

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

**CONTROLE BIOLÓGICO DA PODRIDÃO VERMELHA DO SISAL  
(*Agave sisalana* Perrine) COM *Trichoderma* spp. E  
ACTINOBACTÉRIAS.**

**JEFFERSON OLIVEIRA DE SÁ**

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA  
FEVEREIRO – 2013**

CONTROLE BIOLÓGICO DA PODRIDÃO VERMELHA DO SISAL  
(*Agave sisalana* Perrine.) COM *Trichoderma* spp. E  
ACTINOBACTÉRIAS.

**JEFFERSON OLIVEIRA DE SÁ**

Engenheiro Agrônomo

Universidade Federal da Bahia, 2005

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

**Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Ana Cristina Fermino Soares**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
DOUTORADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
CRUZ DAS ALMAS - BAHIA - 2013

## FICHA CATALOGRÁFICA

S111

Sá, Jefferson Oliveira de.

Controle biológico da podridão vermelha do sisal (*Agave sisalana Perrine*) com *Trichoderma* spp. e actinobactérias / Jefferson Oliveira de Sá.\_ Cruz das Almas, BA, 2013.  
133f.; il.

Orientadora: Ana Cristina Fermino Soares.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.

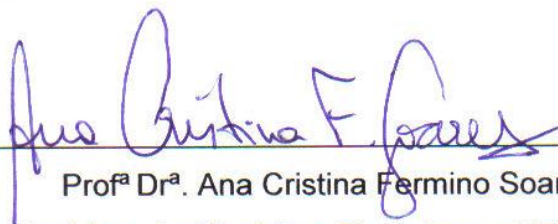
1.Sisal – Controle biológico. 2.Sisal - Fitopatologia.  
I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.

CDD: 633.577

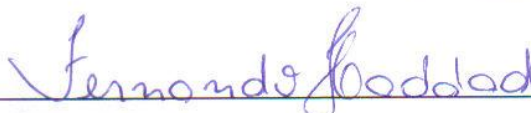
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE TESE DO ALUNO

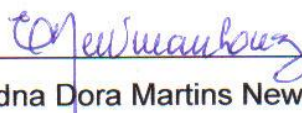
JEFFERSON OLIVEIRA DE SÁ



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



Dr. Fernando Haddad  
Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical



Drª Edna Dora Martins Newman Luz  
CEPLAC



Profª Drª Élide Barbosa Corrêa  
UEPB



Dr. Carlos Alberto Tuão Gava  
Embrapa Semiárido.

Tese homologada pelo Colegiado do Curso de Doutorado em Ciências Agrárias em .....

Conferindo o Grau de Doutor em Ciências Agrárias em .....

A todos amigos e familiares que contribuíram para a minha formação humana e profissional, e que sempre acreditaram que era possível.

**Dedico**

A minha eterna companheira Ádila Melo Vidal, que sempre me acompanha e divide todos os sucessos e dificuldades que encontro durante minha “caminhada”.

**Ofereço**

## AGRADECIMENTOS

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

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

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

Ao Doutor Ricardo Harakava pela identificação molecular dos isolados de *Trichoderma*;

Ao Doutor José Luis Bezerra, e toda sua equipe pela disposição e acolhimento na CEPLAC;

Aos amigos e colegas Augusto, Jurema, Erasto, Carol, Darcilucia, Nailson, Rafael, Adailson, Valter, Eliana, Elianes, Cristiane Patricia, Lidice, Jackeline, Carla, Élide pela ajuda, amizade, força, sugestões e aprendizados;

Aos orientados, parceiros e amigos Rafael, Caroline, Ana Claudia, Cristiano, Filipe e Marcelly pela ajuda;

A todos os técnicos do laboratório de Microbiologia Agrícola da UFRB pela ajuda;

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

Aos colegas do curso de doutorado em ciências Agrárias (turma 2009) e do curso de mestrado em Microbiologia Agrícola pelo convívio e amizade;

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

A Prefeitura Municipal de Conceição do Coité e Ourolândia e todos os funcionários envolvidos, pela disponibilização de área experimental onde os experimentos de campo foram desenvolvidos;

