas – Bahia.

Tabela 2. Classificação dos microrganismos utilizados com potencial de biocontrole e suas respectivas origens.

| CÓDIGO   | CLASSIFICAÇÃO                 | HOSPEDEIRO    | SUBSTRATO   | LOCAL             |
|----------|-------------------------------|---------------|-------------|-------------------|
| CMF1007* | <i>Trichoderma asperellum</i> | Plantio Sisal | Solo        | X                 |
| CMF1006* | <i>Trichoderma asperellum</i> | X***          | X           | X                 |
| T. CANA* | <i>Trichoderma harzianum</i>  | X             | X           | X                 |
| 399*     | <i>Bacillus</i> spp.          | X             | X           | X                 |
| APC 51*  | <i>Bacillus</i> spp.          | 'Prata Anã'   | Pseudocaule | Cruz das Almas-BA |
| PA 05*   | <i>Bacillus</i> spp.          | 'Prata Anã'   | Pseudocaule | Cruz das Almas-BA |
| APC07*   | <i>Bacillus</i> spp.          | 'Prata Anã'   | Rizosfera   | Cruz das Almas-BA |
| 01C **   | <i>Bacillus</i> spp.          | Feijão        | Filoplano   | Cruz das Almas-BA |
| BAC 2 ** | <i>Bacillus</i> spp.          | X             | X           | Cruz das Almas-BA |
| BAC 3 ** | <i>Bacillus</i> spp.          | X             | X           | Cruz das Almas-BA |
| BAC 4 ** | <i>Bacillus</i> spp.          | X             | X           | Cruz das Almas-BA |
| BAC 5 ** | <i>Bacillus</i> spp.          | X             | X           | Cruz das Almas-BA |
| BAC 6 ** | <i>Bacillus</i> spp.          | X             | X           | Cruz das Almas-BA |

\*Coleção Microbiológica do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Mandioca e Fruticultura.

\*\*Coleção Microbiológica do Laboratório de Fitopatologia Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB.

\*\*\*Hospedeiro; substrato e local desconhecido.

Todos os fungos foram isolados e colocados para crescimento em meio de cultivo BDA (Batata Dextrose e Ágar) e submetidos à uma temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  em câmara B.O.D. por 7 dias, para testes posteriores. Para as estirpes de bactérias, foram ativadas em meio ágar-nutriente e colocadas para crescimento em temperatura de  $\pm 25^\circ\text{C}$  em câmara B.O.D. durante 24 horas.

#### 2.4 Antagonismo *in vitro* de *Bacillus* spp. a fungos causadores de podridões radiculares da mandioca

Um disco de micélio do fitopatógeno, de 5 mm de diâmetro, foi inserido no centro da placa de Petri, contendo meio de cultivo BDA. Em quatro pontos equidistantes do disco do micélio, foram adicionados em discos de papel filtro com auxílio de micropipeta 3  $\mu\text{L}$  da suspensão de cada bactéria testada como provável antagonista. Para preparação da solução as bactérias foram repicadas em meio líquido nutriente-ágar (NA) e colocadas em mesa agitadora por 24h à



120 rpm, após este período foram ajustadas em espectrofotômetro a uma concentração de 0,7 (OD<sub>600</sub>).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), utilizando-se dez isolados bacterianos, que foram pareados com as espécies de patógenos selecionadas, sendo pareado uma espécie por vez, cada pareamento bactéria x fitopatógeno contendo 10 repetições para cada espécie. O controle foi utilizado em placas contendo apenas o fitopatógeno, totalizando 110 placas de Petri, todas padronizadas em tamanho (9 cm).

Para avaliação de potencial de biocontrole entre pareamento de bactérias x fungo, foi avaliado efeito antagonista de bactérias através de seu potencial de inibição (%) e da área (cm<sup>2</sup>) de crescimento micelial do fitopatógeno. Sendo o cálculo da área realizado através da seguinte expressão:

$A = \pi \frac{D_1 \times D_2}{4}$ , onde D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub>, são os valores do diâmetro do micélio mensurado nos dois sentidos opostos.

Para mensurar potencial de inibição a fórmula utilizada foi:  $PI\% = \frac{(D_1 - D_2)}{D_1 \times 100}$ , sendo D<sub>1</sub> o diâmetro do micélio encontrado na ausência do antagonista e, D<sub>2</sub> crescimento do micélio na presença do antagonista.

O experimento foi avaliado tomando como base o tratamento controle, onde as avaliações foram realizadas quando o crescimento micelial do fitopatógeno atingiu a borda da placa de Petri. As placas foram acondicionadas em câmara de crescimento BOD, com temperatura de 25 ± 2°C e fotoperíodo de 12 horas.

## **2.5 Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* spp. a fungos causadores de podridões radiculares da mandioca**

Para avaliação de potencial de biocontrole de fungos de *trichoderma* foi utilizado o método de pareamento duplo, onde foram colocados em bordas opostas da placa de Petri contendo o meio de cultura BDA, um disco do micélio do fitopatógeno e um do potencial antagonista, cada um com tamanho de 5 mm, neste experimento foi avaliado o Potencial de Inibição (%) de crescimento micelial do patógeno.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), utilizando as dez espécies de fungo de podridão radicular pareando cada um com as três isolados de *Trichoderma* spp., sendo todos tratamentos com dez repetições, placas contendo apenas o fitopatógeno foram utilizadas como controle, totalizando assim 35 placas de Petri. As placas foram acondicionadas em câmara de crescimento BOD, com temperatura de  $25 \pm 2$  °C e fotoperíodo de 12 horas.

A avaliação dos dados se deu com o auxílio de uma régua onde mensurou-se o crescimento radial do fitopatógeno, na presença e ausência dos antagonistas. A inibição dos fitopatógenos foi estimada, utilizando-se a seguinte expressão:  $PI\% = \frac{(C-T)}{C} \times 100$ , sendo C o crescimento radial do micélio encontrado na ausência do antagonista e, T crescimento radial do micélio na presença do antagonista.

## 2.6 Análise Estatística

As variáveis analisadas foram submetidas a análise de variância – ANOVA ( $p < 0,05$ ) e as médias obtidas foram agrupadas à teste *Scott Knott* a 5% de probabilidade, por meio do pacote “*ExpDes*” em software *R* 4.2.0 e os gráficos construídos com auxílio do pacote “*gplots*” e “*ggplot2*” em software estatístico *R* 4.2.0. Para os dados percentuais de potencial de inibição foi realizada a transformação dos dados para arcoseno  $\sqrt{x(\%)}$ .

## 3.0 RESULTADOS

### 3.1 Antagonismo *in vitro* de *Bacillus* spp. a fungos causadores de podridões radiculares da mandioca

O efeito antagonista das bactérias do gênero *Bacillus* spp. foram positivos nos testes de pareamento com fungos de podridão radicular, com inibição do crescimento micelial significativo ( $p \leq 0,05$ ) para todos os isolados testados *in vitro*. Para as espécies de fungo causador da podridão negra *Lasiodiplodia theobromae* (CBPPR1002), *Neoscytalidium dimidiatum* (CBPPR1010 e CBPPR1011) todos os isolados testados diferiram estatisticamente do tratamento Controle pelo teste de *Scott-Knott* ( $p < 0,05$ ). Os isolados bacterianos APC 07 e 399 obtiveram área de crescimento micelial ( $\text{mm}^2$ ) reduzida numa porcentagem entre 50 e 70%. Para

*Neoscytalidium dimidiatum* CBPPR1011, o isolado APC 51 apresentou uma redução de 72,11% de potencial de inibição seguido das médias percentuais dos isolados de BAC 5 e BAC 3 de 66,7% e 64,2%. Para *L. theobromae* CBPPR1002, houve potencial de 57,83% no pareamento com isolado APC 07, os isolados BAC 5, BAC 6 e PA 05 obtiveram percentuais próximos entre 56% e 55%.

Para o isolado 399, foi nítida a aparição de halo de inibição para CBPPR1011 e CBPPR1002, com porcentagem de inibição de 67,61% para *N. dimidiatum* e 56,72% para *L. theobromae*. É importante ressaltar, que para o isolado de CBPPR1010, foi possível notar que houve uma maior resistência ao antagonismo dos microrganismos pareados, quando comparado com as demais espécies, obtendo para este as menores médias de potencial inibitório, sendo o maior percentual de 47,44% para pareamento com isolado APC 07, seguido de 399 com 44,61% e 35,66% para isolado APC 51

*N. dimidiatum* CBPPR1011, alcançou percentuais acima de 70% com um mínimo de 55%, o que não houve para *N. dimidiatum* CBPPR1010, que apresentaram percentuais abaixo de 50%, já *L. theobromae* CBPPR1002 se manteve nas médias de 52% a 57% (Figura 3.A)

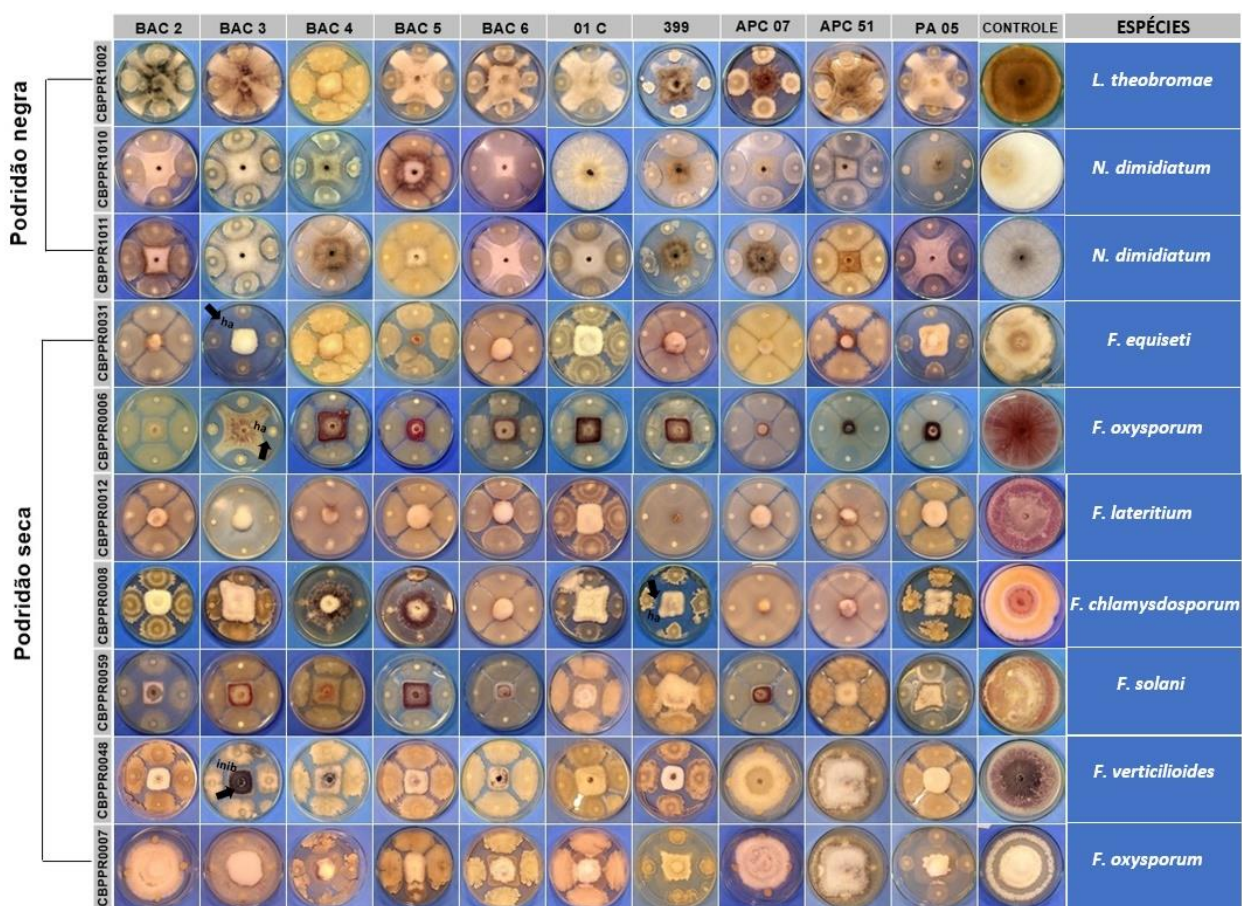
Quanto aos isolados de APC 07 e APC 51 foram os que representaram maior redução de área de patógeno, para a espécie *F. oxysporum* CBPPR0006, os isolados apresentaram média percentual de 74,3% e 71,3% respectivamente. Quando pareados com APC 07, os patógenos *F. solani* CBPPR0059 e *F. verticillioides* CBPPR0012, apresentaram, respectivamente, potencial de inibição de 66,3% e 65,5%.

O fitopatógeno que sofreu maior efeito de supressão aos antagonistas testados foi *F. equiseti* CBPPR0031, com metade dos isolados apresentando médias de potencial inibitório de mais de 70%. Para *F. verticillioides* CBPPR0012 mais da metade dos isolados alcançaram o potencial de inibição de mais de 60% (Figura 3.B), em *F. lateritium* CBPPR0048 mais da metade chegaram a este percentual, já para *F. chlamydosporum* CBPPR0008, foi possível alcançar este valor quando pareado com BAC 5, onde a área do patógeno ficou abaixo de 10 cm<sup>2</sup> (Figura 3.I). O fungo da espécie *F. oxysporum* CBPPR0007, apresentou menor susceptibilidade aos isolados testados, diferentemente das demais espécies onde foi possível observar maior efeito do isolado APC 51, em

CBPPR0007 ele apresentou potencial de inibição de 38%, com área acima de 20 cm<sup>2</sup> (Figura 3.H).

Foi possível observar várias formações aparentes de halo de inibição de crescimento dos patógenos *F. oxysporum* CBPPR0006 e *F. equiseti* CBPPR0031 quando pareados com BAC 3 e *F. lateritium* CBPPR0048 na presença dos isolados 399, BAC 6 e BAC 4. No pareamento com *F. oxysporum* CBPPR0007, foi possível observar um avanço dos isolados BAC 6, PA 05 e 01 C sobre o fungo (Figura 1).

**Figura 1.** Experimento de pareamento *in vitro* com todos isolados causadores de podridão negra e seca pareados com isolados de *Bacillus* spp. ha: halo de inibição; inib: inibição do crescimento micelial.

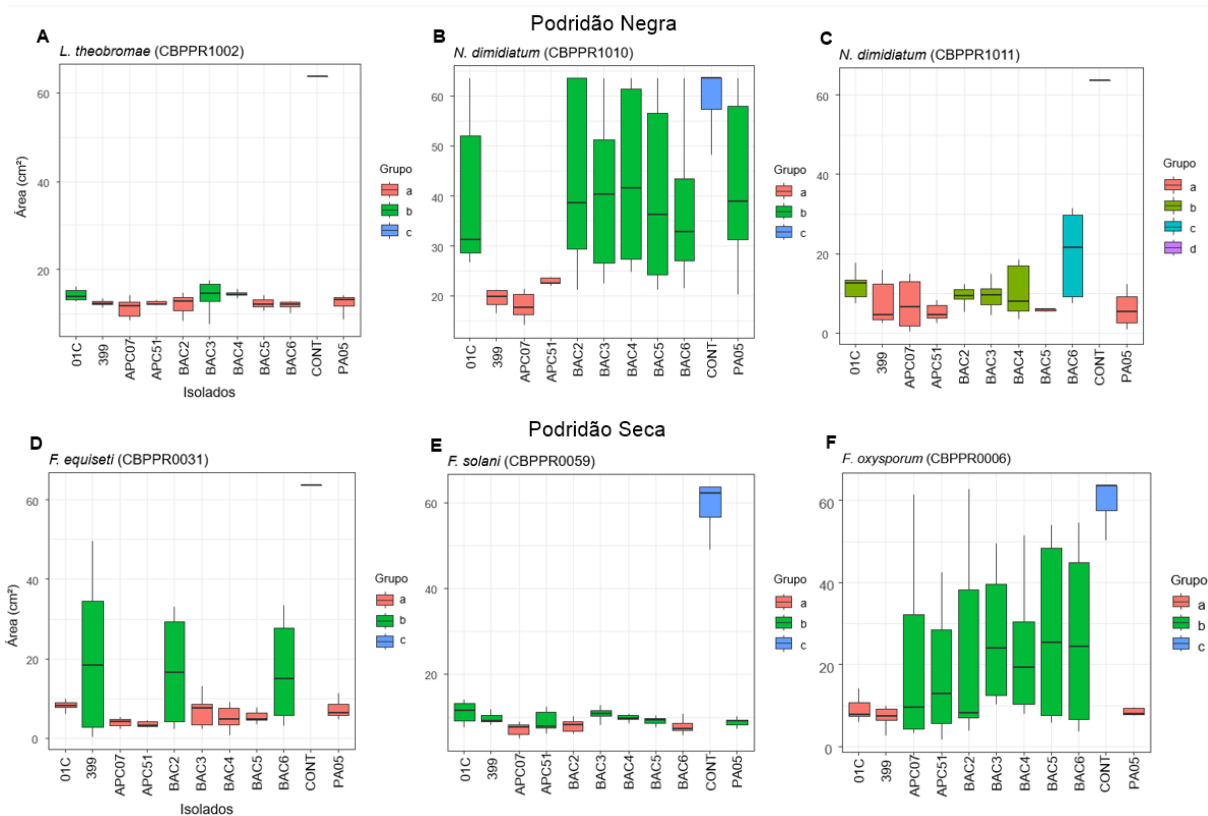


Autora: Izis Mello

Houve formação de três grupos para a maioria das espécies testadas, com exceção apenas para o CBPPR1011, que formou quatro grupos onde todos os isolados testados difeririam do controle ( $p > 0,05$ ) (Figura 2.C). Os isolados de *Bacillus* spp. se comportam de diferentes formas devido a variabilidade de

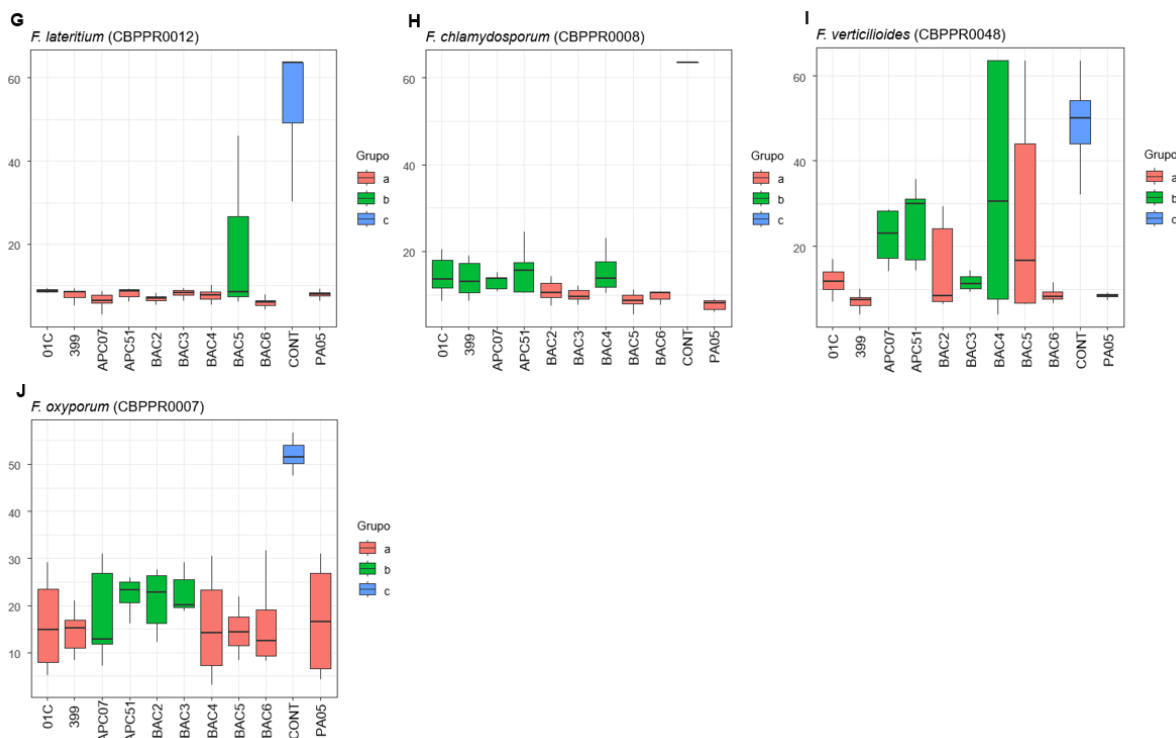
espécies testadas, é importante ressaltar que em planta este comportamento poderá se modificar, mas os isolados se comportam de modo satisfatório quanto sua competição por espaço, reduzindo a área do patógeno (cm<sup>2</sup>) para valores de 3,3 cm<sup>2</sup> em CBPPR0031 com APC 51 (Figura 2.D), 8,4 cm<sup>2</sup> para CBPPR0006 com PA05 (Figura 2.F), 7,2 cm<sup>2</sup> para CBPPR0059 com APC 07 (Figura 2.E), 7,0 cm<sup>2</sup> para CBPPR0048 (Figura 2.G) e 14,6 cm<sup>2</sup> para CBPPR0007 com isolado 399 (Figura 2.J).

**Figura 2.** Boxplot das médias agrupadas de área (cm<sup>2</sup>) de crescimento micelial dos tratamentos *Lasiodiplodia theobromae* (A), *Neoscytalidium dimidiatum* (B), *N. dimidiatum* (C), *Fusarium lateritium* (D), *F. solani* (E), *F. oxysporum* (F), *F. lateritium* (G) *F. chlamydosporum* (H) *F. verticilloides* (I), *F. oxysporum* (J) na presença e ausência de *Bacillus* spp. Isolados pertencentes ao mesmo grupo (cor) não diferem entre si pelo teste *Scott-Knott*.



continuação...

**Figura 2.** Boxplot das médias agrupadas de área (cm<sup>2</sup>) de crescimento micelial dos tratamentos *Lasiodiplodia theobramae* (A), *Neoscytalidium dimidiatum* (B), *N. dimidiatum* (C), *Fusarium lateritium* (D), *F. solani* (E), *F. oxysporum* (F), *F. lateritium* (G) *F. chlamydosporum* (H) *F. verticilioides* (I), *F. oxysporum* (J) na presença e ausência de *Bacillus* spp. Isolados pertencentes ao mesmo grupo (cor) não diferem entre si pelo teste Scott-Knott.



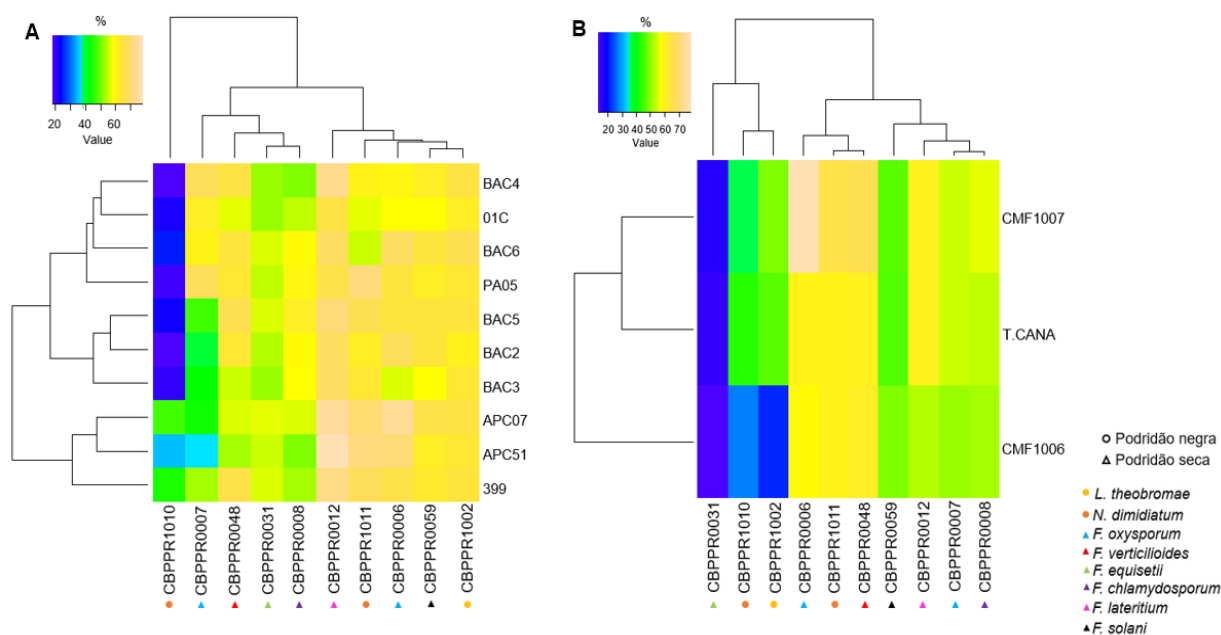
### 3.2. Antagonismo in vitro com isolados de *Trichoderma* spp. a fungos causadores de podridões radiculares da mandioca

Todos os isolados de *Trichoderma* sp. inibiram significativamente o crescimento micelial dos fitopatógenos testados. *Trichoderma asperellum* CMF 1007 foi o isolado que obteve maior destaque no antagonismo *in vitro*, sendo as espécies de *Fusarium* sp. mais sensíveis quando pareado com o antagonista. Para as espécies *F. oxysporum* CBPPR0006 (Figura 5.15), *F. lateritium* CBPPR0048 (Figura 5.23), *F. equiseti* CBPPR0031 (Figura 5.27), *F. verticilioides* CBPPR0008 (Figura 5.35), foi possível observar característica de parasitismo de *T. asperellum* CMF 1007 sob os patógenos

Em *F. lateritium* CBPPR0048, *F. verticilioides* CBPPR0012, *Fusarium chlamydosporum* CBPPR0008, pareados com CMF 1007, apresentaram potencial de inibição do patógeno acima de 50%, alcançando mais de 70% de inibição para

*F. oxysporum* CBPPR0006 e 65% em *F. equiseti* CBPPR0031 (Figura 4). Foi possível observar formação de halo de inibição de *T. asperellum* para *Lasiodiplodia theobroma* CBPPR1002 (Figura 5.11) com efeito significativo de inibição em 51% (Tabela 3).

**Figura 3.** Mapa de calor (*heatmap*), para espécies de *Fusarium* spp. pareados com *Bacillus* spp., *L. theobromae* e *N. dimidiatum* pareadas com isolados de *Bacillus* spp. (A); *Fusarium* spp., *L. theobromae* e *N. dimidiatum* pareados com *Trichoderma* spp. (B) onde tratamentos foram agrupados hierarquicamente.



Para a maioria das espécies pareadas foi possível observar médias entre 50% e 70% de redução do efeito de crescimento micelial, com a exceção da espécie *N. dimidiatum* CBPPR1010 e *L. theobromae* CBPPR1002 que obtiveram 28,11% e 22,11% de potencial de inibição, respectivamente, quando pareados com *T. asperellum* CMF 1006, diferindo entre os demais tratamentos, o mesmo ocorre para *F. solani* CBPPR0059 onde pareado com as três espécies de *Trichoderma* sp., obteve potencial de inibição inferior a 50%, com médias diferindo significativamente do tratamento controle.

Para as espécies de *Neoscytalidium dimidiatum* (CBPPR1010, CBPPR1011), o isolado de *T. harzianum* T.CANA, foi o que obteve maior potencial de inibição de crescimento micelial do patógeno em 43,44% e 58,44% respectivamente, diferindo significativamente das demais médias dos tratamentos Controle, CM 1006 e CMF 1007 para *N. dimidiatum* CBPPR1010. (Tabela 3).



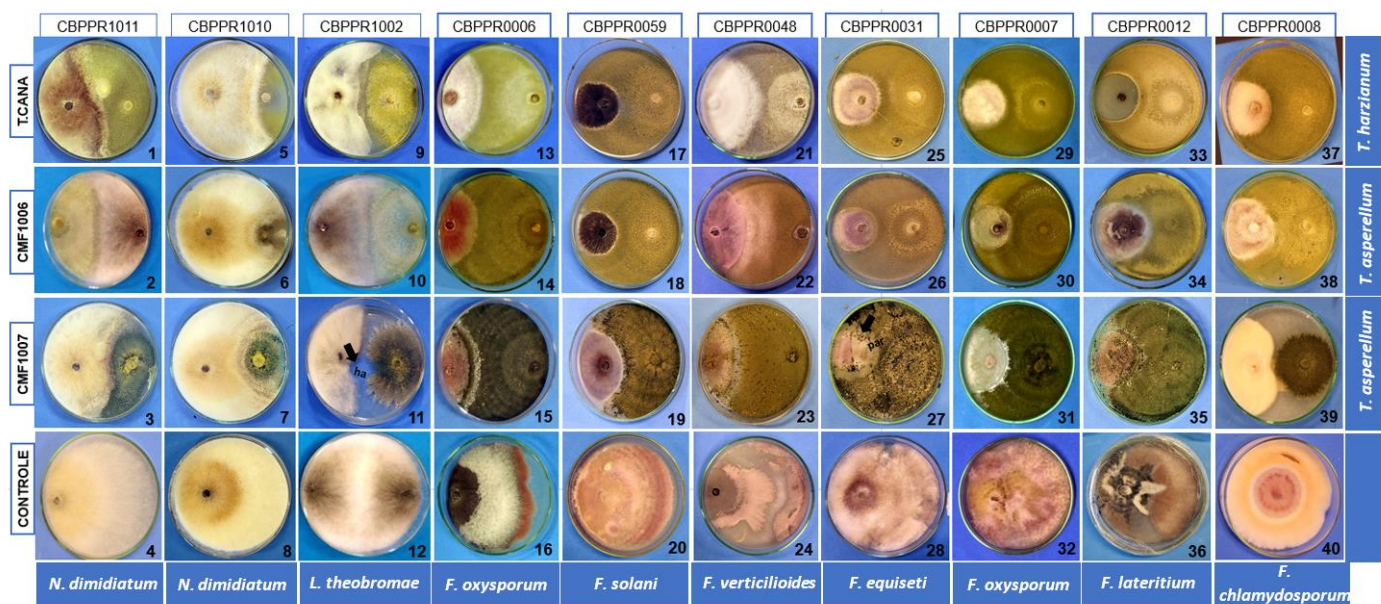
Tabela 3. Inibição de crescimento micelial (%) dos fungos de podridão radicular da mandioca.

| INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO (%) |             |            |          |          |          |
|-----------------------------|-------------|------------|----------|----------|----------|
| Doenças                     | Tratamentos | CMF 1007   | CMF 1006 | T. CANA  | CONTROLE |
| Podridão Negra              | CBPPR1010   | 35,44 b*F  | 19,72 cB | 43,44 aC | 0,00 dB  |
|                             | CBPPR1011   | 44,55 bE** | 30,44 aA | 58,44 aA | 0,00 cB  |
|                             | CBPPR1002   | 51,32 aD   | 22,11 bC | 47,11 aC | 6,35 cA  |
|                             | CBPPR0059   | 46,48 aE   | 48,91 aA | 46,21 aC | 4,44 bA  |
| Podridão Seca               | CBPPR0006   | 78,12 aA   | 58,25 bA | 59,75 bA | 7,65 cA  |
|                             | CBPPR0048   | 66,77 aB   | 61,11 bA | 60,55 bA | 0,00 cB  |
|                             | CBPPR0012   | 60,66 aB   | 56,99 bA | 60,61 aA | 6,22 cA  |
|                             | CBPPR0008   | 56,32 aC   | 51,77 aA | 53,67 aB | 4,65 bA  |
|                             | CBPPR0007   | 54,52 aC   | 50,71 bA | 54,16 aB | 0,90 cB  |
|                             | CBPPR0031   | 65,77 aB   | 58,44 bA | 59,66 bA | 0,00 cB  |

\*Médias seguidas da mesma letra minúscula na linha pertencem ao mesmo grupo pelo teste *Scott-Knott* a 5% de probabilidade.

\*\*Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna pertencem ao mesmo grupo pelo teste *Scott-Knott* a 5% de probabilidade.

**Figura 4.** Experimento de pareamento *in vitro* com isolados de *Trichoderma* spp. pareados com patógenos do gênero *Fusarium* spp., *Lasiodiplodia* spp. e *Neoscytalidium* spp. ha: halo de inibição; par: parasitismo.



Autora: Izis Mello



Todos os pareamentos se diferenciaram entre si significativamente, bem como do tratamento Controle. Entre as espécies apenas os isolados das espécies *F. solani* CBPPR0059 e *F. clamydosporum* CBPPR0008, não diferiram entre si nas espécies de *Trichoderma* spp. pelo teste de agrupamento de médias *Scott-Knott* ( $p < 0,05$ ).

#### 4.0 DISCUSSÃO

O uso de bactérias do gênero *Bacillus* spp. tem sido efetiva no controle de fungos fitopatogênicos de diversas espécies, em experimento *in vitro* vêm se mostrando como excelente antagonista, com ótimas médias de redução de crescimento micelial do fungo *Lasiodiplodia theobromae* e *Fusarium oxysporum*. (SEETHAPATHY et al., 2016; SHOBHA & KUMUDINI, 2012). A capacidade de potencial de inibição de *Bacillus* spp. chega a 212% quando pareados com fungo de podridão radicular da mandioca da espécie *Fusarium solani* (FREITAS et al., 2018)

O halo de inibição formado é um indicativo de que está havendo antibiose, podendo *Bacillus* sp. estar secretando enzimas e lipopeptídeos que geram a formação do halo e auxiliando na redução crescimento do patógeno através de antibiose direta (FIRA et al., 2018; SHOBHA & KUMUDINI, 2012). A redução do crescimento micelial do fitopatógeno também pode estar diretamente ligada à produção de metabólitos tóxicos, onde o microrganismo cria um ambiente desfavorável ao crescimento do patógeno (GABARDO et al., 2020).

Bactérias do gênero *Bacillus*, são comprovadamente produtoras de antibióticos, o que lhes conferem um excelente efeito inibidor ao crescimento de fungos fitopatogênicos. Através da produção de compostos microbianos que são sintetizados por essas bactérias a sua utilização no controle biológico de fitopatógenos se torna uma alternativa eficiente, porém diante da diversidade destes compostos produzidos, se faz necessário a realização de novas pesquisas com a finalidade de determinar quais são esses compostos antimicrobianos produzidos (SILVA et al., 2020; VILLA-RODRIGUEZ et al., 2019).

Estudos da inibição de *F.solani*, com uso de *B.subtilis* comprovaram redução de mais de 60% de severidade da doença na raiz da mandioca, após três semanas de inoculação do patógeno (SAENGCHAN et al., 2022) quando pareados com isolados de *Trichoderma* sp. os valores de inibição chegam acima

de 50%, com 100% de controle através de mecanismos de produção de compostos antimicrobianos mais eficaz contra *F.solani*, sabe-se que esta eficiência só pode ser alcançada na dependência da capacidade do patógeno em metabolizar estes compostos (STEFANELLO, 2016).

Ao aplicar *B. subtilis* no controle de patógenos fúngicos do feijão-caupi, exhibe capacidade de antibiose suficiente devido ao seu bom desempenho na inibição de *F. verticilloides*, *F. equiseti*, *F. solani*, *F. oxysporum* em trabalhos *in vitro* (KILLANE et al., 2011). Para espécie de *F. oxysporum* foi constatado que o fungo é suprimido por organismos biocontroladores do gênero *Trichoderma* e *Bacillus*, sendo seu efeito comprovado a partir produção de sideróforos, efeito antibiótico supressor da produção de antibacteriano de beauvericina por *F. oxysporum* (PALYZOVÁ et al., 2019).

Em isolados de *Trichoderma* spp. a presença de halos de inibição também expressam possível antibiose, este mesmo halo foi observado em pareamento realizado com o fungo *F. oxysporum* por Azevedo et al. (2020). *Trichoderma* spp. também apresenta características de competição e micoparasitismo, tendo em vista que o fungo avança totalmente sobre o fitopatógeno e através da secreção de enzimas conseguem degradar a parede celular do hospedeiro e assim se estabelecem (SILVA et al., 2016; ZHANG et al., 2014).

Em testes de pareamento *in vitro* *Trichoderma* spp. chega a apresentar uma inibição de 100% dos patógenos (AOYAGI & DOI, 2021). A inibição de fitopatógeno por *Trichoderma* spp. podem ser efetivas para algumas espécies e ineficientes para outros, podendo apresentar maior ou menor agressividade de supressão de patógenos, o que irá depender da atividade de defesa que estes exercem, da estrutura física dos mesmos e da produção de substâncias inibitórias (CHAGAS JUNIOR, 2018).

Atividades antagonistas potenciais foram observadas por Srivastava et al. (2014), em espécies de *Trichoderma* contra *Fusarium oxysporum* com inibição máxima de 63,66% de crescimento micelial. Quando pareados com patógenos causadores de podridão negra da mandioca, *Trichoderma* spp. apresentou um potencial de inibição de 80,78%, estes resultados estão diretamente ligados a possível produção de quitinase e compostos voláteis pelo fungo antagonista, através da produção de enzimas o fungo antagonista degrada a parede celular do patógeno e através de suas hifas que tem capacidade de reconhecer outra hifa

inicia-se o processo de parasitismo (AZEVEDO et al., 2020; SILVA et al. 2017; ZHANG et al., 2014).

Em estudos realizados na cultura da pitaya *N. dimidiatum* foi suprimido por antagonistas *Bacillus* sp e *Trichoderma* sp, com maior taxa de inibição para o fungo, atingindo mais de 60% de resistência quando pareados com os dois isolados de patógeno testados. (NGUYEN et al., 2019). Em *Bacillus* sp. houve efeito de potencial antagônico inferior aos encontrados nos pareamentos com *N. dimidiatum* CBPPR1010 e CBPPR1011, com percentual de 36,67% de efeito de inibição (DUNG et al., 2018).

A espécies de *T. asperellum* e *T. harzianum* apresentaram um alto potencial de inibição contra o fungo *Lasiodyplodia theobromae*, isso se deu devido a presença de diferentes compostos micotóxicos voláteis e não voláteis (BEDINE et al., 2022; BUI et al., 2018).

Os fungos de *Trichoderma* sp., assim como *Bacillus* sp. podem apresentar diferentes formas de antagonismo. Cada microrganismo tem sua forma específica de manifestar inibição do fitopatógeno, este conhecimento é bastante amplo e já se discute sobre a importância de saber quais mecanismos são utilizados pelo antagonista, sendo este decisivo para garantia de inibição da doença e conseqüentemente para o desenvolvimento de produto direcionado ao controle biológico (CHAGAS JUNIOR et al., 2018; VILLARREAL-DELGADO et al., 2017).

A variação de inibição da doença *in vitro*, é natural, podem acontecer em vários graus e com respostas diferentes para cada espécie. *T. harzianum* causou maior inibição de crescimento, quando comparado com isolados bacterianos (SINGH et al., 2021), o que não ocorreu para os pareamentos realizados com as espécies relacionadas a podridão radicular da mandioca, onde foi possível observar maior efeito de isolados de *Bacillus* sp. É importante ressaltar que a alta atividade antimicrobiana *in vitro*, contudo, é importante ressaltar que são necessárias validações *in vivo*, tendo em vista que este controle pode se apresentar reduzido ou zero controle da doença na planta, o que salienta, ainda mais, a importância de realizar estudos *in vitro* e *in vivo* (SILVA et al., 2017).

É de suma importância o desenvolvimento de banco de dados que disponibilizem os microrganismos de potencial biocontrole para outras pesquisas e testes, o que pode vir a gerar uma gama de produtos, que podem vir a beneficiar a comunidade e produtores que enfrentam dificuldades de manejo no

seu dia a dia (DINIZ et al., 2022). Todos estes trabalhos desempenham uma importante função para a aplicação destes agentes biológicos na planta. Sendo, portanto, a avaliação comportamental dos microrganismos *in vitro* um método importante e necessário para avaliar seu potencial de biocontrole muito antes da liberação na rizosfera.

## 5.0 CONCLUSÕES

Os isolados de *Bacillus* sp. e *Trichoderma* spp. exercem eficiência tanto no controle de crescimento micelial de isolados de podridão negra, como no de podridão seca.

Com destaque para os isolados de *Bacillus* spp. APC 51 e APC 07, que obtiveram mais de 70% de potencial de inibição e *T. asperellum* CMF1007 que apresentou uma média de maior controle efetivo na maioria das espécies de patógenos testadas.

Com base nestes resultados, é importante frisar a importância da caracterização de todos os isolados testados, bem como a viabilidade de utilizá-los de forma integrada, conferindo assim uma maior resistência ao complexo da podridão radicular da mandioca.

## 6.0 REFERÊNCIAS

AOYAGI, L. N.; DOI, S. M. O. Avaliação da Atividade Antagonista de *Trichoderma harzianum* sobre *Fusarium oxysporum* e *Botrytis cinérea*. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v. 4, n. 3, p. 3234–3239, 2021.

AZEVEDO, D. M. Q. et al. Antagonistic effect of *Trichoderma* isolates and its metabolites against *Fusarium solani* and *F. oxysporum* in chickpea. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 6, p. 36344-36361, 2020.

BEDINE, M. A. B. et al. Identification of native soil-derived *Trichoderma* spp. isolates and analysis of their antagonist traits against *Lasiodiplodia theobromae* causing stem-end rot in papaya. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v. 55, n. 15, p. 1766-1794, 2022.

BELLÉ, R. & FONTANA, D. C. Patógenos de solo: principais doenças vasculares e radiculares e formas de controle. **Enciclopédia biosfera**, v.15, n.28, p.779-803 2018.

BORRIS, R. Use of plant-associated *Bacillus* strains as biofertilizers and biocontrol agents in agriculture. **Bacteria in agrobiolology: Plant growth responses**. p.41-76, 2011.

BRITO, D. et al. Inibição *in vitro* de patógenos causadores de podridão radicular da mandioca por isolados de *Trichoderma* spp. In: **JORNADA CIENTÍFICA EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA, 12., 2018. Ciência profissional: resumos**. Cruz das Almas, BA: EMBRAPA Mandioca e Fruticultura, 2019. Disponível em: <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/1116050/1/Inibicaoinvitrodepatogenoscausadoresdepodridaoradiculardamandiocapor.pdf>>. Acesso em: 13 de fev. 2020.

BODAH, E. T. Root rot diseases in plants: a review of common causal agents and management strategies. **Agri Res & Tech: Open Access J**, v. 5, n. 3, p. 555661, 2017.

BUI, R. et al. In vitro studies on efficacy of some plant extracts and biocontrol agents against *Lasiodiplodia theobromae* and *Lasiodiplodia pseudotheobromae*. **International Journal of Current Microbiology Applied Science**, v. 7, n. 7, p. 448-457, 2018.

CHAGAS JUNIOR, A. F. L. et al. Ação de *Trichoderma* spp. no controle de *Fusarium* sp., *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii*. **AGRI-ENVIRONMENTAL SCIENCES**, v. 4, n. 2, p. 9-15, 2018.

CORREIA, K. C.; MICHEREFF, S. J. Fundamentos e desafios do manejo de doenças radiculares causadas por fungos. In: **Desafios do manejo de doenças radiculares causadas por fungos**. 1ed. Recife, Brazil: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2018. p. 1-17

CORREIA, K. C. et al. Manejo integrado de doenças do sistema radicular: bases científicas, estratégias e práticas. **Sanidade de raízes**, v. 1, p. 191-234, 2014.

DINIZ, G. F. D. et al. Microrganismos do estigma do milho com potencial de biocontrole de *Fusarium verticillioides*. **Brazilian Journal of Biology**, v. 82, 2022.

DUNG, D. T. T. et al. Khả năng đối kháng của vi khuẩn *Bacillus* sp. với vi nấm *Neoscytalidium dimidiatum* gây bệnh đốm trắng trên thanh long. **Tạp chí Khoa học**, v. 15, n. 12, p. 32, 2018.

FIRA, D. et al. Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. **Journal of biotechnology**, v. 285, p. 44-55, 2018.

FREITAS, M. A. et al. Stem inoculation with bacterial strains *Bacillus amyloliquefaciens* (GB03) and *Microbacterium imperiale* (MAIIF2a) mitigates *Fusarium* root rot in cassava. **Phytoparasitica**, v. 47, n. 1, p. 135–142, 2018.

FONSÊCA NETO, J. et al. Efeito de adubo verde e *Trichoderma harzianum* na sobrevivência de *Fusarium solani* e no desenvolvimento do meloeiro. **Revista Brasileira de Agroambiente**, v. 10, n. 1, p. 44–49, 2016.

GABARDO, G. et al. *Trichoderma asperellum* e *Bacillus subtilis* como antagonistas no crescimento de fungos fitopatogênicos *in vitro*. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 8, p. 55870-55885, 2020.

HOHENFELD, C. et al. Resistência de variedades comerciais de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) a diferentes isolados de *Fusarium* sp., em ambiente controlado. In: **15º CONGRESSO BRASILEIRO DE MANDIOCA 15.**, Salvador – BA, 2013.