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

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

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

A minha eterna companheira Ádila pelo amor e carinho;

Aos meus irmãos pelo convívio;

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

Aos amigos e colegas do Instituto Federal de Ciência e Tecnologia Baiano *campus* Bom Jesus da Lapa pelo incentivo e apoio;

Ao CNPq pela concessão da bolsa;

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

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

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

Martin Luther King



# SUMÁRIO

Página

RESUMO

ABSTRACT

INTRODUÇÃO.....01

## **Capítulo 1**

BIOCONTROLE DA PODRIDÃO VERMELHA DO SISAL COM *Trichoderma* spp...25

## **Capítulo 2**

BIOCONTROLE DA PODRIDÃO VERMELHA DO SISAL (*Agave sisalana* Perrine)  
COM ACTINOBACTÉRIAS.....63

## **Capítulo 3**

BIOCONTROLE DA PODRIDÃO VERMELHA DO SISAL COM COMBINAÇÕES DE  
ISOLADOS DE *Trichoderma* E ACTINOBACTÉRIAS.....90

CONSIDERAÇÕES FINAIS.....120

# **CONTROLE BIOLÓGICO DA PODRIDÃO VERMELHA DO SISAL (*Agave sisalana* Perrine.) COM *Trichoderma* spp. E ACTINOBACTÉRIAS.**

**Autor:** Jefferson Oliveira de Sá

**Orientadora:** Ana Cristina Fermino Soares

**RESUMO:** A podridão vermelha do sisal tem causado sérios prejuízos às lavouras sisaleiras no semiárido da Bahia. O sisal é uma cultura ainda muito pouco estudada e não existem métodos de controle eficientes, descritos para essa doença. O controle biológico deve ser estudado como um método viável, considerando que esta doença é causada por *Aspergillus niger*, um fungo habitante do solo e, cosmopolita, de difícil controle. O sucesso de *Trichoderma* e de actinobactérias no controle de doenças tem sido observado em culturas de importância econômica. Porém, para o sisal estes estudos são escassos. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de *Trichoderma* spp. e actinobactérias no controle da podridão vermelha do sisal, avaliando-se formulações de *Trichoderma* e misturas entre formulações e actinobactérias. Foram avaliados 55 isolados de *Trichoderma* pertencentes a sete espécies e actinobactérias pré-selecionadas de uma coleção de 54 isolados. No presente estudo, os resultados em laboratório não se repetiram no campo, indicando a influência do ambiente na resposta dos micro-organismos no biocontrole. A eficiência de *Trichoderma* no controle da podridão vermelha do sisal variou com o isolado e as condições edafoclimáticas. Os isolados TCS76 (*Trichoderma harzianum*), TCS43 (*T. Virens*) e TCS09 (*T. Viride*) promoveram redução significativa da doença, nas duas condições avaliadas. Os experimentos realizados com solo e resíduo de sisal demonstraram que os isolados de *Trichoderma* e actinobactérias não são eficientes na redução da população de *A. niger* no solo e o resíduo de sisal não serve para multiplicação e/ou formulação de *Trichoderma*. As actinobactérias crescem no resíduo fresco de sisal, mas não promoveram o controle de *A. niger in vitro* e nem da podridão vermelha em mudas de sisal. O uso combinado de isolados de *Trichoderma* e de actinobactérias ou a combinação de isolados de *Trichoderma* não potencializou o controle da podridão vermelha em mudas de sisal.

**Palavras-chave:** Biocontrole, formulação, *Aspergillus*

# **BIOLOGICAL CONTROL OF SISAL (*Agave sisalana* Perrine) STEM RED ROT DISEASE BY *Trichoderma* spp. AND ACTINOBACTERIA**