HOHENFELD, C. S. et al. Methodologies for selecting cassava with resistance to dry and black root rot under controlled conditions. **Bragantia**, v. 77, n. 3, p. 440–451, 2 ago. 2018.

KILLANI, A. S. et al. Antagonistic effect of indigenous *Bacillus subtilis* on root-/soil-borne fungal pathogens of cowpea. **Researcher**, v. 3, n. 3, p. 11-18, 2011.

LOPES, U. P., & MICHEREFF, S. J. **Desafios do manejo de doenças radiculares causadas por fungos**. 1ed. Recife: Editora Universitária da Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, v. 11, p. 208, 2018.

MILJAKOVIĆ, D. et al. The significance of *Bacillus* spp. in disease suppression and growth promotion of field and vegetable crops. **Microorganisms**, v. 8, n. 7, p. 1037, 2020.

NGUYEN, N. N. et al. Isolate *Neoscytalidium dimidiatum* fungal pathogens from pytaya (*Hylocereus undatus*) and research controlling by microorganisms. **VNUHCM Journal of Natural Sciences**, v. 3, n. 4, p. 286–293, 2019.

PALYZOVÁ, A. et al. Metabolic profiling of *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* race 2 in dual cultures with biocontrol agents *Bacillus amyloliquefaciens*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Trichoderma harzianum*. **Folia Microbiologica**, v. 64, n. 6, p. 779–787, 2019.

SAENGCHAN, C. et al. Induced resistance against *Fusarium solani* root rot disease in cassava plant (*Manihot esculenta* Crantz) promoted by salicylic acid and *Bacillus subtilis*. **Acta Agriculturae Scandinavica, Section B — Soil & Plant Science**, v. 72, n. 1, p. 516–526, 2022.

SEETHAPATHY, P. et al. Bacterial antagonists and hexanal-induced systemic resistance of mango fruits against *Lasiodiplodia theobromae* causing stem-end rot. **Journal of Plant Interactions**, v. 11, n. 1, p. 158-166, 2016.

SINGH, S. et al. Biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*, *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas fluorescens* against *Meloidogyne incognita*, *Fusarium oxysporum* and *Rhizoctonia solani*. **Indian Phytopathology**, v. 74, n. 3, p.703-714, 2021.

SHOBHA, G.; KUMUDINI, B. S. Antagonistic effect of the newly isolated PGPR *Bacillus* spp. on *Fusarium oxysporum*. **International Journal Applied Science Engineering Research**, v. 1, n. 3, p. 463-474, 2012.

DA SILVA, J. A. T. et al. *Trichoderma aureoviride* URM 5158 and *Trichoderma hamatum* URM 6656 are biocontrol agents that act against cassava root rot through different mechanisms. **Journal of Phytopathology**, v. 164, n. 11-12, p. 1003-1011, 2016.

SILVA, J. A. T. et al. Antagonistic activity of *Trichoderma* spp. against *Scytalidium lignicola* CMM 1098 and antioxidant enzymatic activity in cassava. **Phytoparasitica**, v.45, n.2, p.219-225, 2017.

SILVA, M. C. T. S. et al. Efeitos antagônicos de bactérias do gênero *Bacillus* no controle biológico de fungos fitopatogênicos. **Seminário de Biocontrole, IPA/UFRPE**, 2020.

SRIVASTAVA, M. et al. In vitro growth performance of *Trichoderma* species and antagonistic activity against soil borne pathogens. **International Journal of Science and Research**, v. 3, n. 7, p. 672–675, 2014.

STEFANELLO, L. et al. **Produtividade e controle de podridão radicular na cultura da mandioca (*Manihot esculenta*) com o uso de *Trichoderma* spp.** Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Marechal Cândido Rondon – Paraná, Brasil, 2016. Dissertação (Mestrado em Agronomia) Disponível em: <<https://tede.unioeste.br/handle/tede/1330>>. Acesso em: 16 mai. 2021.

VILAS BOAS, S. A. V. et al. Survey of fungi associated with cassava root rot from different producing regions in Brazil. **Scientia Agricola**, v. 74, p. 60–67, 2017.

VILAS BOAS, S. A. et al. Survey of fungi associated with cassava root rot from different producing regions in Brazil. **Scientia Agricola**, v. 74, p. 60–67, 2017.

VILLARREAL-DELGADO, M. F. et al. El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. **Revista Mexicana de Fitopatología**, v. 36, n. 1, p. 95–130, 2018.

VILLA-RODRIGUEZ, E. et al. *Bacillus subtilis* TE3: a promising biological control agent against *Bipolaris sorokiniana*, the causal agent of spot blotch in wheat (*Triticum turgidum* L. subsp. durum). **Biological control**, v. 132, p. 135-143, 2019.

ZHANG, F. et al. *Fusarium oxysporum* induces the production of proteins and volatile organic compounds by *Trichoderma harzianum* T-E5. **FEMS Microbiology Letters**, v. 359, n. 1, p. 116–123, 2014.

## Capítulo 2

### Potencial de agentes de biocontrole na supressão *in planta* das podridões negra e seca da mandioca

A complexidade dos patógenos de podridão radicular da mandioca exigem formas de manejo mais específicos para a contenção do patógeno, desta forma o controle biológico por meio de fungos e bactérias antagonistas possui um grande potencial de sucesso no manejo dessas doenças. Com isso o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de agentes de biocontrole *in planta* na supressão das doenças podridão negra e seca da mandioca. Os experimentos foram realizados em ambiente controlado, sendo um inoculado com patógenos associados a podridão negra e outro associados a podridão seca, utilizando duas variedades de mandioca 'BRS Kiriris' e 'BRS Formosa' e oito tratamentos que foram inoculados com isolados das espécies *Bacillus* spp. e *Trichoderma* spp., para isso os isolados de *Bacillus* sp., foram separados em mix de isolados: Mix 1 (399, APC 51, PA 05, APC 07), Mix 2 (BAC 5 e BAC 6), Mix 3 (BAC 3 e BAC 4) e *Trichoderma* spp. foi inoculado um isolado (CMF1007). As manivas utilizadas foram semeadas na vertical em substrato vermiculita umedecido previamente e inoculados com patógeno 7 dias antes do plantio. A aplicação de inóculo de *Trichoderma* foi realizada após período de 15 DAP, o delineamento do experimento foi realizado em blocos casualizados - DBC e esquema fatorial 2 x 2 (variedade x inoculação) com um total de vinte repetições. Os inóculos dos patógenos e agentes de biocontrole foram preparados no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Mandioca e Fruticultura e as suspensões foram inoculadas após ajustes de concentração de  $10^5$  para patógenos,  $10^7$  para *Trichoderma* e  $10^8$  para isolados de *Bacillus*. O experimento foi avaliado aos 30 dias após o plantio - DAP e foram realizadas avaliações dos parâmetros de crescimento e incidência de doença. Os dados coletados foram submetidos a ANOVA e as médias obtidas agrupadas em teste Scott-Knott ( $p < 0,05$ ) através do software estatístico R 4.2.0. Foi realizado experimento em casa de vegetação, utilizando as cultivares 'BRS Novo horizonte' e 'BRS Poti Branca', os tratamentos consistiram em imersão de manivas, nos mixes de *Bacillus* spp., *Trichoderma* spp. e Fungicida. Para preparo das suspensões com microrganismos foi repetido o mesmo ao primeiro experimento e o produto fungicida foi diluído em água. O delineamento foi realizado em DBC e subdivididos em esquema fatorial 2 x 2 (variedade x tratamento imersão), com 6 repetições por tratamento. Foi realizado plantio de duas manivas por vaso/8L contendo solo e substrato específico. Após o plantio foi realizada as avaliações de crescimento periódicas 30 DAP e aos 60 DAP onde foi feita destrutiva e posterior análise dos dados. O uso de *Bacillus* spp. consorciado com *Trichoderma* spp. constituiu em tratamento eficiente para redução de danos da doença da podridão negra e seca da mandioca. O tratamento de imersão de manivas foi eficiente para contenção do avanço da doença da podridão radicular.

Palavras-chave: Manejo biológico; Fitopatógenos; Bactérias; Fungos



### **Potential of biocontrol agents in *plant* suppression of cassava black and dry rot**

The complexity of cassava root rot pathogens requires more specific management methods to contain the pathogen, thus biological control using antagonistic fungi and bacteria has great potential for success in the management of these diseases. Thus, the objective of this work was to evaluate the potential of in plant biocontrol agents in the suppression of cassava black and dry rot diseases. The experiments were carried out in a controlled environment, one inoculated with pathogens associated with black rot and the other associated with dry rot, using two varieties of cassava 'BRS Kiriris' and 'BRS Formosa' and eight treatments that were inoculated with isolates of *Bacillus* spp. and *Trichoderma* spp., for this the *Bacillus* spp. isolates were separated into a mix of isolates: Mix 1 (399, APC 51, PA 05, APC 07), Mix 2 (BAC 5 and BAC 6), Mix 3 (BAC 3 and BAC 4) and *Trichoderma* spp. one isolate (CMF1007) was inoculated. The cuttings used were sown vertically in previously moistened vermiculite substrate and inoculated with the pathogen 7 days before planting. The application of *Trichoderma* inoculum was carried out after a period of 15 DAP, the experiment design was carried out in randomized blocks - DBC and a 2 x 2 factorial scheme (variety x inoculation) with a total of twenty repetitions. Inoculums of pathogens and biocontrol agents were prepared at the Phytopathology Laboratory of Embrapa Mandioca e Fruticultura and the suspensions were inoculated after concentration adjustments of  $10^5$  for pathogens,  $10^7$  for *Trichoderma* and  $10^8$  for *Bacillus* isolates. The experiment was evaluated 30 days after planting - DAP and evaluations of growth parameters and disease incidence were performed. The collected data were submitted to ANOVA and the means obtained were grouped in the Scott-Knott test ( $p < 0.05$ ) using the statistical software R 4.2.0. An experiment was carried out in a greenhouse, using the 'BRS Novo Horizonte' and 'BRS Poti Branca' cultivars, the treatments consisted of immersion of cuttings, in mixes of *Bacillus* spp., *Trichoderma* spp. and Fungicide. To prepare the suspensions with microorganisms, the same procedure as the first experiment was repeated and the fungicide product was diluted in water. The design was carried out in DBC and subdivided in a 2 x 2 factorial scheme (variety x immersion treatment), with 6 replications per treatment. Two cuttings were planted per pot/8L containing soil and specific substrate. After planting, periodic growth evaluations were carried out at 30 DAP and at 60 DAP where a destructive and subsequent analysis of the data was carried out. The use of *Bacillus* spp. intercropped with *Trichoderma* spp. constituted an efficient treatment to reduce the damage caused by cassava black and dry rot disease. The immersion treatment of cuttings was efficient to contain the progress of the root rot disease.

## 1.0 INTRODUÇÃO

A mandioca é uma cultura de principal importância agrônômica em diversas regiões do Brasil e do mundo, principalmente no Continente Africano onde é considerada uma cultura de segurança alimentar (PARMAR; STURM; HENSEL, 2017), sendo utilizada como uma fonte alimentar valiosa para países em desenvolvimento (BAYATA, 2019).

Esta segurança alimentar pode estar comprometida devido ao aumento da população mundial e ao número crescente de patógenos (AB RAHMAN et al., 2018), assim como a cultura está espalhada por uma grande extensão territorial, as podridões radiculares se apresentam como principal doença da cultura e através de seus agentes etiológicos causam danos irreversíveis a planta (BRITO et al., 2019).

A falta de conhecimento do manejo de doenças e práticas culturais adequadas para mandioca por parte de produtores e o uso de material genético de baixo potencial acaba facilitando a multiplicação e estabelecimento do patógeno. O emprego de um manejo integrado é imprescindível para a contenção da doença no campo, abrindo um leque para uma série de sistemas empregados nas práticas de controle de fitopatógenos, seja através de mecanismos químicos, físicos ou biológicos (BELLÉ & FONTANA, 2018; LEITE & GONÇALVES, 2018; MATTOS; FARIAS; FERREIRA FILHO, 2006).

É possível constatar o crescimento e a amplitude que o uso de microrganismos com potencial de controle biológico trouxera opções que surgem como alternativas promissoras para auxiliar as culturas no combate aos patógenos. É importante entender o papel desses microrganismos na promoção do crescimento e no controle de doenças, e sua aplicação como biofertilizantes e biopesticidas cujo sucesso no campo ainda demanda um certo cuidado (AB RAHMAN et al., 2018).

A avaliação e interpretação das funcionalidades desses organismos biologicamente importantes em um determinado ambiente é o primeiro passo para entender sua natureza e modo de ação para controlar os patógenos naquele

ambiente. Dada à complexidade das condições de campo, os estudos em ambientes controlados são necessários para entender e caracterizar completamente o modo de ação desses agentes de controle biológico (SHAFI; TIAN; JI, 2017). Por tanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de agentes de biocontrole na supressão *in planta* das doenças podridão negra e seca da mandioca.

## 2.0 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Testes *in planta* - Podridão negra e seca da mandioca

#### 2.1.1. Local de desenvolvimento

Os experimentos foram realizados na Embrapa Mandioca e Fruticultura – Cruz das Almas - Bahia, montado em ambiente controlado, com temperatura de 28°C e fotoperíodo de 12 horas em delineamento de blocos casualizados - DBC, com quatro blocos em esquema fatorial (variedade x tratamento biológico) contendo oito tratamentos, cada um com 20 repetições. As variedades utilizadas foram as ‘BRS Kiriris’ e ‘BRS Formosa’, variedades contrastantes quanto a sua resistência a podridão radicular da mandioca, os tratamentos foram inoculados com isolados das espécies *Bacillus* spp. e *T. asperellum*, para isso os isolados de *Bacillus* spp., foram separados em mix de isolados.

Tabela 1. Tratamentos do experimento *in planta* da podridão negra e seca da mandioca.

| NOMENCLATURA | TRATAMENTOS  |
|--------------|--|
| T1C          | 1. Controle  |
| T2T          | 2. <i>Trichoderma asperellum</i>                               |
| T3B1         | 3. Mix 1 de <i>Bacillus</i> spp. (399, APC 51, PA 05 e APC 07) |
| T4B2         | 4. Mix 2 de <i>Bacillus</i> spp. (BAC 5 e BAC 6)               |
| T5B3         | 5. Mix 3 de <i>Bacillus</i> spp. (BAC 3 e BAC 4)               |
| T6TB1        | 6. <i>T. asperellum</i> + Mix 1                                |
| T7TB2        | 7. <i>T. asperellum</i> + Mix 2                                |
| T8TB3        | 8. <i>T. asperellum</i> + Mix 3                                |

Para os tratamentos de mix de *Bacillus* + *Trichoderma*, a aplicação de inóculo de *T. asperellum* foi realizada após período de 15 dias devido a compatibilidade de espécies.

Foram realizados dois experimentos, em um foi realizado inóculo de patógenos relacionados a doença da podridão radicular negra e o outro inoculado com patógenos da podridão radicular seca, ambos realizados ao mesmo tempo.

### 2.1.2. Preparo do inóculo

O isolados fúngicos foram crescidos em placas de Petri, contendo meio de cultivo BDA (Batata, Dextrose e Ágar), acondicionadas em câmara B.O.D a temperatura de  $25\pm 2$  °C e fotoperíodo de 12 h, para crescimento fúngico, sendo eles de podridão negra (*Lasiodiplodia theobromae* (CBPPR1002) e *Neoscytalidium dimidiatum* (CBPPR1010 e CBPPR1011) e podridão seca *Fusarium oxysporum* (CBPPR0006 e CBPPR0007), *F. equiseti* (CBPPR0031), *Fusarium verticillioides* (CBPPR0048), *Fusarium solani* (CBPPR0059), *Fusarium lateritium* (CBPPR0012) e *Fusarium chlamydosporum* (CBPPR0008), proveniente da micoteca do Laboratório de fitopatologia da Embrapa Mandioca e Fruticultura.

Após o crescimento do fungo na placa, realizou-se suspensões de esporos a partir da adição de 20 mL de água destilada estéril no meio de cultivo com colônias das espécies de patógenos, para liberação de conídios utilizou-se escova de dente macia, e a suspensão foi obtida pela filtração em dupla camada de gaze. Em seguida foi transferido 40 mL da solução em suspensão para sacos individualizados para cada uma das espécies de patógeno, contendo cerca de 200 g de arroz estéril, os sacos foram identificados, amarrados e colocados para crescimento em câmara de crescimento B.O.D. a  $25\pm 2$ °C e fotoperíodo de 12 h.

Para quantificação das unidades formadoras de colônias (UFC) dos isolados patogênicos e de *Trichoderma* spp., utilizou-se a técnica de diluição em série. Após período de 15 dias, constatando crescimento fúngico das espécies, foram retiradas amostras de 10 g de arroz de cada saco e adicionados a 90 mL de água destilada estéril em tubo de ensaio para determinação de unidades formadoras de colônia (UFC), por meio de diluição seriada e plaqueamento, onde as placas foram colocada em BOD a 25°C e após 48 h foi realizada a contagem das unidades formadoras de colônia, para ajuste da concentração a ser colocada no substrato, sendo ela  $10^5$ /g de substrato. Posteriormente as amostras foram misturadas e homogeneizadas, obtendo assim a fonte de inóculo. O mesmo

processo foi realizado para multiplicação dos isolados de *Trichoderma* sp., sendo a concentração do inóculo utilizada  $10^7$  mL

Para crescimento dos isolados de *Bacillus* sp. foi utilizado meio nutriente líquido (Peptona; NaCl; Extrato de Levedura; Extrato de Carne). Os isolados foram repicados em placas de Petri, contendo meio nutriente ágar e após 24 horas foram transferidos com auxílio de alça de Drigalski para erlenmeyers contendo o meio de cultura, em seguida foram vedados e colocados em mesa agitadora em 120 rpm e temperatura de 25 °C por 24 horas. Após o período, o inóculo foi ajustado a concentração de unidade formadora de colônia para uma absorbância de 0,8 (OD<sub>600</sub>) em espectrofotômetro e em seguida preparados os mixes.

### **2.1.3. Material propagativo, substrato e inóculo**

O material de propagação (manivas) do experimento foi retirado do Banco Ativo de Germoplasma de Mandioca (BAG Mandioca) da Embrapa Mandioca e Fruticultura, as manivas foram cortadas com tamanhos de 8 cm e foi realizada desinfestação com a solução de princípio ativo Cloreto Benzalcônio (0,5 mL/L de água) emergindo por 3 minutos, lavadas em água corrente e colocadas para secar por 12 h.

Foram utilizados copos descartáveis de polipropileno de 300 mL composto por substrato vermiculita, umedecido com 30 mL de água destilada. Após 48 horas o substrato foi infestado com 3 g de inóculo  $10^5$  UFC/grama de substrato sendo a fonte de inóculo revolvida dentro do copo com auxílio de espátula. Em seguida os copos foram tampados com copos plásticos de 400 mL, com objetivo de criar uma câmara úmida e deixados em repouso por 48 horas, após este período, foi realizada inoculação dos tratamentos na cova de plantio.

Todos os tratamentos de *Bacillus* sp. e *Trichoderma* sp. foram inoculados na quantidade de 3 mL de solução em suspensão para cada tratamento/repetição, com auxílio de uma pipeta (10 mL). Feito isso, as manivas foram plantadas, na posição vertical, sendo coberta parcialmente e foram mantidas em câmara de crescimento durante um período de 30 dias, onde foi realizada avaliações a fim de comparar a eficiência dos tratamentos.

As variáveis analisadas foram: Germinação (GERM), com oito e quinze dias após plantio; Altura de planta em cm (AP); Peso fresco da parte aérea

(PFPA); Peso fresco da raiz (PFR); Peso seco parte aérea (PSPA); Peso seco da raiz (PSR), sendo estas amostras vegetais submetidas a secagem em estufa a 50 °C por 72 horas e observado após o período o peso constante em miligrama. As demais variáveis avaliadas a seguir foram analisadas seguindo os seguintes parâmetros: Vigor, sendo:

- 1 = Planta pouco vigorosa;
- 2 = Planta com vigor intermediário;
- 3 = Planta com ótimo vigor;

Incidência Externa avaliado qualitativamente através de P = Presença do patógeno e A = Ausência do patógeno e Colonização Interna das Manivas (CIM) baseadas em escala de notas:

- Onde, 0 = Não colonizadas;
- 1 = Colonização  $< 1/3$  da área interna da maniva;
- 2 = colonização  $\geq 1/3$  e  $< 2/3$  da área da maniva;
- 3 =  $\geq 2/3$  da área interna da maniva.

## **2.2 Testes *in planta*: Controle biológico do complexo podridão radicular**

O experimento foi realizado em casa de vegetação da Embrapa - Mandioca e Fruticultura, em delineamento em blocos casualizados - DBC, com quatro blocos em esquema fatorial (variedade x tratamento biológico x controle absoluto x controle químico), contendo onze tratamentos e seis repetições cada. As variedades utilizadas foram BRS Poti Branca e BRS Novo Horizonte, variedades contrastantes em relação a sua resistência a doença da podridão radicular, as manivas utilizadas foram coletadas no BAG Mandioca, já em área infestada com patógenos de podridão radicular. Os isolados utilizados como controle biológico foram os mesmos mix de *Bacillus* sp. em combinação dos. Mix 1, Mix 2 e Mix 3 com *Trichoderma asperellum* (CMF 1007).

Tabela 2. Tratamentos do experimento do complexo podridão radicular.

| NOMENCLATURA | TRATAMENTOS                    |
|--------------|--------------------------------|
| T1C          | 1. Controle                    |
| T2CA         | 2. Controle Absoluto*          |
| T3F          | 3. Fungicida                   |
| T4FA         | 4. Fungicida Absoluto*         |
| T5T          | 5. <i>Trichoderma</i>          |
| T6B1         | 6. Mix 1 de <i>Bacillus</i>    |
| T7B2         | 7. Mix 2 de <i>Bacillus</i>    |
| T8B3         | 8. Mix 3 de <i>Bacillus</i>    |
| T9TB1        | 9. <i>Trichoderma</i> + Mix 1  |
| T10TB2       | 10. <i>Trichoderma</i> + Mix 2 |
| T11TB3       | 11. <i>Trichoderma</i> + Mix 3 |

\*Tratamentos Controle Absoluto e Fungicida absoluto: Sem infestação do patógeno

### 2.2.1. Preparo de inóculo

O preparo do inóculo de *Trichoderma* spp. seguiu mesmo procedimento realizado no experimento de podridões negra e seca, para inoculação em casa de vegetação. Para tratamento com fungicida a formulação foi diluída em água com aferição do pH 6,7, utilizado 300 µL/L do ingrediente ativo Flutriafol. As manivas foram tratadas durante um período de imersão de três minutos. Após o tratamento as manivas foram transferidas para sacos de ráfia. Passado 12 horas foi realizado o plantio seguindo o delineamento em blocos casualizados.