**Author:** Jefferson Oliveira de Sá

**Advisor:** Ana Cristina Fermino Soares

**ABSTRACT:** Sisal stem red rot disease has been causing severe damage to sisal fields in the semiarid region of Brazil. There are very few research studies with this crop and disease control methods have not been described in the literature. Biological control strategies should be studied for control of this disease, which is caused by *Aspergillus niger*, a soil fungi, with worldwide distribution, and difficult to control. The success of *Trichoderma* and actinobacteria in biological control studies of plant diseases have been described for several crops of economic importance. However, these studies with sisal are rare. The present work aimed to evaluate the potential of *Trichoderma* spp. and actinobacteria for control of sisal stem red rot disease, with formulations of *Trichoderma* and combinations of these formulations and of actinobacteria strains. A total of 55 *Trichoderma* isolates belonging to seven species, and actinobacteria selected previously from a culture collection of 54 isolates were evaluated. In this study, laboratory results were very different from results obtained in field studies, indicating the environmental influence in the interaction plant-microbe-soil. The efficiency of *Trichoderma* in control of sisal stem red rot disease varied with the isolate and the environmental conditions. *T. harzianum* (isolate TCS76), *T. virens* (isolate TCS43), and *T. viride* (isolate TCS09) promoted a significant reduction in disease incidence and severity, in both environmental conditions. The experiments conducted in soil and sisal residue showed that *Trichoderma* and actinobacteria were not efficient in reducing *A. niger* population in soil. Sisal residue from leaf decortication process, is not an adequate medium for growth and formulation of *Trichoderma* inoculum. Actinobacteria isolates grew in fresh sisal residue, but did not promote control of *A. niger*, under in vitro conditions, nor the control of stem red rot disease in field studies with sisal plants. The use of combined isolates of *Trichoderma* and of actinobacteria did not increase the potential for biocontrol of sisal stem red rot disease.

**Key-words:** Biocontrol, formulations, *Aspergillus*

## INTRODUÇÃO

### A cultura do sisal

O cultivo de sisal (*Agave sisalana* Perrine) representa um importante segmento econômico para a região nordeste brasileira, por promover fontes de renda e emprego em regiões do semiárido, nas quais o clima limita as alternativas agrícolas. O agronegócio do sisal envolve mais de 800 mil pessoas nos estados da Bahia, Paraíba e Rio Grande do Norte, permitindo a geração de empregos diretos e indiretos (CNA, 2010).

O Brasil é o maior produtor de sisal do mundo, com uma produção de 246.535 toneladas por ano, com uma receita proveniente da exportação de fibras que gira em torno de 200 milhões de reais, respondendo por 50% das exportações da fibra no mundo, destinadas principalmente para os Estados Unidos, China, México e Portugal (IBGE, 2011).

A Bahia é o principal estado produtor de sisal no Brasil, contribuindo com cerca de 96% da produção nacional de fibras (IBGE, 2011). A área explorada com sisal já alcançou 300 mil hectares, caiu para 160 mil em 1996 e, atualmente, não ultrapassa 265 mil hectares (IBGE, 2011), concentrando-se nos municípios de Campo Formoso, Santa Luz, Conceição do Coité, Ourolândia, Valente, Jacobina e Queimadas (IDR, 2010).

O sisal é originário da península de Yucatán no México. Adaptou-se às condições edafoclimáticas do Nordeste Brasileiro, onde é cultivado em grandes extensões (SUINAGA et al., 2006). Foi inserido no Brasil no início do século XX, quando os primeiros bulbilhos foram introduzidos na Bahia, em 1903, pelo comendador Horácio Urpia Júnior nos municípios de Madre de Deus e Maragogipe (SANTOS et. al., 2011), propiciando para a região semiárida nordestina o início da atividade sisaleira, o que causou significativas transformações sócio-econômicas e

culturais (GALVÃO, 2004), contribuindo para o surgimento da atual área geográfica denominada Território do Sisal, formada por vinte municípios do semiárido baiano (ALVES et al., 2005; IDR, 2010).

Pelas suas características fisiológicas e agronômicas, o sisal permite que regiões semiáridas, onde são raras as alternativas viáveis economicamente para produção agrícola, tornem-se produtivas (SUINAGA et al., 2006; CONSOLI, 2009).

A planta do sisal pertence à classe das monocotiledôneas, série Liliflórea, família Agavaceae, subfamília Agavoidea, gênero *Agave*, subgênero *Euagave*, espécie *A. sisalana*. O gênero *Agave* compreende aproximadamente 300 espécies nativas das zonas tropicais e subtropicais da América do Norte e América do Sul (MEDINA, 1954). Deste gênero, somente duas espécies se destacam por sua importância comercial para a produção de fibra, *A. sisalana* e *A. fourcroydes* (SILVA et al., 2008).