Para os tratamentos em solução suspensão de *Trichoderma asperellum* e *Bacillus* sp. foi adicionado 2% de goma xantana em cada tratamento, em seguida as manivas foram imersas durante 3 minutos. Para o controle imergido em água pura e após o tempo estabelecido, foram deixadas para secar o excesso e em seguida realizou-se o plantio.



### **2.2.2. Avaliação *in planta* em condições de casa de vegetação**

No plantio do experimento foi utilizado substrato coletado em solo de barranco da Embrapa Mandioca e Fruticultura, sendo este peneirado e misturado com fibra de coco e vermiculita na proporção 2:1:1, a adubação foi realizada utilizando as recomendações de Souza e Fialho (2003), sendo este substrato acondicionado em vasos de 8 L. Para os tratamentos com aplicação de *Trichoderma* + *Bacillus*, o inóculo foi aplicado 15 dias após o plantio, com auxílio de micropipeta, aplicando-se 15 mL por planta e bem próximo ao sistema radicular.

Foi realizado plantio de duas manivas por vaso, as duas em posição diagonal e elas foram cobertas com solo superficialmente. Após o plantio foi realizada avaliação de germinação aos 7 e 15 dias, aos 30 dias foi realizada avaliação parcial das variáveis: Altura de planta (AP); Diâmetro do caule (DC).

Foram realizadas avaliações periódicas de severidade da doença a partir do momento em que houve a primeira aparição de sintomas da doença nas plantas, sendo estas avaliações dadas em escala de notas (0 a 4) onde: 0 = sem sintomas, 1 = amarelecimento e murcha do terço inferior, 2 = amarelecimento e murcha do terço inferior médio, 3 = amarelecimento e murcha de toda planta, 4 = morte da planta. Os dados obtidos foram convertidos em índice de doença ( $\omega$ ), de acordo com Czermaink (1999).

Aos 60 dias foi realizada a destrutiva do experimento, onde foram avaliadas as variáveis: Altura de planta em "cm" (AP); Diâmetro do caule em "mm" (DC); Vigor (VI); Número de hastes (NH); Incidência externa (IEX); Incidência interna (II); Colonização interna (CI); Peso fresco da parte aérea (PFPA); Peso fresco da raiz (PFR); Peso seco da parte aérea (PSPA) e Peso seco da raiz (PSR), todas as análises seguindo os mesmos parâmetros de avaliação do experimento de podridões negra e seca.

### **2.2.3. Clarificação de raízes**

Foi coletada uma porção da raiz para realização de clarificação para detecção de colonização do fungo nos tecidos radiculares, as raízes foram colocadas em álcool 70% e transferidas para solução Peróxido de Hidrogênio à 10% (KOH), onde foram mantidas por durante 24 horas, após o período as

mesmas foram lavadas com água destilada e transferidas para Ácido Clorídrico 5% (HCl), onde permaneceram por cinco minutos, sendo transferidas logo após para corante Azul de tripan 0,4%, onde permaneceram por 15 minutos e transferidas para Lactoglicerol para conservação das mesmas e observação de presença de estruturas fúngicas em microscópio.

### 2.3 Avaliação da colonização interna das manivas

Experimento realizado com fim de testar a progressão da doença nas manivas utilizadas em experimento de casa de vegetação. Foi realizado experimento em gerbox, para avaliar a colonização do patógeno interna e externa, dos tratamentos realizados no experimento de casa de vegetação.

Foram retiradas três manivas de cada tratamento e de cada variedade (BRS Poti Branca e BRS Novo Horizonte), ficando assim os tratamentos em: T0 - Controle; T1 - *Trichoderma*; T2 - Mix 1 de *Bacillus*; T3 - Mix 2 de *Bacillus*; T4 - Mix 3 de *Bacillus*; T5 - Fungicida.

As manivas foram deixadas em câmara úmida, onde foi colocado papel filtro umedecido juntamente com as três manivas e após isto foram vedados com papel filme e deixadas em temperatura ambiente  $\pm 25$  °C. Aos 45 dias as manivas foram retiradas e foram realizadas as avaliações de Colonização interna e Incidência externa de sintomas da doença e realizada pesagem de Massa fresca da parte aérea e Massa fresca da raiz.

### 2.4 Análise estatística

Os dados obtidos em avaliação dos experimentos de podridão negra e seca foram submetidos ao Teste t de comparação de médias ( $p < 0,05$ ), entre os sete tratamentos da análise de agrupamento e o tratamento “Controle”, através do pacote “*ggpubr*”. Os dados referentes ao experimento do complexo podridão radicular foram submetidos a análise de variância (ANOVA) em esquema fatorial e as médias foram agrupadas e avaliadas em teste *Scott-Knott* à 5% e teste *t de student* de, através de pacote “*ExpDes*” e “*ggpubr*”, respectivamente, no ambiente de programação *Ri386 4.2.1* (R Core Team, 2022). Para os dados percentuais do experimento foi realizada a transformação de dados para arcoseno  $\sqrt{x(\%)}$ . Os gráficos foram plotados com auxílio do pacote “*ggplot2*”. Foram realizadas as

análises de correlação de Pearson ( $p \leq 0,05$ ) através dos pacotes “GGally”, “corrplot”, “corrgram”, “Boruta”, “car”, “PerformanceAnalytics” e “caret”.

### 3.0 RESULTADOS

#### 3.1 Testes *in planta* - Podridão negra e seca da mandioca

Na avaliação de plantas germinadas aos 7 dias após o plantio para experimento de podridão negra houve interação significativa, foi constatado efeito significativo ( $p < 0,05$ ) com percentual médio de germinação de 33% e 31% para variedade ‘BRS Formosa’ e ‘BRS Kiriris’, respectivamente. Para tratamento inoculado com T2T, as médias percentuais das variedades ‘BRS Formosa’ e ‘BRS Kiriris’, respectivamente, foram de 40% e 45% para o tratamento T8TB3 e T5B3 obtiveram 30% e 35%, o tratamento T8TB3, apresentou o maior percentual de germinação para variedade ‘BRS Kiriris’ com 75% de taxa de germinação diferindo significativamente do tratamento T1C que atingiu 25%. (Figura 1).

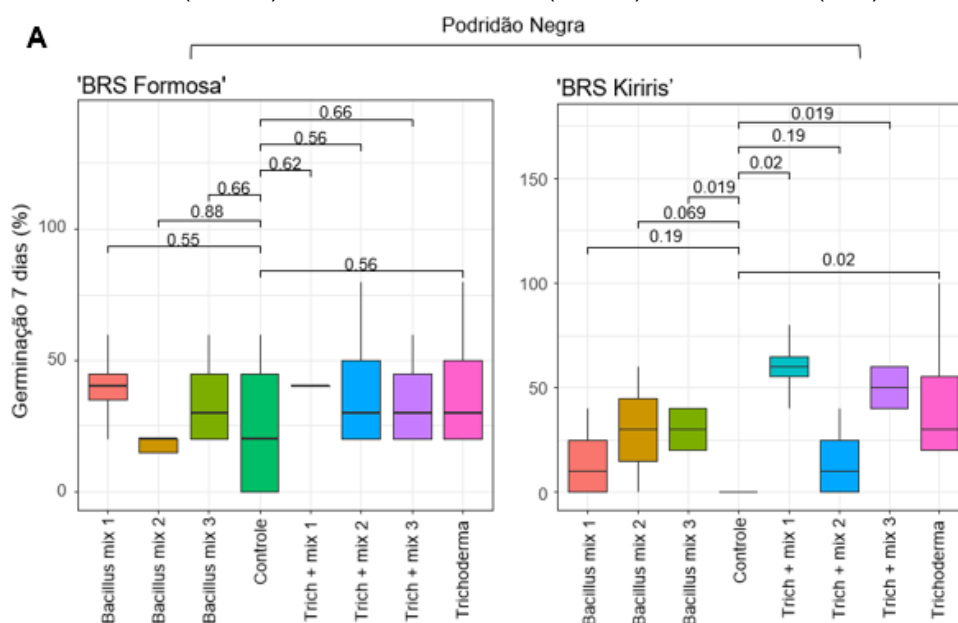
Na mesma avaliação, para plantas inoculadas com patógeno de podridão seca (Figura 1) os tratamentos T5B3 e T6TB1, apresentaram médias superiores aos demais tratamentos, com uma porcentagem de 85% de germinação para ambos os tratamentos na variedade ‘BRS Formosa’, onde no controle havia 50% de plantas germinadas, para os mesmos tratamentos em cultivar ‘BRS Kiriris’ as médias de germinação atingiram 80% e 65%, o tratamento inoculado com *Trichoderma asperellum* T2T diferiu significativamente ( $p < 0,05$ ) do tratamento controle. O número de plantas germinadas aos quinze dias, foi significativo nos tratamentos T5B3 para variedade ‘BRS Formosa’ e T8TB3 para variedade ‘BRS Kiriris’ quando comparados ao tratamento T1C para doença da podridão negra. O tratamentos do experimento inoculado com patógenos causadores de podridão seca atingiram 100% de germinação para cultivar ‘BRS Formosa’, já para ‘BRS Kiriris’ o tratamento T5B3 obteve maior percentual de germinação atingindo 80%, sendo significativamente superior ( $p < 0,05$ ) ao tratamento T1C.

Para podridão negra na variedade ‘BRS Formosa’ o tratamento T7TB2, apresentou média significativamente superior ao tratamento controle. Os tratamentos T5B3 e T8TB3 estão entre os que apresentaram altura de planta superior em relação ao tratamento T1C e demais tratamentos em ambos os

experimentos de podridões radiculares, porém para esta variável não houve diferença significativa entre os tratamentos.

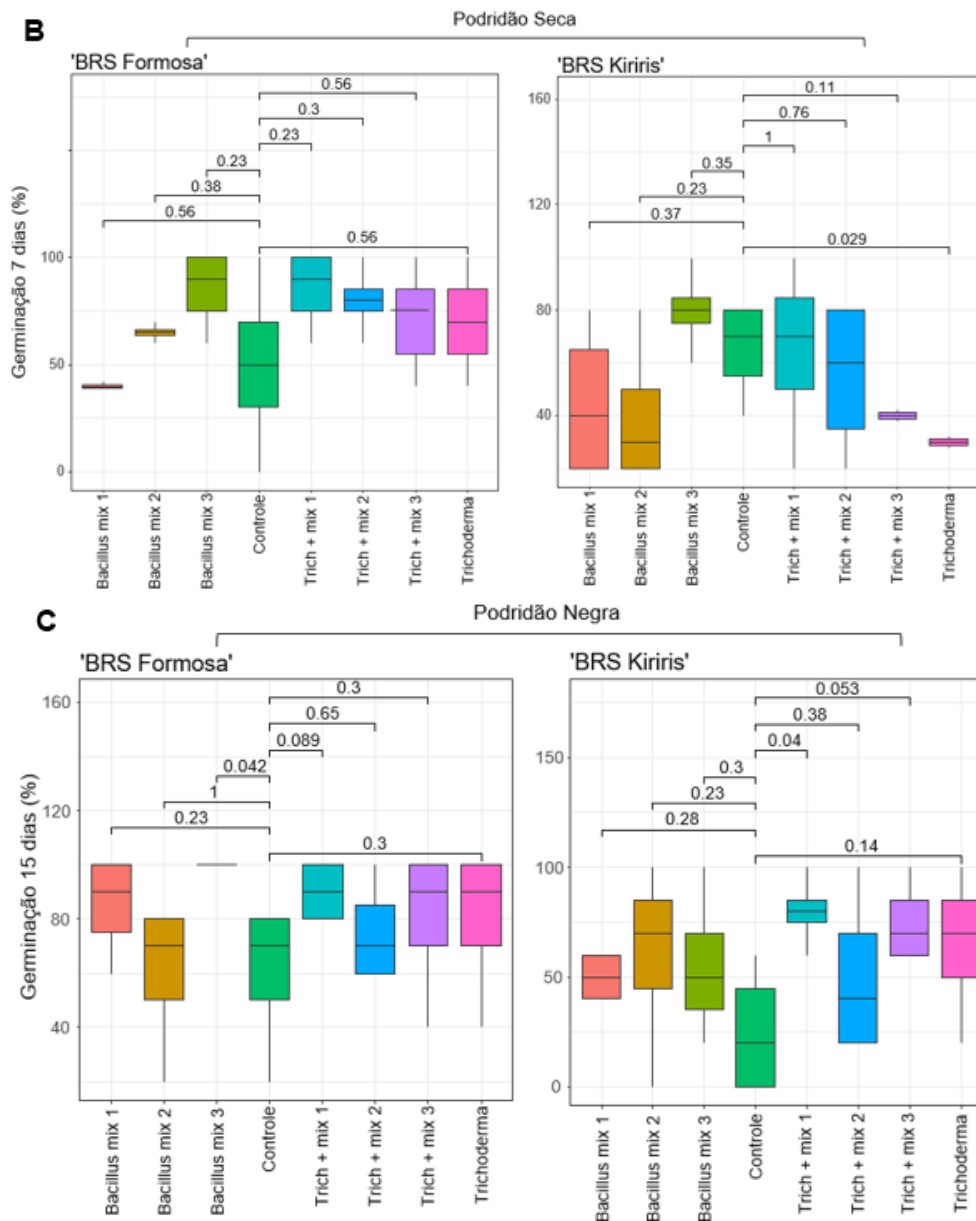
Na variável vigor de plantas, não houve diferença significativa entre os tratamentos para ambos os experimentos realizados, porém foi possível notar expressivos valores de vigor para os tratamentos T6TB1 para 'BRS Formosa' e T5B3 para 'BRS Kiriris' quando comparados com o tratamento T1C, para o experimento de podridão negra, já para o experimento inoculado com fungos de podridão seca, o mesmo tratamento T5B3 e T7TB2 apresentaram médias superiores em relação ao tratamento T1C. Foi possível notar que as plantas inoculadas com patógenos de podridão negra apresentaram vigor inferior com relação as plantas inoculadas com os patógenos de podridão seca (Figura 2).

Figura 1. Boxplot das médias agrupadas pelo teste *t de student* ( $p < 0,05$ ) da doença da podridão negra (A) e (C) e podridão seca (B) e (D), baseadas nos parâmetros avaliados germinação (%) 7 e 15 dias, respectivamente, avaliados em cultivar 'BRS Formosa' e 'BRS Kiriris'. Bacillus mix 1 (T3B1); Bacillus mix 2 (T4B2); Bacillus mix3 (T5B3); Controle (T1C); Trichoderma + mix1 (T6TB1); Trichoderma + mix 2 (T7TB2); Trichoderma + mix 3 (T8TB3); Trichoderma (T2T).



continuação...

Figura 1. Boxplot das médias agrupadas pelo teste *t de student* ( $p < 0,05$ ) da doença da podridão negra (A) e (C) e podridão seca (B) e (D), baseadas nos parâmetros avaliados germinação (%) 7 e 15 dias, respectivamente, avaliados em cultivar 'BRS Formosa' e 'BRS Kiriris'. Bacillus mix 1 (T3B1); Bacillus mix 2 (T4B2); Bacillus mix 3 (T5B3); Controle (T1C); Trichoderma + mix 1 (T6TB1); Trichoderma + mix 2 (T7TB2); Trichoderma + mix 3 (T8TB3); Trichoderma (T2T).



continuação...

Figura 1. Boxplot das médias agrupadas pelo teste *t de student* ( $p < 0,05$ ) da doença da podridão negra (A) e (C) e podridão seca (B) e (D), baseadas nos parâmetros avaliados germinação (%) 7 e 15 dias, respectivamente, avaliados em cultivar 'BRS Formosa' e 'BRS Kiriiris'. Bacillus mix 1 (T3B1); Bacillus mix 2 (T4B2); Bacillus mix3 (T5B3); Controle (T1C); Trichoderma + mix1 (T6TB1); Trichoderma + mix 2 (T7TB2); Trichoderma + mix 3 (T8TB3); Trichoderma (T2T).

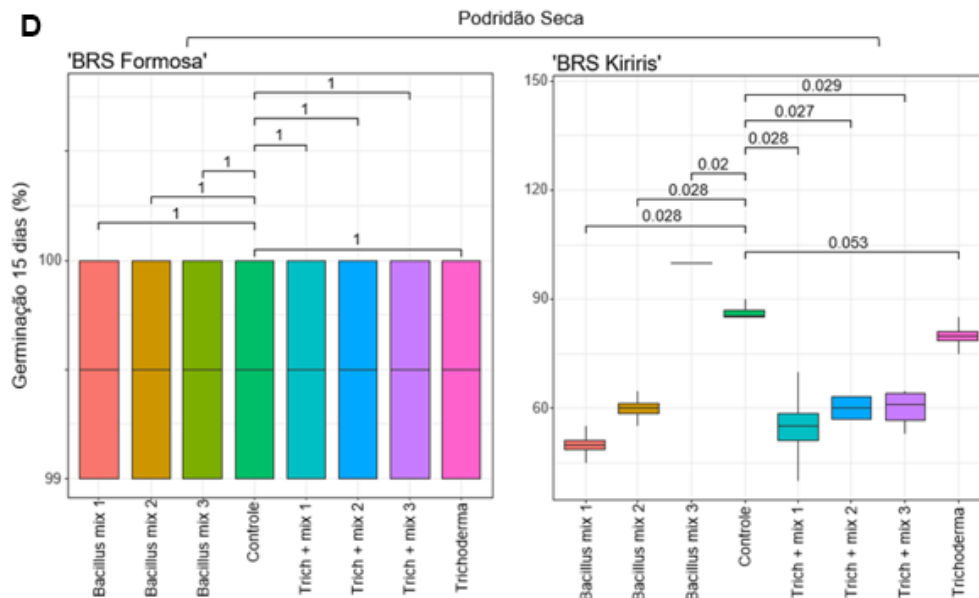
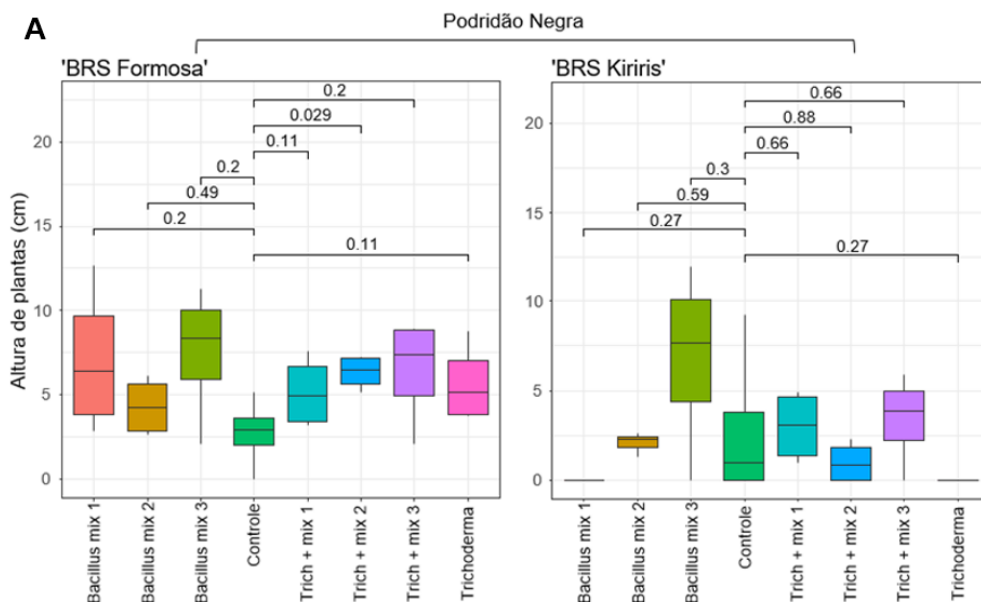
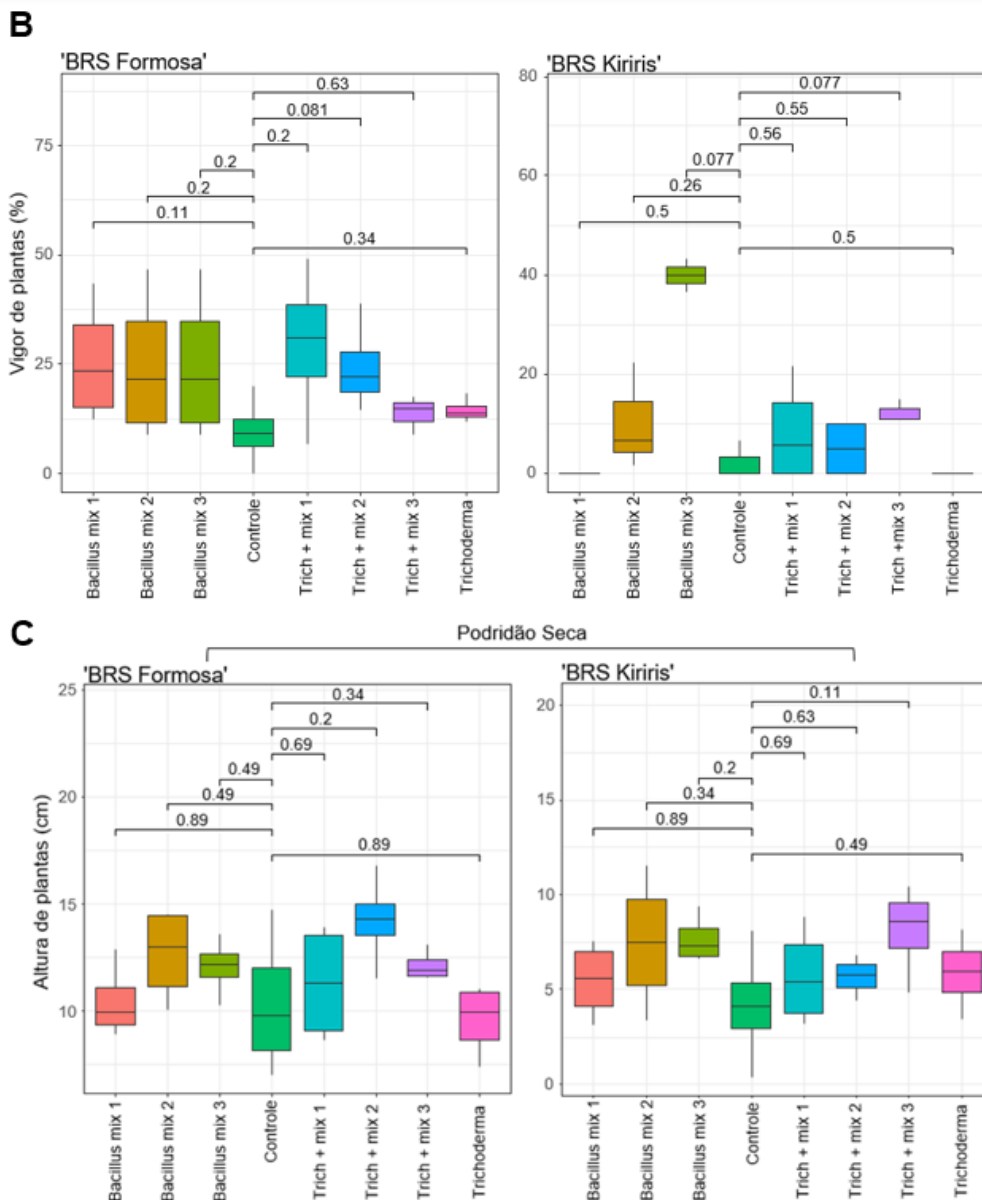


Figura 2. Boxplot das médias agrupadas pelo teste *t de student* ( $p < 0,05$ ) da doença da podridão negra (A) e (B); podridão seca (C) e (D), baseadas nos parâmetros avaliados altura de planta (cm) e vigor (%) avaliados em cultivar 'BRS Formosa' e 'BRS Kiriiris' Bacillus mix 1 (T3B1); Bacillus mix 2 (T4B2); Bacillus mix3 (T5B3); Controle (T1C); Trichoderma + mix1 (T6TB1); Trichoderma + mix 2 (T7TB2); Trichoderma + mix 3 (T8TB3); Trichoderma (T2T).



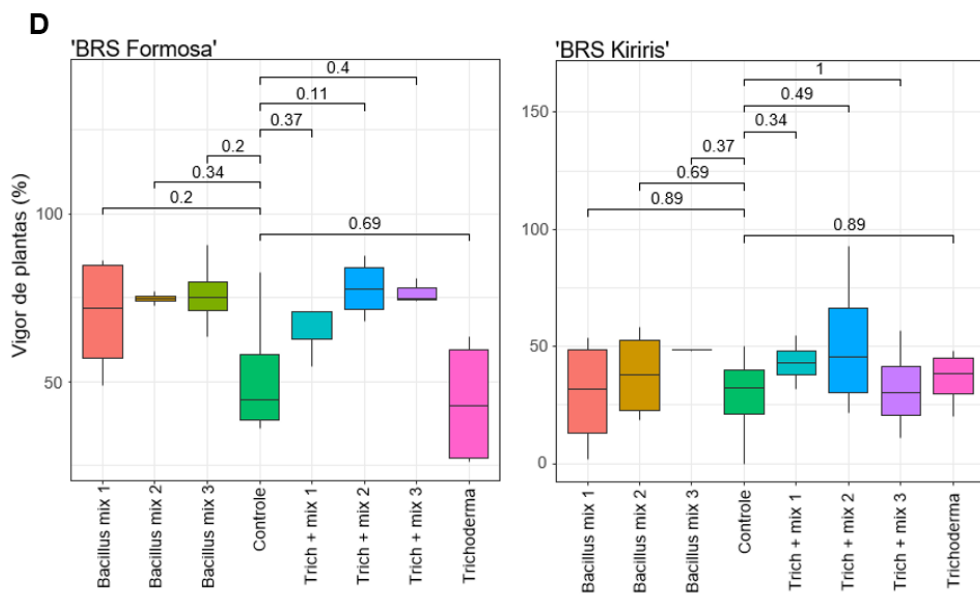
continuação...

Figura 2. Boxplot das médias agrupadas pelo teste *t de student* ( $p < 0,05$ ) da doença da podridão negra (A) e (B); podridão seca (C) e (D), baseadas nos parâmetros avaliados altura de planta (cm) e vigor (%) avaliados em cultivar 'BRS Formosa' e 'BRS Kiriris' Bacillus mix 1 (T3B1); Bacillus mix 2 (T4B2); Bacillus mix 3 (T5B3); Controle (T1C); Trichoderma + mix 1 (T6TB1); Trichoderma + mix 2 (T7TB2); Trichoderma + mix 3 (T8TB3); Trichoderma (T2T).



continuação...

Figura 2. Boxplot das médias agrupadas pelo teste *t de student* ( $p < 0,05$ ) da doença da podridão negra (A) e (B); podridão seca (C) e (D), baseadas nos parâmetros avaliados altura de planta (cm) e vigor (%) avaliados em cultivar 'BRS Formosa' e 'BRS Kiriris' Bacillus mix 1 (T3B1); Bacillus mix 2 (T4B2); Bacillus mix 3 (T5B3); Controle (T1C); Trichoderma + mix 1 (T6TB1); Trichoderma + mix 2 (T7TB2); Trichoderma + mix 3 (T8TB3); Trichoderma (T2T).



Na avaliação do experimento de podridão negra, o tratamento inoculado com o mix 3 de *Bacillus* spp apresentou valores expressivos nas médias de massa fresca e seca da parte aérea, quando comparados com o tratamento controle, apenas os tratamentos T4B2 e T8TB3 não diferiu significativamente do tratamento T1C na variável peso fresco da parte aérea, assim como na variável peso fresco da raiz, onde os tratamentos T4B2, T2T e T5B3, foram aqueles que não diferiam do tratamento controle, na cultivar 'BRS Formosa'. Para cultivar 'BRS Kiriris', não houve efeito significativo entre os tratamentos para ambas as variáveis. Os tratamentos T4B2 e T5B3, foram os tratamentos que diferiram do tratamento T1C em peso seco da parte aérea, respectivamente, para as cultivares 'BRS Formosa' e 'BRS Kiriris', já para variável peso seco da raiz, não houve significância das médias para cultivar 'BRS Formosa', para 'BRS Kiriris' o mix 1 de *Bacillus* spp. isolado e com a presença de *Trichoderma* spp. foram os tratamentos que tiveram efeito significativo em relação ao tratamento controle.

Em experimento de podridão seca, houve incremento de massa fresca da parte aérea para tratamento T7TB2, diferindo significativamente do tratamento T1C ( $p < 0,05$ ). Para o peso seco da parte aérea e peso fresco e seco da raiz, os tratamentos em sua maioria se destacaram significativamente ( $p < 0,05$ ) em



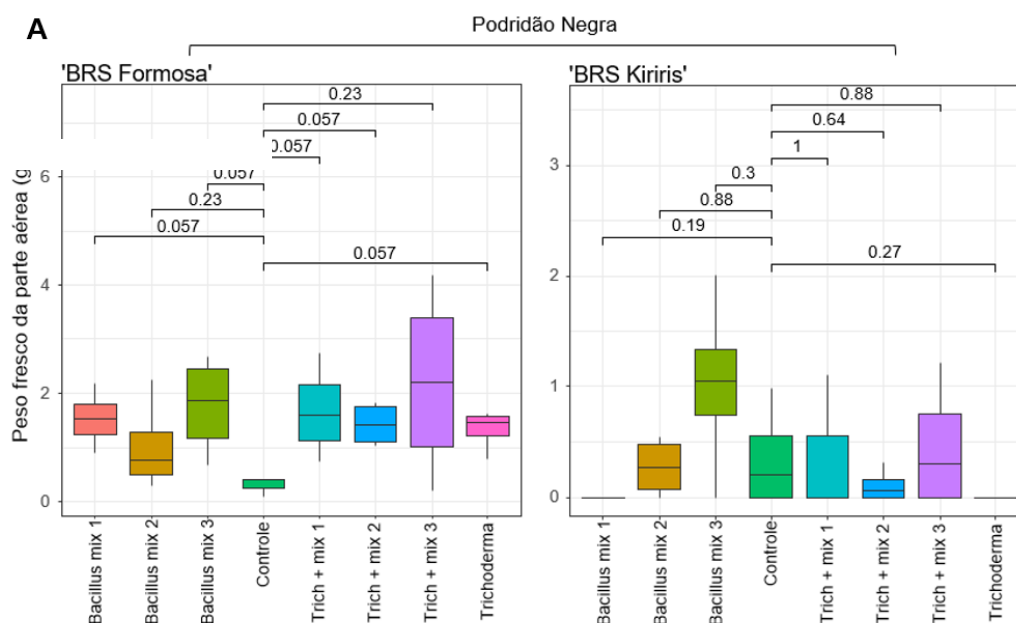
relação ao tratamento controle, com exceção dos tratamentos T2T para ambas variáveis e T6TB1 e T8TB3 para variável peso fresco e seco da raiz na cultivar 'BRS Formosa'. Para a cultivar 'BRS Kiriris não houve significância entre os tratamentos inoculados e tratamento controle.

Estatisticamente foi possível constatar maior colonização interna e incidência externa ( $p < 0,05$ ) de podridão negra nas manivas dos tratamentos T1C ('BRS Kiriris' 78,2%). O tratamento T8TB3, apresentou menor porcentagem (33,3% e 35,4%) para ambas as variáveis na cultivar 'BRS Formosa', diferindo estatisticamente do tratamento T1C ( $p < 0,05$ ) uma redução de mais de 20%. O tratamento controle apresentou maior média de incidência externa do patógeno de podridão negra (Figura 3).

Para as doenças de podridão negra e seca a variedade 'BRS Kiriris' apresentou maior susceptibilidade a colonização interna e externa dos patógenos inoculados ( $p < 0,05$ ) quando comparado com 'BRS Formosa', com uma porcentagem de 56,2% e 37,7%, respectivamente.

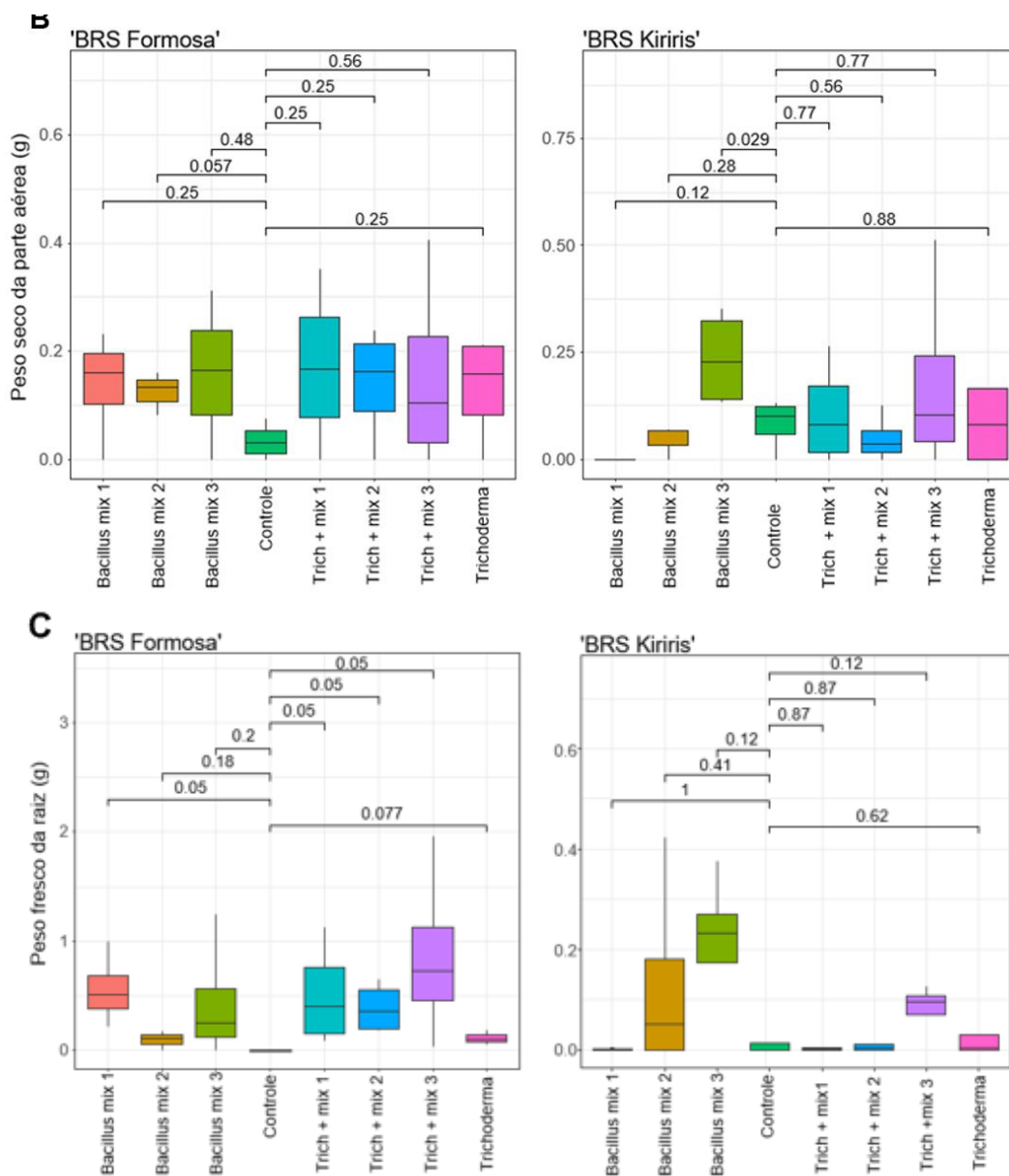
Em podridão seca, não houve diferença significativa entre os tratamentos. Para o parâmetro de incidência externa em podridão seca o tratamento inoculado com, apenas, com *T. asperellum* apresentou maior média de incidência do patógeno (Figura 4).

Figura 3. Boxplot das médias agrupadas pelo teste *t de student* ( $p < 0,05$ ) da doença da podridão negra (A); (B); (C); (D) e podridão seca (E); (F); (G); (H), baseadas nos parâmetros avaliados peso fresco e seco da parte aérea (g) e peso fresco e seco da raiz avaliados em cultivar 'BRS Formosa' e 'BRS Kiriris'. Bacillus mix 1 (T3B1); Bacillus mix 2 (T4B2); Bacillus mix3 (T5B3); Controle (T1C); Trichoderma + mix1 (T6TB1); Trichoderma + mix 2 (T7TB2); Trichoderma + mix 3 (T8TB3); Trichoderma (T2T).



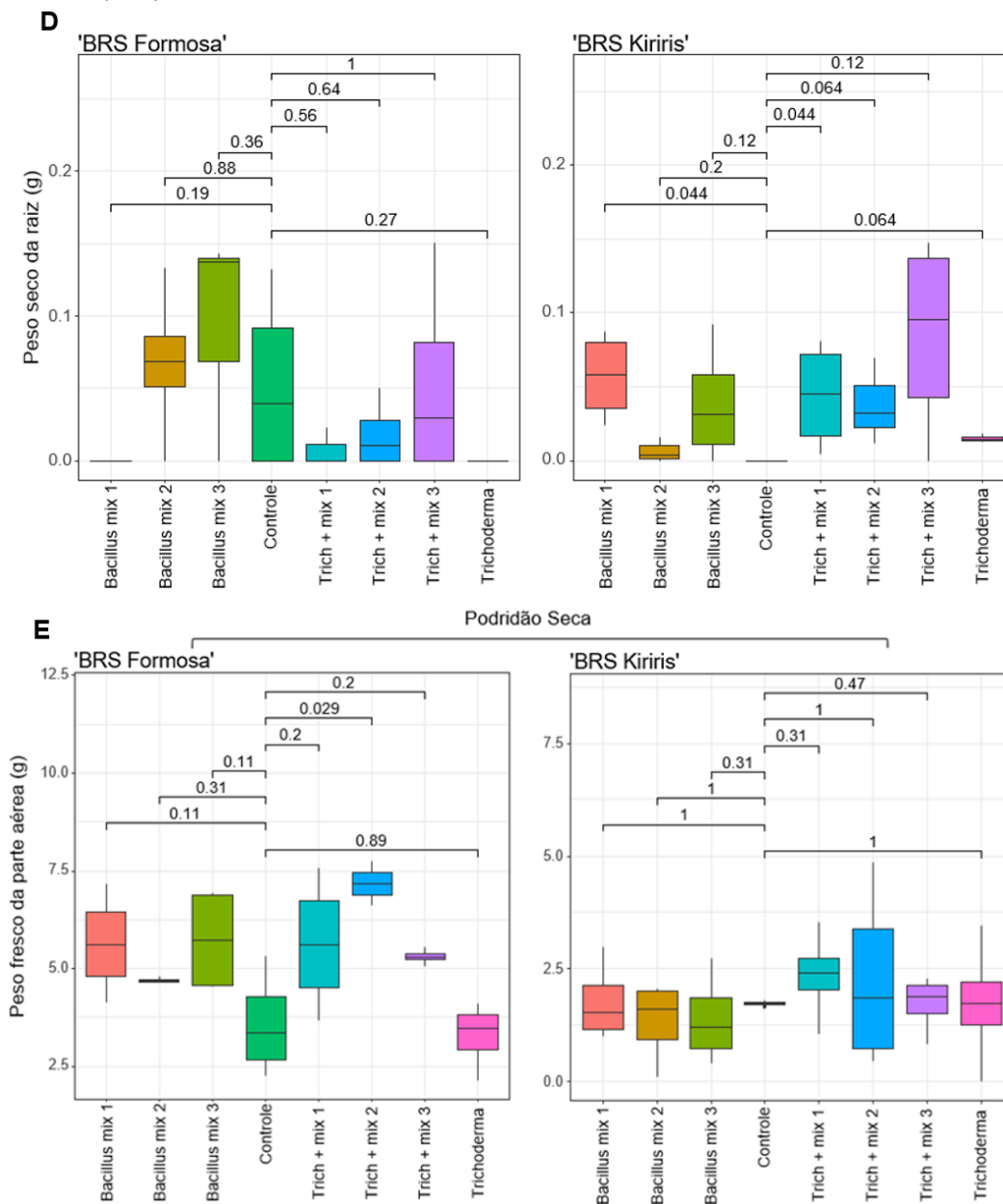
Continuação...

Figura 3. Boxplot das médias agrupadas pelo teste *t de student* ( $p < 0,05$ ) da doença da podridão negra (A); (B); (C); (D) e podridão seca (E); (F); (G); (H), baseadas nos parâmetros avaliados peso fresco e seco da parte aérea (g) e peso fresco e seco da raiz avaliados em cultivar 'BRS Formosa' e 'BRS Kiriris'. Bacillus mix 1 (T3B1); Bacillus mix 2 (T4B2); Bacillus mix3 (T5B3); Controle (T1C); Trichoderma + mix1 (T6TB1); Trichoderma + mix 2 (T7TB2); Trichoderma + mix 3 (T8TB3); Trichoderma (T2T).



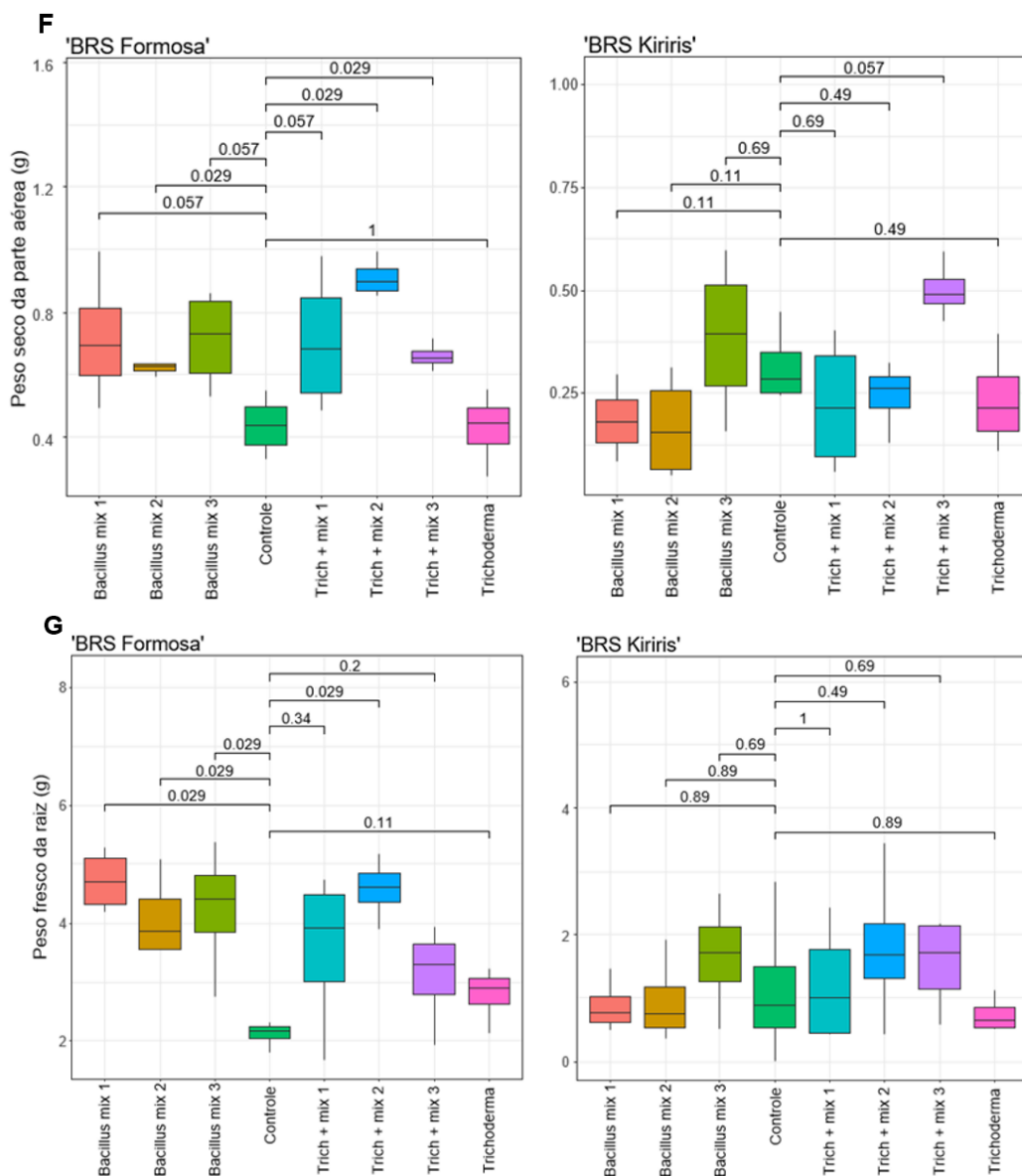
Continuação...