Por se tratar de uma planta xerófita, suporta secas prolongadas e altas temperaturas (BELTRÃO, 2006). O seu metabolismo fotossintético é do tipo CAM (Metabolismo Ácido Crussuláceo), que permite o uso eficiente da água. Espécies como o sisal utilizam apenas 50 a 100 g de água por grama de fitomassa produzida, contra 300 a 1.000g nas plantas com outras rotas do metabolismo fotossintético (TAIZ; ZEIGER, 2004).

O sistema radicular do sisal é típico das monocotiledôneas, fasciculado, fibroso e em forma de tufo, sem a presença de raiz principal. É subcaulescente, isto é, tem apenas um eixo principal no qual os trofófilos se inserem e armazenam água. As folhas são lanceoladas e lineares, sem pecíolo, podendo atingir mais de dois metros. Esses órgãos, responsáveis pela fotossíntese da planta, apresentam os estômatos em cavidades denominadas criptas, as quais estão alinhadas em forma de alteres, que incrementam a resistência à perda de água, fazendo parte do sistema de controle de umidade interna da planta. O sisal floresce uma única vez, possui flores hermafroditas e a polinização é, em geral, realizada por insetos. Os frutos são cápsulas com cerca de 3 cm de comprimento e 2 cm de diâmetro de cor preta e bastante leves (SILVA et al., 2008; SINDIFIBRAS, 2008).

O ciclo de transformação dos recursos naturais em fios de sisal começa em 3 anos de vida da planta ou quando as folhas atingem até 140 cm de comprimento, o que pode resultar em fibras de 90 a 120 cm. As fibras representam apenas 4 a 5% do peso da folha bruta. As folhas são cortadas a cada 6 meses, durante toda a vida

da planta, que é de 6 a 7 anos. Após esse período, surge a haste (escapo floral), quando a planta completa seu ciclo e morre. O sisal produzido na Bahia tem potencial para suprir o fornecimento de fibra à fábrica de automóveis da Ford, para a substituição parcial da fibra de vidro e de plástico (SANTOS et. al., 2011).

O sisal teve seu apogeu econômico durante a crise do petróleo na década de 60 e 70. Em contrapartida à utilização de fibras sintéticas, existe a demanda por preservação dos recursos naturais e a pressão forte de grupos ambientais, o que tem contribuído para o aumento do uso de fios naturais (SANTOS et. al., 2011).

Apesar da grande relevância econômica e social representada por esta cultura para o Estado da Bahia e para o Brasil, estudos recentes têm mostrado que a Bahia vem experimentando um acentuado declínio na atividade sisaleira, com redução tanto na área plantada quanto na produção. Em 2010 houve uma redução de 12% da produção e 10,5% do valor arrecadado em relação ao ano anterior (IBGE, 2011). Como fatores que contribuíram para esse declínio, dentre outros, têm sido citados o baixo índice de modernização e de aproveitamento da planta, o baixo valor pago pela fibra, a competição com os fios sintéticos, o alto custo inicial de produção, a falta de máquinas modernas para a colheita e beneficiamento, os longos períodos de estiagem e a podridão vermelha do sisal, doença que tem ameaçado a sustentabilidade desta cultura no Brasil (SILVA, 2012a; COUTINHO et al., 2006).

Devido à queda de preços sofrida pelas fibras duras a partir da década de 50, pesquisadores intensificaram os esforços objetivando à obtenção de uma planta que apresentasse as características quantitativas e qualitativas do sisal comum (*Agave sisalana* Perr.), obtendo resultados favoráveis na África ao se cruzarem duas espécies diplóides: *Agave angustifolia* x *Agave amaniensis*, fornecendo, pelo retrocruzamento de seu F1 com *A. amaniensis*, indivíduos de grande interesse, obtendo-se o híbrido 11.648 (ALLEN, 1971; LOCK, 1962). Mesmo assim, esse híbrido não chegou a resolver os problemas de todas as regiões sisaleiras, pois, além de exigente em solo e clima e não ter aceitabilidade pelos produtores, estudos recentes (dados não publicados) tem demonstrado que este híbrido é também suscetível a podridão vermelha do caule.