Figura 3. Boxplot das médias agrupadas pelo teste *t de student* ( $p < 0,05$ ) da doença da podridão negra (A); (B); (C); (D) e podridão seca (E); (F); (G); (H), baseadas nos parâmetros avaliados peso fresco e seco da parte aérea (g) e peso fresco e seco da raiz avaliados em cultivar 'BRS Formosa' e 'BRS Kiriris'. Bacillus mix 1 (T3B1); Bacillus mix 2 (T4B2); Bacillus mix 3 (T5B3); Controle (T1C); Trichoderma + mix 1 (T6TB1); Trichoderma + mix 2 (T7TB2); Trichoderma + mix 3 (T8TB3); Trichoderma (T2T).



Continuação...

Figura 3. Boxplot das médias agrupadas pelo teste *t de student* ( $p < 0,05$ ) da doença da podridão negra (A); (B); (C); (D) e podridão seca (E); (F); (G); (H), baseadas nos parâmetros avaliados peso fresco e seco da parte aérea (g) e peso fresco e seco da raiz avaliados em cultivar 'BRS Formosa' e 'BRS Kiriris'. Bacillus mix 1 (T3B1); Bacillus mix 2 (T4B2); Bacillus mix3 (T5B3); Controle (T1C); Trichoderma + mix1 (T6TB1); Trichoderma + mix 2 (T7TB2); Trichoderma + mix 3 (T8TB3); Trichoderma (T2T).



Continuação...

Figura 3. Boxplot das médias agrupadas pelo teste *t de student* ( $p < 0,05$ ) da doença da podridão negra (A); (B); (C); (D) e podridão seca (E); (F); (G); (H), baseadas nos parâmetros avaliados peso fresco e seco da parte aérea (g) e peso fresco e seco da raiz avaliados em cultivar 'BRS Formosa' e 'BRS Kiriris'. Bacillus mix 1 (T3B1); Bacillus mix 2 (T4B2); Bacillus mix3 (T5B3); Controle (T1C); Trichoderma + mix1 (T6TB1); Trichoderma + mix 2 (T7TB2); Trichoderma + mix 3 (T8TB3); Trichoderma (T2T).

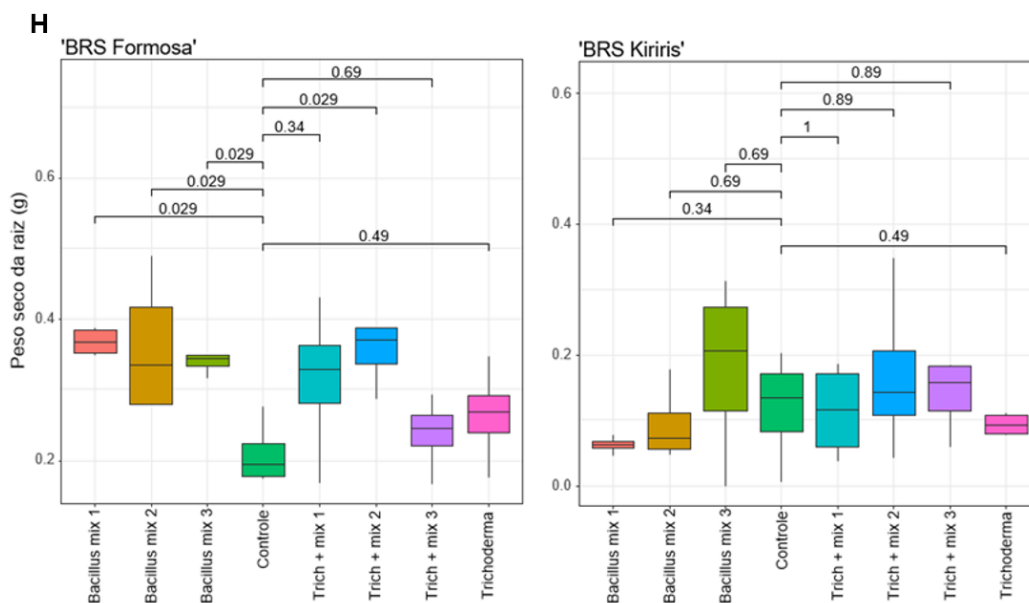
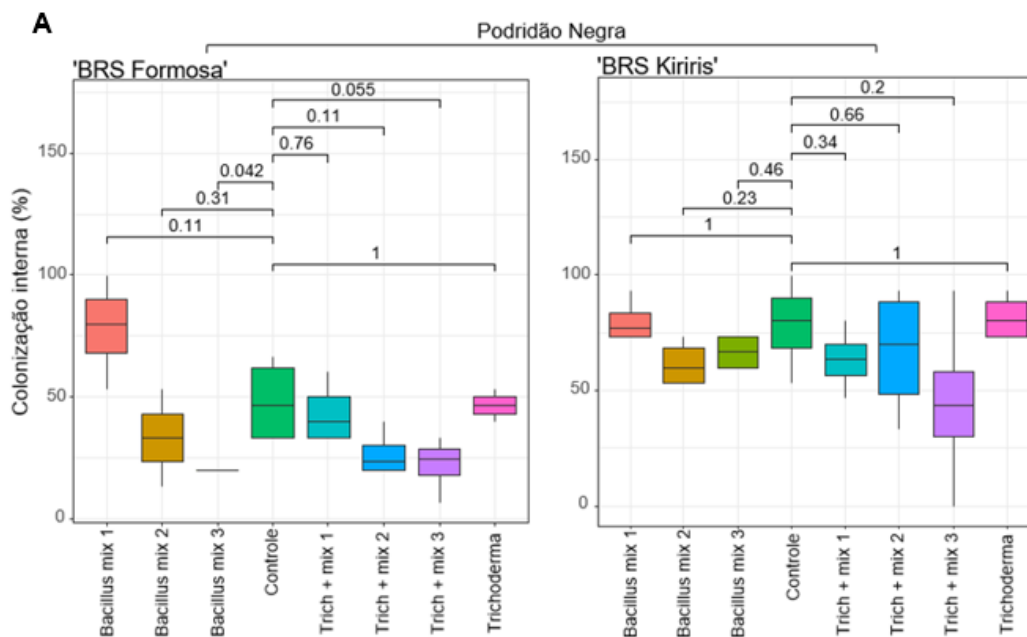
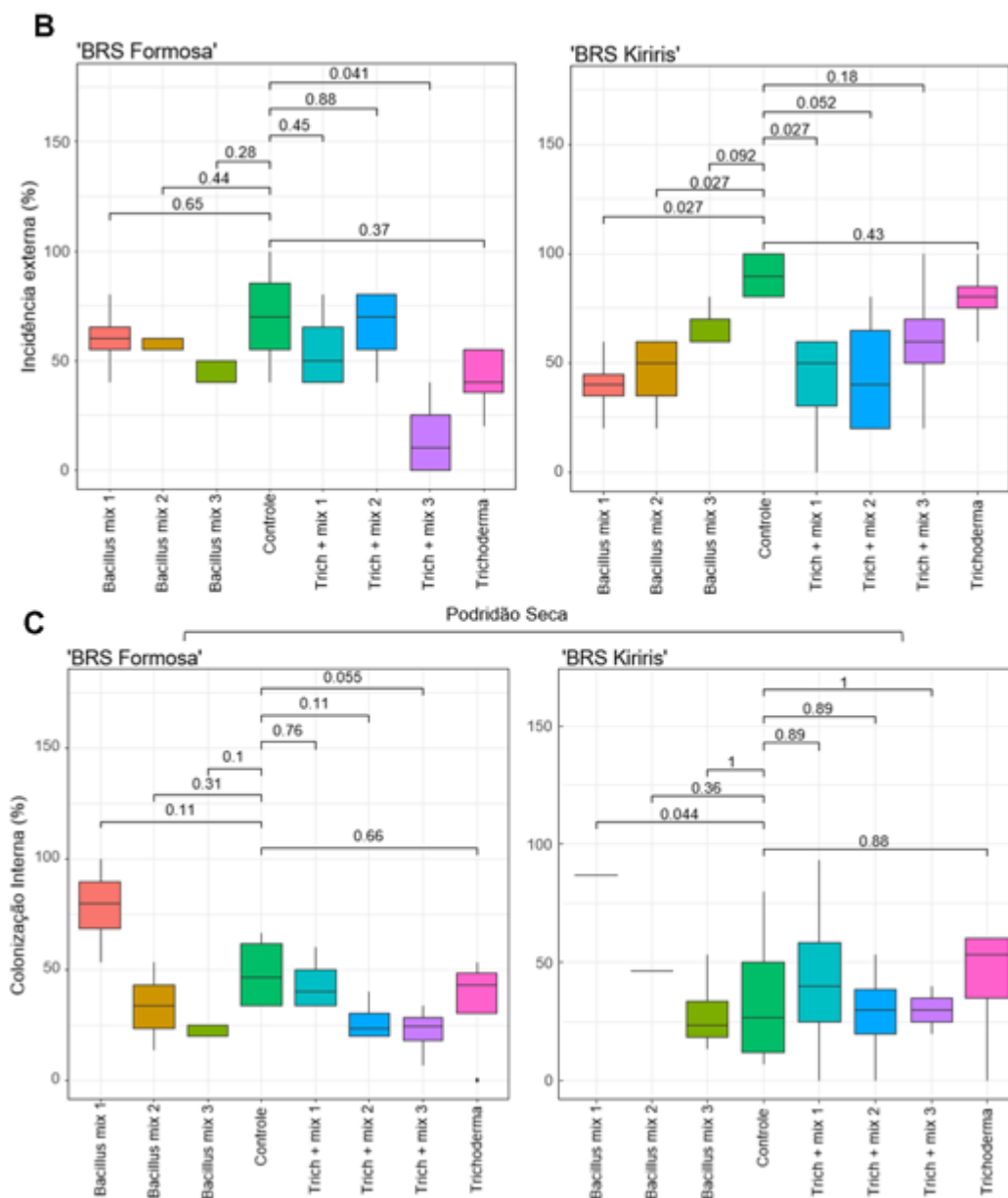


Figura 4. Boxplot das médias agrupadas da doença da podridão negra e podridão seca, baseadas nos parâmetros avaliados colonização interna e incidência externa (%) avaliados em cultivar 'BRS Formosa' e 'BRS Kiriris'. Bacillus mix 1 (T3B1); Bacillus mix 2 (T4B2); Bacillus mix3 (T5B3); Controle (T1C); Trichoderma + mix1 (T6TB1); Trichoderma + mix 2 (T7TB2); Trichoderma + mix 3 (T8TB3); Trichoderma (T2T).



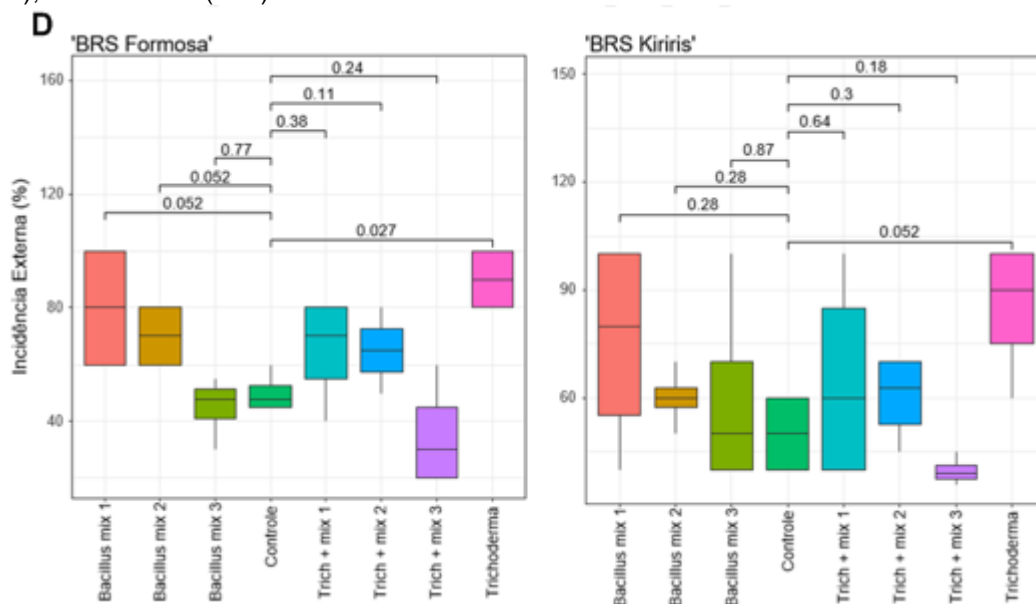
Continuação...

Figura 4. Boxplot das médias agrupadas da doença da podridão negra e podridão seca, baseadas nos parâmetros avaliados colonização interna e incidência externa (%) avaliados em cultivar 'BRS Formosa' e 'BRS Kiriris'. Bacillus mix 1 (T3B1); Bacillus mix 2 (T4B2); Bacillus mix3 (T5B3); Controle (T1C); Trichoderma + mix1 (T6TB1); Trichoderma + mix 2 (T7TB2); Trichoderma + mix 3 (T 8TB3); Trichoderma (T2T).



Continuação...

Figura 4. Boxplot das médias agrupadas da doença da podridão negra e podridão seca, baseadas nos parâmetros avaliados colonização interna e incidência externa (%) avaliados em cultivar 'BRS Formosa' e 'BRS Kiriris'. Bacillus mix 1 (T3B1); Bacillus mix 2 (T4B2); Bacillus mix3 (T5B3); Controle (T1C); Trichoderma + mix1 (T6TB1); Trichoderma + mix 2 (T7TB2); Trichoderma + mix 3 (T 8TB3); Trichoderma (T2T).

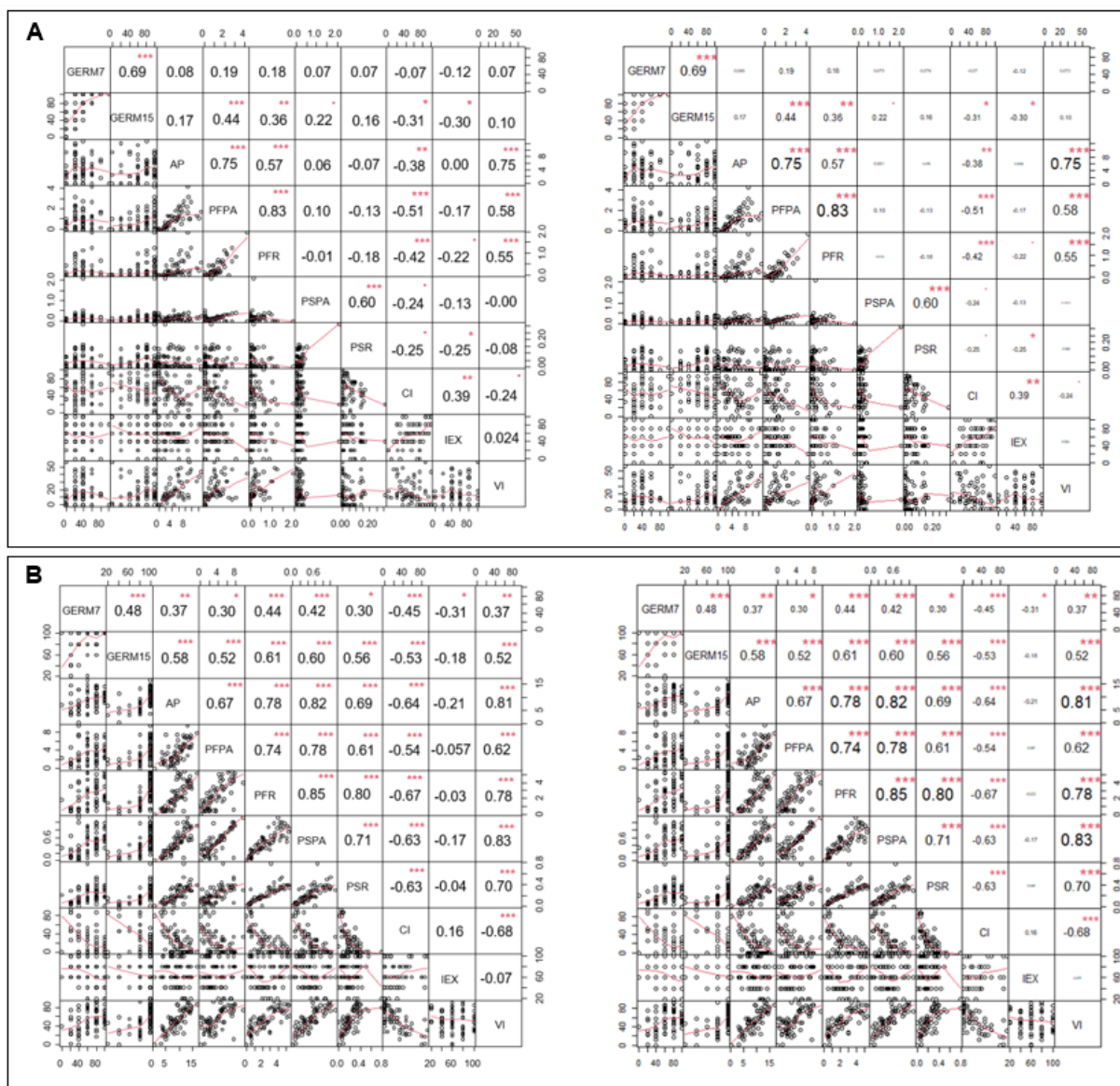


Foi possível notar a relação entre o aumento e a redução nos parâmetros de crescimento observando as correlações moderadas negativas entre a colonização interna e externa e os parâmetros de crescimento, notando-se a correlação significativa no peso fresco de raiz e peso fresco da parte aérea x colonização interna (-42% e -51%) respectivamente e altura de planta e germinação aos quinze dias x colonização interna (-38% e -31%), respectivamente (Figura 5.A).

Também foi possível observar as fortes correlações negativas, nos mesmos parâmetros associados ao crescimento de planta e a infecção do patógeno da podridão seca na planta. Onde todos os parâmetros de crescimento correlacionaram de forma significativa quanto a colonização interna do patógeno na maniva, altura de planta (-69%); peso fresco da parte aérea e peso fresco da raiz (-61% e -80%), respectivamente, e vigor (-68%) (Figura 5.B).

É importante ressaltar as fortes correlações positivas entre os parâmetros altura de planta e vigor (81%), altura de planta e peso fresco da raiz (82%), peso fresco da raiz e vigor (78%).

Figura 5. Correlação de Pearson entre variedades 'BRS Kiriris' e 'BRS Formosa' inoculadas com patógenos de podridão negra (A) e inoculadas com patógenos de podridão seca (B). A parte superior do correlograma se refere a significância da correlação entre as variáveis. Na diagonal estão as variáveis, com a distribuição dos tratamentos. Na parte inferior estão os mapas de pontos. GERM7 (Germinação 7 dias); GERM15 (Germinação 15 dias); AP (Altura de planta); PFFA (Peso fresco da parte aérea); PFR (Peso fresco da raiz); PSPA (Peso seco da parte aérea); PSR (Peso seco da raiz); CI (Colonização interna); IEX: (Incidência externa); VI (Vigor de planta).



### 3.2 Testes *in planta*: Controle biológico do complexo podridão radicular

Foi, fisiologicamente, notório um expressivo desenvolvimento de planta em relação a alguns tratamentos, o que foi possível confirmar com a avaliação de germinação de plantas aos 7 dias, onde 5% e 10%, das plantas de 'BRS Novo horizonte' e 'BRS Poti branca', respectivamente, do tratamento T1C haviam germinado. No tratamento T8B3 não havia nenhuma planta germinada. Os



tratamentos T3FA, T7B2 e T5T, obtiveram as maiores taxas de germinação aos 7 dias entre 30 e 70%.

Para germinação aos 15 dias houve interação significativa. Para ambas as variedades, os tratamentos T1C e T8B3, mantiveram suas médias inferiores em relação aos demais tratamentos, sendo os únicos a apresentarem o percentual abaixo de 40% de taxa de germinação, os demais tratamentos mantiveram uma taxa de germinação acima de 60%, neste período o tratamento T10TB2 para variedade 'BRS Poti branca' também apresentou média inferior (58,3%), diferentemente da variedade 'BRS Novo horizonte' que alcançou a média de 95,8% neste tratamento. O tratamento T9TB1 apresentou uma porcentagem de 97,9% de taxa de germinação para variedade BRS Novo horizonte e o tratamento T5T alcançou uma média de 89,5%.

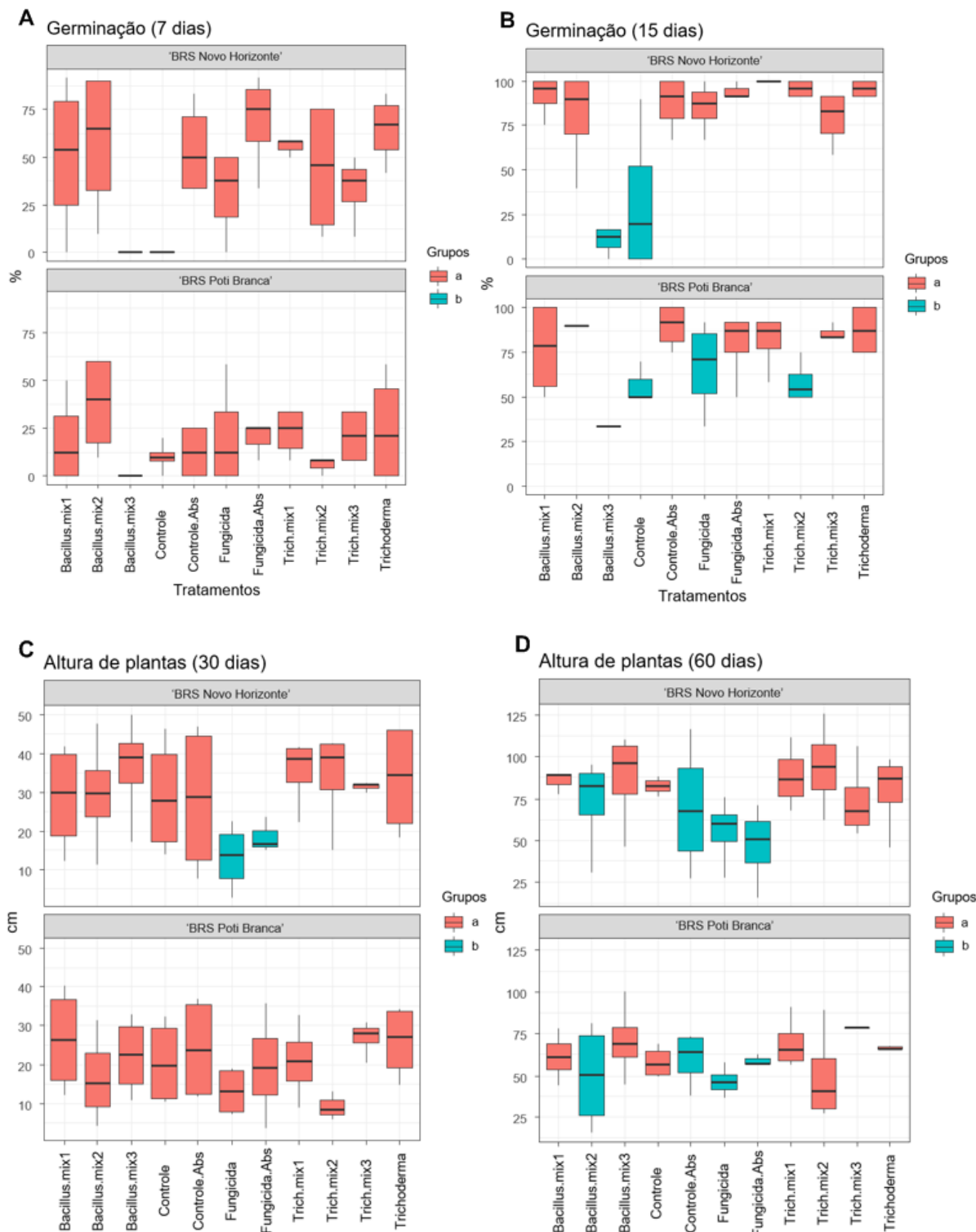
Para a cultivar 'BRS Novo Horizonte' aos 30 dias, todos os tratamentos biológicos e controle diferiram significativamente das manivas tratadas com fungicida na variável altura de planta, apresentando características de fitotoxidez nas plantas, o que acabou retardando o crescimento seu crescimento.