## A podridão vermelha do sisal

Várias doenças podem afetar o sisal, mas apenas duas foram relatadas até o presente momento no Brasil: a antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum agaves* (MEDINA, 1954), que não se constitui propriamente em um problema fitossanitário de importância econômica, e a podridão vermelha do caule, conhecida também como podridão do tronco do sisal, podridão vermelha do sisal, podridão do cepo, podridão úmida do cepo ou ainda podridão parda do colo (LIMA et al., 1998; COUTINHO et al., 2006; SOARES et al., 2006).

A podridão vermelha afeta a cultura do sisal nas principais áreas produtoras dos Estados da Bahia, Paraíba e Rio Grande do Norte. Na Bahia, a incidência da doença varia entre as regiões de cultivo, sendo que em algumas não ultrapassa 5% da área enquanto que em outras pode alcançar 40% de infestação (ABREU, 2010).

A doença apareceu pela primeira vez no Brasil, no Estado da Paraíba, segundo dados de Machado (1951), citado por Medina (1954). Na Bahia, foi constatada pela primeira vez por pesquisadores da Embrapa Semiárido e EBDA, na fazenda Mandacaru, município de Santaluz - BA, em um plantio comercial de 3.500 hectares de sisal (LIMA et al., 1998). Atualmente, na Bahia tem sido constatado um aumento significativo na incidência da podridão vermelha do caule do sisal, resultando em perdas consideráveis para os produtores (ABREU, 2010).

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

Embora os fungos *Pythium aphanidermatum*, *Lasiodiplodia theobromae* e *Aspergillus niger* tenham sido relatados como causadores de podridões no caule do sisal (BOCK, 1965; LIMA et al., 1998; IKITOO & KHAYRALLAH, 2001), Coutinho et

al., (2006) e Soares et al., (2006) identificaram somente *Aspergillus niger* como o agente causal da podridão vermelha do sisal nos Estados da Paraíba e Bahia. Entretanto, a identificação do patógeno foi feita somente com base em características morfológicas. Atualmente, sabe-se que existem diversas espécies de *Aspergillus* semelhantes e algumas são indistinguíveis de *A. niger* por meio do uso de apenas caracteres morfológicos (GIRAUD et al., 2007). Silva, (2012a) identificou por meio de métodos moleculares que várias espécies da seção Nigri do gênero *Aspergillus* estão associadas a doença. Silva, (2012b) comprovou que *A. japonicus* e *A. terreus* também causam sintomas de podridão vermelha no caule de sisal, em testes de inoculação em condições de casa de vegetação.

*Aspergillus niger* é um fungo mitospórico, pertencente à ordem Moniliales, típico de solo, que sobrevive normalmente como saprófita, podendo causar doenças como a podridão do colo do amendoim, principalmente em solos com baixo teor de matéria orgânica (MORAES; GODOY, 1997). A capacidade de penetração e colonização de *A. niger* depende do estado em que se encontra o hospedeiro. Quando submetidas a algum tipo de estresse, as plantas ficam mais predispostas à infecção. *Aspergillus niger*, agente causador da podridão vermelha no sisal, não penetra em tecidos não injuriados do hospedeiro, necessitando, portanto, de lesões de origem mecânica ou fisiológica (SÁ, 2009).

A presença de células, de paredes altamente lignificadas nas raízes, pode indicar maior proteção contra a penetração de patógenos no sistema vascular do sisal, visto que a lignificação pode proporcionar um aumento na resistência das paredes à ação de enzimas degradadoras, impedirem a difusão de toxinas do microrganismo em direção ao hospedeiro, e restringir a colonização por patógenos (NETO; MARTINS, 2012).

Estudos realizados em mudas de sisal inoculadas com *A. niger*, revelaram que *Aspergillus* coloniza o caule cinco dias após inoculação, sendo que os primeiros sintomas aparecem aos 10 dias, causando a morte das mudas 15 dias após inoculação (SÁ, 2009).

O desenvolvimento de estratégias para o controle da podridão vermelha do sisal faz-se imprescindível para o manejo, expansão e sustentabilidade desta cultura nos Estados da Bahia e Paraíba, no Brasil. Entretanto, não existem registros de produtos químicos, nem outros métodos de controle adequados para esta doença.



## O gênero *Aspergillus*

Os fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* pertencem aos ascomicetos e são muito estudados na área da biotecnologia, no que se refere à secreção de proteínas, degradação de enzimas, efeitos ambientais de translocação de biomassa, processos de fermentação, produção de alimentos, ácido cítrico, glucônico e gálico (SCOTT, 2006). Muitas espécies são encontradas na natureza, vivendo de forma saprófita causando podridão em órgãos vegetais, a exemplo de sementes armazenadas em condições de elevada umidade (FELIX, 2007).

O gênero *Aspergillus* está dividido em seções, sendo a seção Nigri caracterizada por espécies com esporos de coloração preta. *Aspergillus niger* é a espécie da seção Nigri mais relatada na literatura devido a sua utilização em diversos processos biotecnológicos. Ocasionalmente, o nome da espécie *A. niger* tem sido utilizado para qualquer membro da seção Nigri, devido as diferenças morfológicas não serem bem claras (SAMSON et al., 2007; ABARCA et al., 2004). Estudos taxonômicos utilizando métodos moleculares têm dividido o complexo *A. niger* em duas espécies, *A. niger* e *A. tubingensis* (ABARCA et al., 2004).

É um gênero de fungo comum da microbiota do solo que produz enzimas hidrolíticas e oxidativas que degradam a lignocelulose, atuando no ciclo do carbono na natureza (GOMES, 2007). Segundo estudos *in vitro* realizados por AGUIAR et al., (2008), o *A. niger* é produtor de celulasas sob condições nutricionais controladas, apresentando atividade celulolítica nas condições estudadas de pH 5,0 e temperatura de 50°C. As espécies do gênero *Aspergillus* crescem em altas concentrações de açúcar, nutrindo-se de água extraída de substâncias relativamente secas. *A. niger* cresce em ampla faixa de temperatura variando de 6 a 47 °C, sendo a faixa de temperatura ótima de crescimento de 35 a 37 °C. São capazes de crescer em uma faixa de pH extremamente ampla, de 1,4 a 9,8.

Essas habilidades e a produção profusa de conidiósporos, que são dispersos através do ar, asseguram a ocorrência ubíqua da espécie, com uma frequência maior em lugares quentes e úmidos (SCHUSTER et al., 2002).

## Controle biológico de doenças de plantas

Dentre as estratégias de combate a esta doença do sisal, o controle biológico faz-se uma alternativa viável, por apresentar-se menos danoso para o meio ambiente, além de ser uma estratégia bastante utilizada para o controle de micro-organismos habitantes do solo (PEREIRA et al., 2007).

Segundo Zilli et al., (2008) a dificuldade de controle de patógenos presentes no solo por métodos químicos, físicos e culturais é um desafio que demanda alternativas ao produtor. No Brasil, o gênero *Aspergillus* encontra-se amplamente disseminado e o controle deste fungo é difícil devido a sua capacidade de sobreviver saprofiticamente. Neste contexto, o controle biológico deste micro-organismo pode ser uma estratégia promissora como componente do manejo integrado.

Baker e Cook (1974) definem controle biológico como a "redução da densidade de inóculo ou das atividades determinantes da doença provocada por um patógeno ou parasita nos seus estados de atividade ou dormência, por um ou mais organismos, realizado naturalmente ou por meio da manipulação do ambiente, hospedeiro ou antagonista, ou pela introdução em massa de um ou mais antagonistas". Esta mesma definição foi simplificada pelos autores em 1983, ficando: "Controle Biológico é a redução da soma de inóculo ou das atividades determinantes da doença provocada por um patógeno, realizada por ou por meio de um ou mais organismos que não o homem" (COOK; BACKER, 1983).