Aos 60 dias os tratamentos, os tratamentos T2CA, T3F, T4FA e T7B2, apresentaram médias de alturas inferiores, diferindo dos demais tratamentos na variável em altura de planta para variedade ambas as variedades. Os tratamentos inoculados com Mix 3, com e sem a presença de *T. asperellum*, apresentaram efeito de maior altura entre os tratamentos (Figura 7).

Para variável diâmetro do caule aos 30 dias, ocorreu interação significativa, o tratamento T10TB2 apresentou média superior para cultivar 'BRS Novo horizonte', e T11TB3 para 'BRS Poti branca'. O tratamento T3F, apresentou média inferior quando comparado com os demais tratamentos ( $p < 0,05$ ) para ambas as variedades.

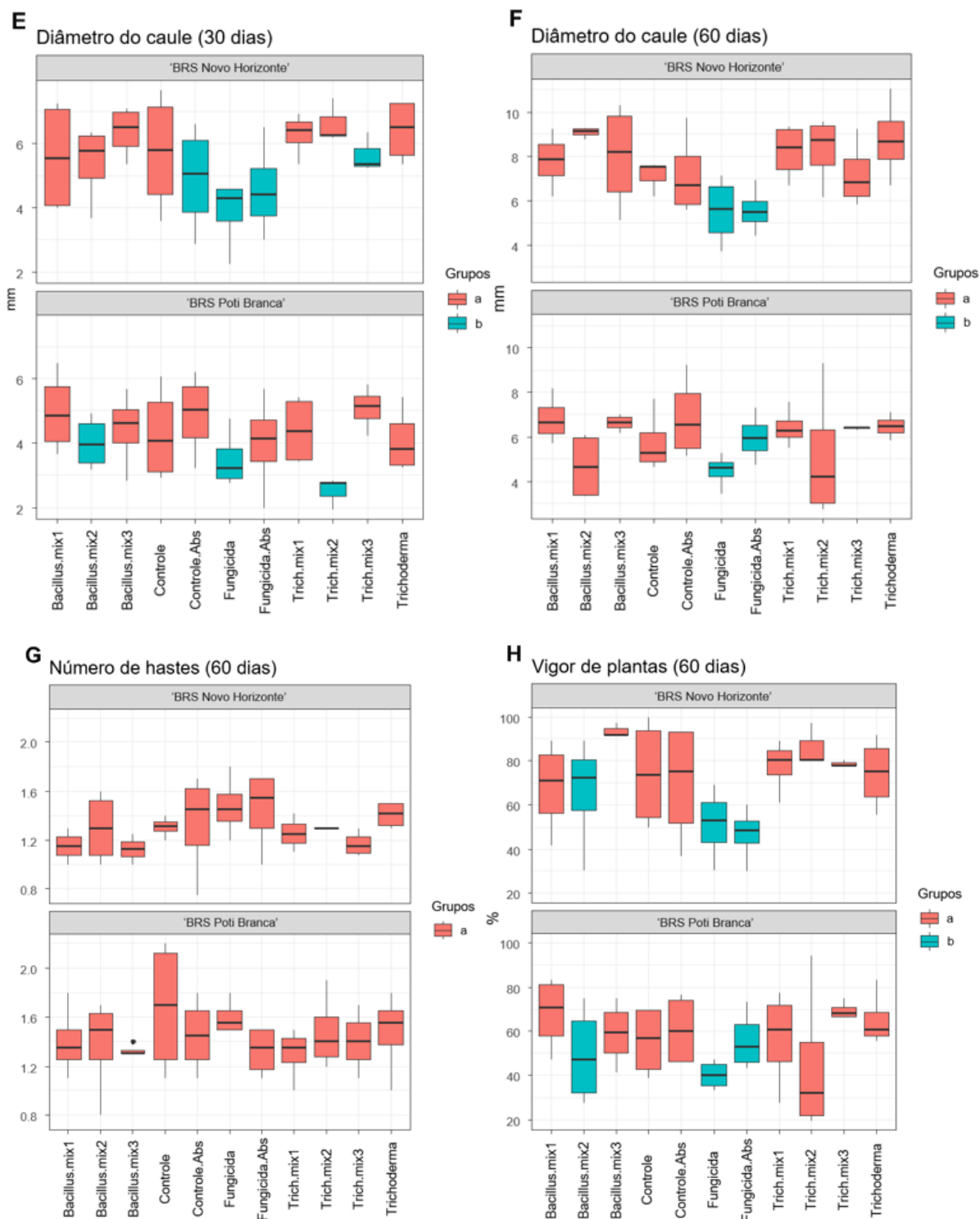
Aos 60 dias ambos os tratamentos inoculados com fungicida (T3F e T4FA) tiveram suas médias inferiores em relação aos demais tratamentos na variedade 'BRS Poti branca', para 'BRS Novo horizonte' para diâmetro do caule. 'BRS Poti branca' apresentou efeito significativo para número de hastes, porém não houve influência significativa entre os tratamentos. Para variável vigor de plantas, os tratamentos inoculados com mix 3 de *Bacillus* spp. e mix 1, com e sem a presença de *Trichoderma* spp. apresentaram plantas com maior vigor (Figura 7).

Figura 6. Boxplot das médias agrupadas de podridão radicular, baseadas nos parâmetros avaliados germinação (%) 7 e 15 dias (A) e (B); altura de plantas (cm) 30 e 60 dias (C) e (D); diâmetro do caule (mm) 30 e 60 dias (E) e (F); Número de hastes - 60 dias (G); Vigor de plantas (%) 60 dias (H) em cultivar 'BRS Novo horizonte' e 'BRS Poti branca'. Bacillus mix 1 (T6B1); Bacillus mix 2 (T7B2); Bacillus mix3 (T3F); Controle(T1C); Controle Absoluto% (T2CA); Fungicida (T3F); Fungicida Absoluto (T4FA); Trichoderma + mix1 (T9TB1); Trichoderma + mix 2 (T10TB2); Trichoderma + mix 3 (T11TB3); Trichoderma (T5T).



Continuação...

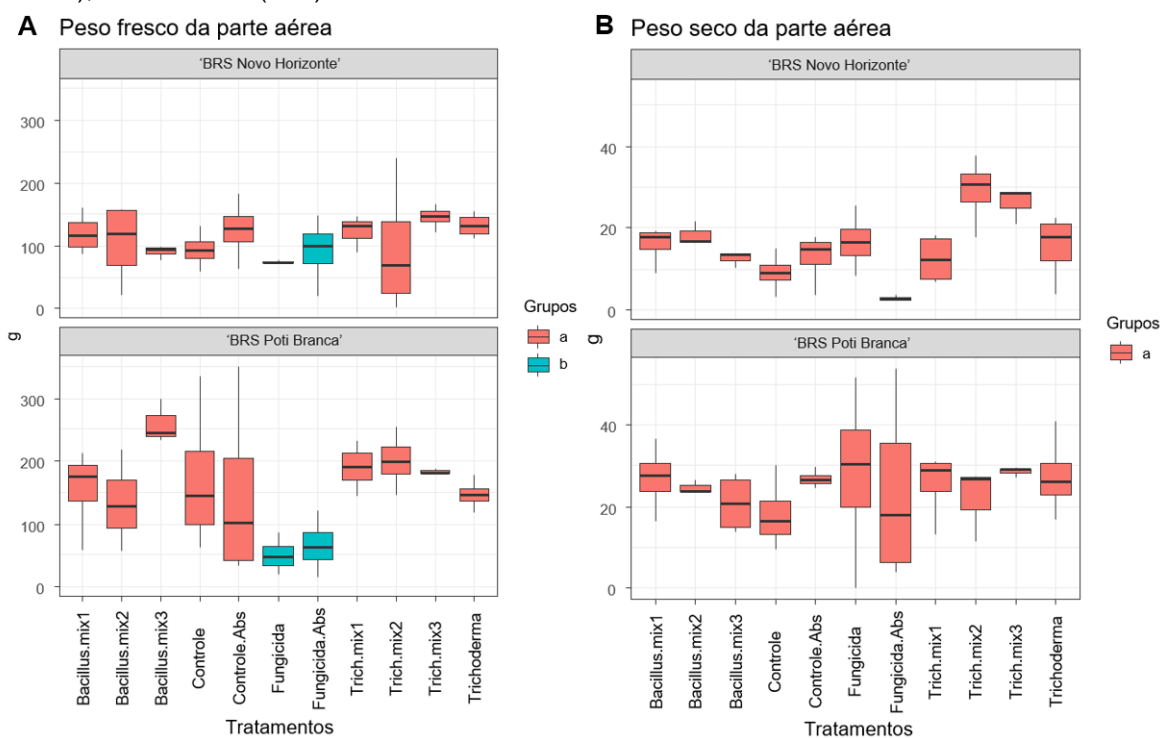
Figura 6. Boxplot das médias agrupadas de podridão radicular, baseadas nos parâmetros avaliados germinação (%) 7 e 15 dias (A) e (B); altura de plantas (cm) 30 e 60 dias (C) e (D); diâmetro do caule (mm) 30 e 60 dias (E) e (F); Número de hastes - 60 dias (G); Vigor de plantas (%) 60 dias (H) em cultivar 'BRS Novo horizonte' e 'BRS Poti branca'. Bacillus mix 1 (T6B1); Bacillus mix 2 (T7B2); Bacillus mix3 (T3F); Controle(T1C); Controle Absoluto% (T2CA); Fungicida (T3F); Fungicida Absoluto (T4FA); Trichoderma + mix1 (T9TB1); Trichoderma + mix 2 (T10TB2); Trichoderma + mix 3 (T11TB3); Trichoderma (T5T).



Para a variável de peso fresco da parte aérea, notou-se que o tratamento de manivas com fungicida, apresentou médias inferiores em relação aos tratamentos de controle e biológico para a variável em ambas as cultivares. Os tratamentos T5T, T8B3, T10TB2 e T11TB3 apresentaram incremento de massa fresca expressivo. Para o peso seco da parte aérea, não houve efeito significativo entre os tratamentos.

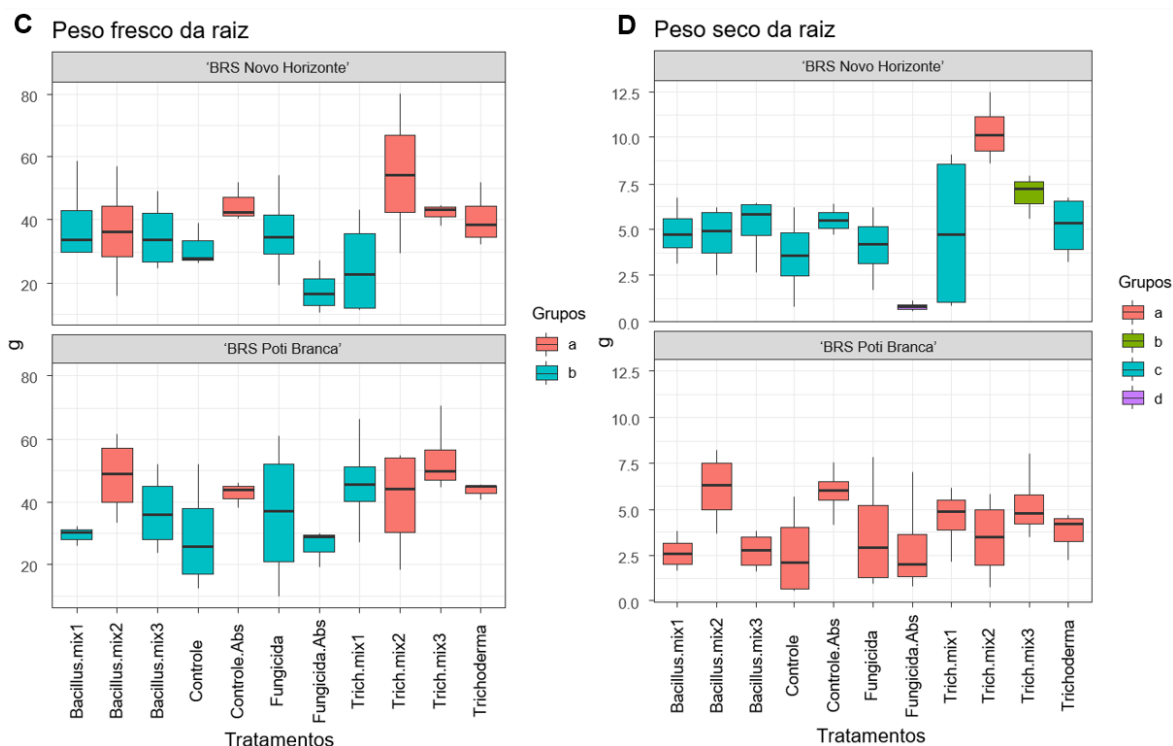
Para peso fresco de raiz, os tratamentos T2CA, T5T, T7B2, T10TB2 e T11TB3, apresentaram médias significativamente superior ao tratamento controle (T1C) e demais tratamentos. Houve incremento de massa seca da raiz na cultivar 'BRS Novo horizonte' para os tratamentos T10TB2 e T11TB3, que diferiram significativamente entre si e entre os demais tratamentos. Para a cultivar 'BRS Poti branca' não houve diferença significativa entre as médias dos tratamentos.

Figura 7. Boxplot das médias agrupadas de podridão radicular, baseadas nos parâmetros peso fresco e seco da parte aérea (g) (A) e (B) e peso fresco e seco da raiz (g) (C) e (D) em cultivar 'BRS Novo horizonte' e 'BRS Poti branca'. Bacillus mix 1 (T6B1); Bacillus mix 2 (T7B2); Bacillus mix3 (T3F); Controle(T1C); Controle Absoluto% (T2CA); Fungicida (T3F); Fungicida Absoluto (T4FA); Trichoderma + mix1 (T9TB1); Trichoderma + mix 2 (T10TB2); Trichoderma + mix 3 (T11TB3); Trichoderma (T5T).



Continuação...

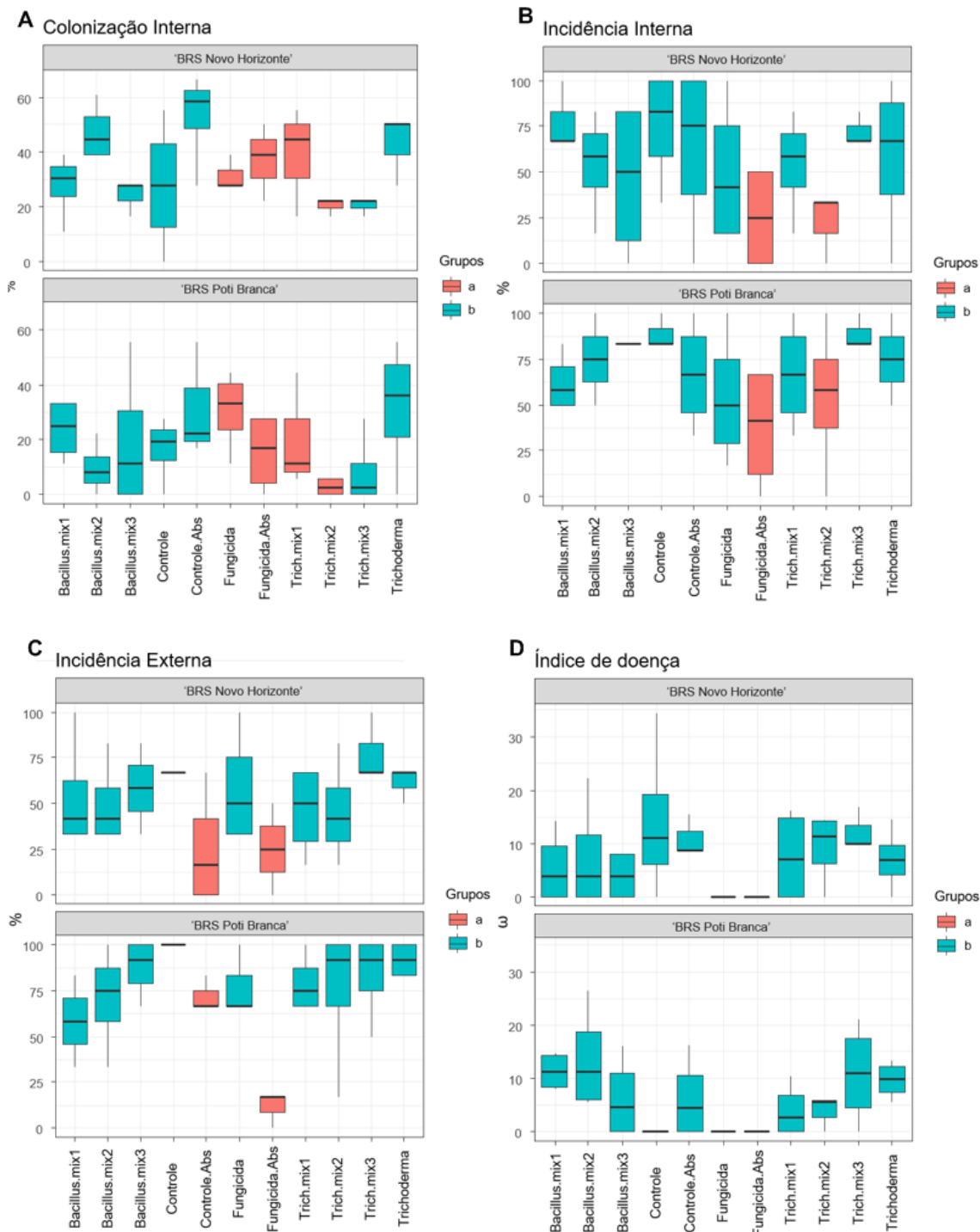
Figura 7. Boxplot das médias agrupadas de podridão radicular, baseadas nos parâmetros peso fresco e seco da parte aérea (g) (A) e (B) e peso fresco e seco da raiz (g) (C) e (D) em cultivar 'BRS Novo horizonte' e 'BRS Poti branca'. Bacillus mix 1 (T6B1); Bacillus mix 2 (T7B2); Bacillus mix3 (T3F); Controle(T1C); Controle Absoluto% (T2CA); Fungicida (T3F); Fungicida Absoluto (T4FA); Trichoderma + mix1 (T9TB1); Trichoderma + mix 2 (T10TB2); Trichoderma + mix 3 (T11TB3); Trichoderma (T5T).



Para as avaliações de parâmetro de colonização e incidência interna de patógenos na maniva, o tratamento T1C apresentou a maior média de presença de patógeno no interior da maniva, os tratamentos com fungicida foram os que menos apresentaram a presença do fungo, seguido dos tratamentos de T9TB1 e T10TB2. Em presença de patógeno na parte externa da maniva, os tratamentos T4FA e T2CA, tiveram as menores médias de incidência do patógeno em sua parte externa, com efeito significativo em relação aos demais tratamentos, que não diferiram entre si nas médias estatísticas, sendo o tratamento T1C o que alcançou a maior média de presença externa do patógeno.

No índice de doença ( $\omega$ ), foi possível confirmar que as plantas tratadas com fungicida registraram médias inferiores quando comparados com os demais tratamentos, T8B3 e T9B1 também apresentaram menor redução do índice do patógeno na cultura. Não houve diferença entre as cultivares nesta variável.

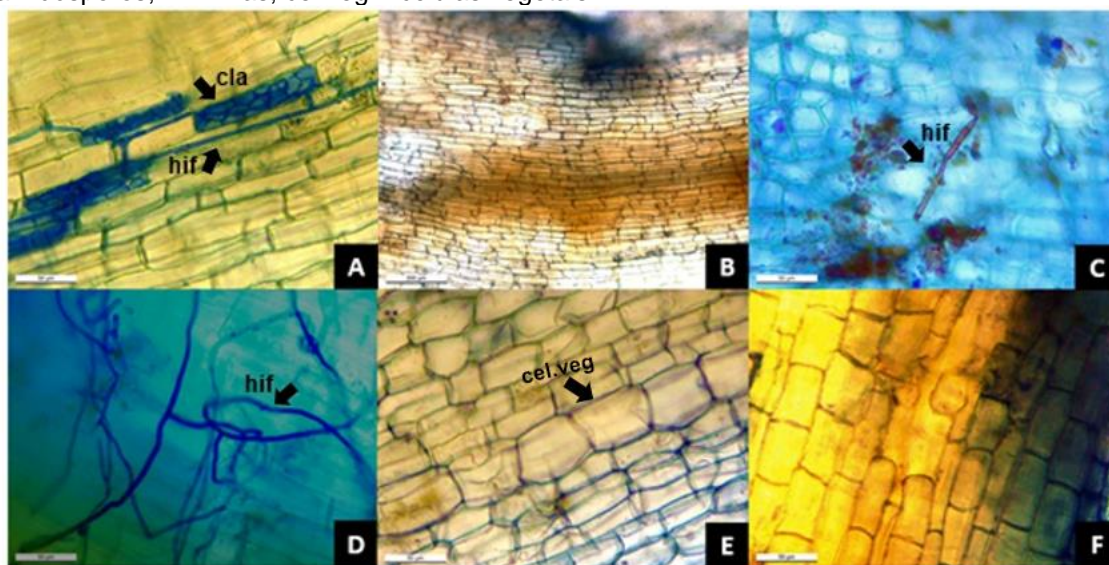
Figura 8. Boxplot das médias agrupadas de podridão radicular, baseadas nos parâmetros Colonização interna; Incidência interna; Incidência externa (%) e Índice de doença ( $\omega$ ) em cultivar 'BRS Novo horizonte' e 'BRS Poti branca'. Bacillus mix 1 (T6B1); Bacillus mix 2 (T7B2); Bacillus mix3 (T3F); Controle(T1C); Controle Absoluto% (T2CA); Fungicida (T3F); Fungicida Absoluto (T4FA); Trichoderma + mix1 (T9TB1); Trichoderma + mix 2 (T10TB2); Trichoderma + mix 3 (T11TB3); Trichoderma (T5T).



### 3.2.1 Clarificação de raízes

Foi possível observar a colonização do fungo através da colonização de raízes, onde a presença de estruturas fúngicas foram encontradas nos tecidos radiculares, na maioria dos tratamentos, com exceção para os tratamentos T3F (Figura 9.B), T4FA (Figura 9.E) e T9TB1 (Figura 9.F). Os tratamentos T1C (Figura 9.A) e T5T (Figura 9.D) foram os que tiveram maior incidência de estruturas fúngicas nos tecidos nos tecidos vegetais.

Figura 9. Coloração de raízes realizada através da clarificação com corante azul de tripan 0,4%. (A) Tratamento Controle (B) Tratamento Fungicida (C) Tratamento *Trichoderma* + mix 2 (D) Tratamento *Trichoderma* (E) Tratamento Fungicida absoluto (F) *Trichoderma* + mix 1. cla = clamidósporos; hif= hifas; cel.veg = células vegetais.



### 3.3 Avaliação da colonização interna das manivas

A avaliação de colonização de patógeno foi positiva para sintomas de podridão negra, confirmando que as mudas já estavam vindo com incidência de patógeno do campo. Os tratamentos utilizados conseguiram conter o avanço do patógeno ao longo da maniva em ambiente controlado. As médias para cultivar Novo horizonte não apresentaram efeito significativo nos tratamentos. Os tratamentos *Trichoderma*, Fungicida e *Bacillus* mix 2 e mix 3 foram eficientes na contenção da colonização interna do patógeno na cultivar Poti branca (Figura 9).

Foi possível constatar o que o material de propagação do complexo das podridões radiculares, já era oriundo de áreas com incidência do patógeno da podridão radicular e é evidente que o tratamento curativo nas manivas desempenhou um papel de contenção do crescimento fúngico pelo tecido interno.

Em avaliação dos parâmetros de incidência interna e externa de patógeno, as médias mostraram que não houve diferença significativa nas médias de



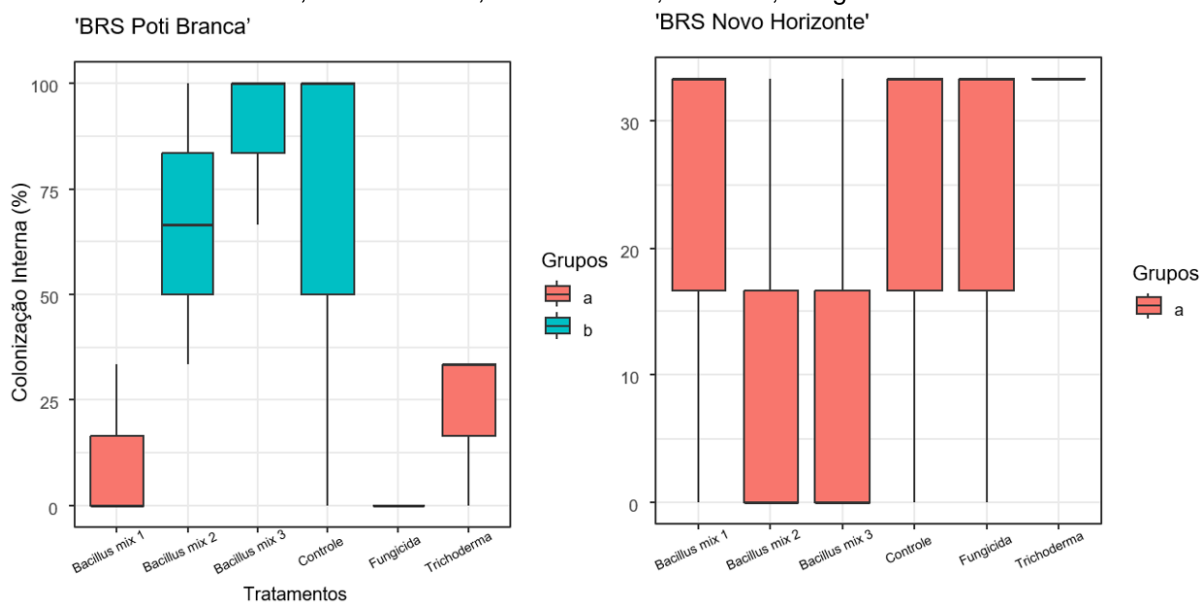
incidência interna, para colonização externa de patógenos, as manivas tratadas com fungicida apresentaram incidência de patógeno significativamente inferior aos demais tratamentos, para a variedade 'BRS Poti branca' não houve diferença entre os tratamentos.

Figura 10. Manivas abertas após avaliação de colonização interna.



Autora: Izis Mello

Figura 11. Boxplot das médias agrupadas de experimento de patogenicidade de manivas, baseadas nos parâmetros colonização interna; (%) em cultivar 'BRS Novo horizonte' e 'BRS Poti Branca'. Bacillus mix 1; Bacillus mix 2; Bacillus mix 3; Controle; Fungicida.



#### 4.0 DISCUSSÃO

A utilização de microrganismos com potencial de crescimento e inibição de doenças de plantas hoje é uma realidade no mercado agrícola, a adoção de



práticas sustentáveis traz uma redução dos danos causados pelo uso excessivo de produtos químicos nas lavouras, fato que hoje vem conferindo maior resistência de doenças a estes produtos. A busca pela alternativa para o uso dos biológicos, visa reduzir a alta incidência ao uso de fungicidas, trazendo uma solução mais ecológica e eficiente ao manejo de doenças. A prática de imersão de manivas em tratamentos com fungos e bactérias com potencial antagônico, bem como sua inoculação no solo confere maior resistência de plantas ao complexo de podridão radicular da mandioca, com redução de infecção do patógeno nas manivas, maior crescimento da planta e menor índice de severidade da doença. A aplicação preventiva em plantas cultivadas em viveiros de dois tipos de agentes de biocontrole, *Bacillus subtilis* e *Trichoderma* spp. sendo usados como tratamentos, induziram redução significativa de doença, quando comparado a tratamento controle (não inoculado), reduzindo a doença murcha de *Fusarium* do tomateiro em 70% (CUCU et al., 2020).

Em experimento na cultura do milho a inoculação de *B. subtilis* em conjunto com *T. asperellum* apresentou resultados significativos em relação a plantas não inoculadas para o parâmetro de massa seca da parte aérea e massa seca total da planta. Os tratamentos inoculados individualmente com cada isolado se diferenciaram na variável de massa seca da raiz comprovando a eficiência dos microrganismos na sua atuação separada ou em conjunto. A mesma inoculação foi testada para outras culturas, como soja, feijão-caupi e arroz foi possível comprovar resultados satisfatórios. Plantas com microrganismos associados as suas raízes ou na rizosfera tendem a ter uma melhor capacidade de sobrevivência e de absorção de nutrientes em situações adversas e conseqüentemente maior vantagem produtiva em relação a culturas não inoculadas, seja elas com *Trichoderma* sp. ou com *Bacillus* sp. (CHAGAS, 2017).

Pesquisas realizadas por Singh et al. (2021), relataram que a compatibilidade e potencial biocontrole das espécies de *T. harzianum* e *B. subtilis*, como uma alternativa para o controle de patógenos do solo, como exemplo do *F. oxysporum* e *F. solani* (SAENGCHAN et al., 2022). A utilização de produto à base de *B. subtilis*, para imersão de pedaços de madeira de borracha é uma alternativa eficaz para o controle do fungo *Lasiodiplodia theobromae*, o que ocorre devido a mecanismos específicos da bactéria em degradar a parede celular do fungo

(SAJITHA; DEV; FLORENCE, 2017) criando dutos capazes de alterar a permeabilidade da célula através de enzimas antifúngicas, produção de antibióticos lipopeptídicos, sendo em alguns casos estas atividades induzida pelo contato com patógeno (ABREU et al., 2022).

A imersão de manivas em suspensão de fungo *Trichoderma* spp. também consistem em uma forma de controle biológico de patógenos eficaz (FAO, 2013). *Trichoderma* sp., tem sido recomendada para no tratamento de ramas e mudas produzidas em laboratório, com aplicação de suspensão de esporos antes do plantio, visando o antagonismo à patógenos radiculares (MACHADO et al, 2018). O uso de *Trichoderma harzianum*, promove aumento de massa de raízes e comprimento de raízes, conseqüentemente aumentando sua produtividade, tornando o microrganismo um promotor de crescimento eficiente para cultura da mandioca. (STENANELLO, 2016).

Além de *Trichoderma* spp., espécies de *Bacillus* spp. através de mecanismos de produção de fitohormônios e metabólitos promovem o crescimento na cultura da mandioca. Suas interações com a planta podem vir a alterar os parâmetros relacionados aos aspectos fisiológicos da planta, como aumento da taxa fotossintética, além dos de seus mecanismos, como exemplo a produção de sideróforos, que favorece a aquisição de nutrientes a planta, o que conseqüentemente vem a incrementar nas características morfológicas, levando a uma tendência de aumento no crescimento de raízes e folhas (FERREIRA et al., 2021).

Relatos indicam que a utilização de agentes de controle biológicos e promotores de crescimento combinados, podem aumentar a supressão de doenças. As combinações dos isolados de *Trichoderma* e *Bacillus*, podem desempenhar um papel importante no manejo integrado de doenças de plantas, bem como um papel na biofertilização. Os dois organismos poderiam, assim, resultar em um possível efeito aditivo, levando a um maior crescimento das plantas e controle biológico (YOBO; LAING; HUNTER, 2011).

Pesquisas realizadas por Freitas, et al., (2018), relatou que bactérias associadas a promoção de crescimento de plantas de mandioca reduziu a

incidência de doenças em plantas cultivadas em casa de vegetação em mais da metade, quando comparados com o controle e reduziram significativamente o crescimento fúngico em testes realizados *in vitro*. Justificando-se o papel concomitante que as bactérias benéficas exercem no biocontrole de patógenos e no crescimento de plantas.

A incidência de doenças no sistema de cultivo, está diretamente ligada a baixa produtividade da cultura, como foi citado por Stefanello et al., (2017), onde a menor incidência de doença permite um melhor desenvolvimento das plantas, devido ao processo fisiológico não ser alterado pela ocorrência de patogênese. Paiva et al., 2022, em trabalhos com patógeno de solo *F. solani*, constatou que plantas que não tiveram redução de parte aérea, foram as mesmas que apresentaram resistência ao patógeno, estando essa redução de parte aérea relacionada com a pressão do patógeno sobre o desenvolvimento das plantas. Plantas de mandioca pulverizadas e irrigadas com isolados de *Bacillus* sp. apresentaram incremento de biomassa fresca, o que é justificado pelo desempenho desses isolados em produzir o ácido-indol-acético – AIA e siderofóros (FERREIRA et al., 2021).

É comprovado que a sobrevivência de genótipos de mandioca, sua altura de plantas e sua produção de parte aérea e raízes frescas estão diretamente ligadas ao índice de doença ( $\omega$ ) de plantas. Onde as plantas com genótipo desenvolvido para resistência de doenças se destacam em relação àquelas mais susceptíveis aos patógenos. (HOHENFELD et al., 2018).

A proteção de plantas também pode estar associada ao uso de fungicidas sistêmicos, possibilitam a proteção de plantas e controle de patógenos em áreas onde eles já estejam estabelecidos, tendo em vista seu modo de ação, ele protege os tecidos da planta ou atuam inibindo órgãos da planta já infestados com a doença, esta ainda é a principal forma de controle químico, visando o manejo de patógenos associados as doenças radiculares, com o objetivo de proteger a planta de infecções ou atuado sob a infecção já instalada no tecido radicular, sem que haja injúrias aos tecidos vegetais e sem afetar a germinação da planta (LEITE & LOPES, 2018).

Julião et al., (2020), relatou pela primeira vez na cultura da mandioca o ingrediente químico Flutriafol apresentando o aumento do teor de clorofila na

planta e apesar do produto não ser recomendado para o controle da doença da podridão radicular, Flutriafol apresentou resultados satisfatórios na contenção da infestação do patógeno da podridão radicular na maniva. (MACHADO et al., 2018).

Por tanto, dentro deste aspecto do uso de biológicos e químicos na contenção de patógenos, podem vir a ser promissores ou não. Tendo em vista que ainda não existem produtos químicos registrados associados ao manejo das podridões radiculares e as condições específicas as quais o agente biológico vai estar exposto, bem como a sua característica de produção de substâncias benéficas. Além disso, o fato da especificidade natural de cada microrganismo, pode vir a ter com a cultura, é de suma importância, visto que seu desempenho irá depender das relações que esse agente vir a estabelecer com seu hospedeiro, sendo esta relação crucial e o que leva a alguns serem eficientes para uma determinada espécie de patógeno/variedade e não para outra e vice-versa (STEFANELLO et al., 2016).

É de suma importância a realização de trabalhos mais profundos com microrganismos de biocontrole, tendo em vista a complexidade e particularidade de cada um em relação ao meio e variedade utilizada no campo, com o objetivo de desenvolver estratégias que facilitem o desenvolvimento de produto específico para cada doença, visto que cada uma se comporta de uma determinada maneira frente a presença de diferentes isolados.

## **5.0 CONCLUSÃO**

A doença podridão negra se mostrou mais resistente aos tratamentos biológicos em relação a podridão seca.

As variedades 'BRS Kiriris' e 'BRS Novo Horizonte', foram as mais susceptíveis ao patógeno e 'BRS Formosa' e 'BRS Poti Branca' mais resistentes.

A imersão de manivas é um tratamento eficiente para redução de severidade da doença da podridão radicular negra e seca.

O fungicida flutriafol, apesar de não ser registrado para doença da podridão radicular, agiu reduzindo a infecção do patógeno na planta.

Houve maior incidência de sintomas para doença da podridão negra, quando comparada com os sintomas da podridão seca.

Os tratamentos de associação de *Bacillus* spp. mais *Trichoderma* spp. auxiliam no crescimento e fortalecimento de plantas de mandioca, conferindo maior resistência ao ataque dos patógenos.

Estes consórcios devem ser explorados de forma mais ampla na cultura, visando o manejo integrado da doença.

## 6.0 REFERÊNCIAS

AB RAHMAN, S. F. S. et al. Emerging microbial biocontrol strategies for plant pathogens. **Plant Science**, v. 267, p. 102–111, 2018.

ABREU, I. D. P. S. et al. Alternativa sustentável de uso da *Bacillus amyloliquefaciens* no biocontrole de fungos fitopatogênicos: uma revisão. **Revista de Ciências Ambientais**, v. 16, n. 1, 2022.

AKROFI S. et al. Prevalence of Cassava Root Disease in the Brong Ahafo Region of Ghana. **Ghana Journal of Horticulture (JHORT)**, v. 12, n. 1, p. 1–13, 2016.

AMBRÓSIO, M. M. Q. et al. Efeito de adubos verdes sobre a podridão radicular de *Fusarium* em meloeiro (*Cucumis melo* L.). **Revista de Ciências Agrárias - Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences**, v. 59, n. 1, p. 39–46, 1 ago. 2016.

BAYATA, A. Review on nutritional value of cassava for use as a staple food. **Sci J Anal Chem**, v. 7, n. 4, p. 83-91, 2019.

BELLÉ, R.; FONTANA, D. Patógenos de solo: principais doenças vasculares e radiculares e formas de controle. **Enciclopédia Biosfera**, v. 15, n. 28, p. 779–803, 2018.

BETTIOL, W. et al. Supressividade a fitopatógenos habitantes do solo. In: **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. 1ed. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, 2009. p.187-204.

BRITO, D. et al. Inibição *in vitro* de patógenos causadores de podridão radicular da mandioca por isolados de *Trichoderma* spp. In: **JORNADA CIENTÍFICA EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA, 12., 2018. Ciência profissional: resumos**. Cruz das Almas, BA: EMBRAPA Mandioca e Fruticultura, 2019. Disponível em: <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/1116050/1/Inibicaoinvitrodepatogenoscausadoresdepodridaoradiculardamandiocapor.pdf>>. Acesso em: 13 de fev. 2020.

CHAGAS, L. F. B. et al. *Bacillus subtilis* e *Trichoderma* sp. no incremento da biomassa em plantas de soja, feijão-caupi, milho e arroz. **Agri-environmental sciences**, v. 3, n. 2, p. 10-18, 2017.

CUCU, M. A. et al. An assessment of the modulation of the population dynamics of pathogenic *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in the tomato rhizosphere by means of the application of *Bacillus subtilis* QST 713, *Trichoderma* sp. TW2 and two composts. **Biological Control**, v. 142, p. 104158, 2020.

CZERMAINSKI, A. B. C. Generalização de um índice de intensidade de infecção em experimentos de avaliação de doenças em plantas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, n. 9, p. 1545–1555, 1999.

FAO. Produzir mais com menos. Mandioca um guia para a intensificação sustentável da produção. **Informe de política**, 2013. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-i2929o.pdf>>. Acesso em: 02 fev. 2021.

FERREIRA, S. DA C. et al. Isolation and characterization of cassava root endophytic bacteria with the ability to promote plant growth and control the in vitro and in vivo growth of *Phytophthium* spp. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 116, p. 101709, 2021.

FREITAS, M. A. et al. Stem inoculation with bacterial strains *Bacillus amyloliquefaciens* (GB03) and *Microbacterium imperiale* (MAIIF2a) mitigates *Fusarium* root rot in cassava. **Phytoparasitica**, v. 47, n. 1, p. 135–142, 2018.

HOHENFELD, C. S. et al. Modelling growth characteristics and aggressiveness of *Neoscytalidium hyalinum* and *Fusarium solani* associated with black and dry root rot diseases on cassava. **Tropical Plant Pathology**, v. 43, n. 5, p. 422–432, 2018.

JULIÃO, E. C. et al. Reduction of brown leaf spot and changes in the chlorophyll a content induced by fungicides in cassava plants. **European Journal of Plant Pathology**, v. 157, n. 2, p. 433–439, 2020.

LEITE, R. I. D. C.; GONÇALVES, L. D. C. Estudo sobre a baixa produtividade do cultivo de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), em decorrência dos insetos de insetos na comunidade Igarapé do Meio, Mocajuba-PA. **Cadernos de Agroecologia**, v. 13, n.1, 2018.

LEITE, I. C. H.; LOPES, U. P. Controle químico de patógenos radiculares. In: **Desafios do Manejo de Doenças Radiculares Causadas por Fungos**. 1ed. Recife: Editora Universitária da Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, v. 11, p. 179-192, 2018.

MACHADO, A. R. et al. Podridões fúngicas de raízes tuberosas no Nordeste brasileiro: etiologia e manejo. In: **Desafios do Manejo de Doenças Radiculares Causadas por Fungos**. Recife: Editora Universitária da Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE. v.11, p. 95–109, 2018.

MATTOS, P. L. P; FARIA, A. R. N.; FERREIRA FILHO, J. R. **Mandioca: o produtor pergunta, a Embrapa responde**. 1ed. Cruz das Almas: Embrapa

Mandioca e Fruticultura Tropical; Brasília, DF: **Embrapa Informação Tecnológica**. 2006. p.183.

PAIVA, G. F. et al. Avaliação de resistência a *Fusarium solani* em genótipos de mandioca. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 9, p. e23911931734–e23911931734, 2022.

PARMAR, A.; STURM, B.; HENSEL, O. Crops that feed the world: Production and improvement of cassava for food, feed, and industrial uses. **Food Security**, v. 9, n. 5, p. 907–927, 2017.

R Core Team (2022). R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria. <<https://www.R-project.org/>>.

RAYMAEKERS, K. et al. Screening for novel biocontrol agents applicable in plant disease management – A review. **Biological Control**, v. 144, p. 104240, 2020.

SAENGCHAN, C. et al. Induced resistance against *Fusarium solani* root rot disease in cassava plant (*Manihot esculenta* Crantz) promoted by salicylic acid and *Bacillus subtilis*. **Acta Agriculturae Scandinavica, Section B — Soil & Plant Science**, v. 72, n. 1, p. 516–526, 2022.

SAJITHA, K. L.; DEV, S. A.; MARIA FLORENCE, E. J. Biocontrol potential of *Bacillus subtilis* B1 against sapstain fungus in rubber wood. **European Journal of Plant Pathology**, v. 150, n. 1, p. 237–244, 2017.

SHAFI, J.; TIAN, H.; JI, M. *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens: a review. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 31, n. 3, p. 446–459, 2017.

SINGH, S. et al. Biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*, *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas fluorescens* against *Meloidogyne incognita*, *Fusarium oxysporum* and *Rhizoctonia solani*. **Indian Phytopathology**, v. 74, n. 3, p. 703-714, 2021.

SOUZA, L. da S.; FIALHO, J. de F. **Cultivo da mandioca para a região do Cerrado**, 2003. Cruz das Almas – EMBRAPA Mandioca e Fruticultura. Versão eletrônica. Disponível em: <[http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mandioca/mandioca\\_cerrados/solos.htm](http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mandioca/mandioca_cerrados/solos.htm)>. Acesso em: 20 jun. 2022.

STEFANELLO, L. et al. Manejo da podridão radicular da mandioca pela combinação de manejo de solo, variedade resistente e controle biológico com *Trichoderma harzianum*. **Raízes e Amidos Tropicais, Botucatu**, v. 13, n. 1, p. 31-45, 2017.

STEFANELLO, L. et al. **Produtividade e controle de podridão radicular na cultura da mandioca (*Manihot esculenta*) com o uso de *Trichoderma* spp.** Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Marechal Cândido

Rondon – Paraná, Brasil, 2016. Dissertação (Mestrado em Agronomia) Disponível em: <<https://tede.unioeste.br/handle/tede/1330>>. Acesso em: 16 mai. 2021.

YOBO, K. S.; LAING, M. D.; HUNTER, C. H. Effects of single and combined inoculations of selected *Trichoderma* and *Bacillus* isolates on growth of dry bean and biological control of *Rhizoctonia solani* damping-off. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 44, p. 8746–8756, 2011.