Na abordagem de controle biológico, doença é mais do que uma íntima interação do patógeno com o hospedeiro, influenciada pelo ambiente. É o resultado de uma interação entre hospedeiro, patógeno e uma variedade de não patógenos que também repousam no sítio de infecção e que apresentam potencial para limitar ou aumentar a atividade do patógeno, ou a resistência do hospedeiro. Portanto, patógeno, hospedeiro e antagonistas, interagindo num sistema biológico, são os fatores componentes do controle biológico (BACKER; COOK, 1974).

O controle biológico do inóculo do patógeno envolve a destruição do inóculo ou a prevenção de sua formação. A proteção biológica da superfície da planta ocorre sobre a planta e agrupa a maior parte dos sucessos recentes do controle biológico pela introdução massal de antagonistas. A indução de resistência ocorre por mecanismos internos da planta, que favorecem o controle de patógenos (PEREIRA et al., 2007).

O controle biológico visa manter, por meio de certas práticas, um equilíbrio no agroecossistema, de modo que o hospedeiro, na presença do patógeno, não sofra danos significativos, em função da ação controladora dos organismos não patogênicos do sistema (BETTIOL; MORANDI, 2009).

Para que um antagonista seja bem sucedido é preciso que ele tenha capacidade de se multiplicar e colonizar a superfície da planta, podendo este atuar por meio de um ou mais mecanismos como a antibiose, competição, micoparasitismo e indução de resistência à planta (BETTIOL; GHINI, 1995).

A antibiose é definida como a interação entre organismos na qual um ou mais metabólitos antibióticos, voláteis ou não-voláteis, são produzidos e secretados pelo fungo antagonista, tendo efeito danoso ao fungo patogênico. A capacidade para produzir tais substâncias e o seu efeito fungicida pode variar entre espécies e entre isolados da mesma espécie (BETTIOL; MORANDI, 2009).

Competição é referente à interação entre dois ou mais organismos empenhados numa mesma ação ou substrato, disputando recursos tais como espaço, nutrientes, água e luz (HARMAN, 2004).

O micoparasitismo refere-se à situação em que o micro-organismo antagonista vive sobre ou dentro do fungo hospedeiro, alimentando-se e desenvolvendo-se às expensas deste (HARMAN, 2004).

A indução de resistência é definida como o mecanismo em que a resistência a um agente patogênico é sistemicamente induzida por uma infecção localizada ou tratamento com produtos microbianos e compostos orgânicos ou inorgânicos de natureza estrutural não relacionada. Durante a interação patógeno-hospedeiro, ocorrem uma série de eventos bioquímicos que levam a ativação de mecanismos de defesa por parte da planta, resultando na produção de compostos que podem ser tóxicos ao fitopatógeno ou apenas restringir o seu desenvolvimento (WRÓBEL-KWIATKOWSKA et al., 2004).

### **O gênero *Trichoderma***

O potencial de *Trichoderma* spp. como agente de biocontrole é conhecido há mais de 60 anos, e muitos isolados são simbioses de plantas e atuam no controle de fitopatógenos (BROTMAN et al., 2010). As espécies do gênero *Trichoderma* estão entre os antagonistas mais estudados, pois são encontradas naturalmente em

quase todos os tipos de solo e agem contra fitopatógenos por diferentes mecanismos de ação como antibiose, micoparasitismo, produção de enzimas degradadoras de parede celular, competição por nutrientes e substrato, promoção do crescimento de plantas e indução de resistência contra diversos patógenos, com efeitos benéficos para as plantas, modificando as condições ambientais e inativando as enzimas do patógeno (VINALE et al., 2008; PERAZZOLLI et al., 2008; SHORESH et al., 2005; VITERBO et al., 2005; BENITEZ et al., 2004; HARMAN et al., 2004).

*Trichoderma* é um fungo anamórfico frequentemente isolado de solos a diferentes temperaturas e, em solos tropicais, pode-se encontrar de 10 a 10<sup>3</sup> Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) por grama de solo (HARMAN et al., 2004).

Linhagens de *Trichoderma* podem atuar por meio de um ou pela ação combinada de vários mecanismos envolvidos no controle de patógenos de plantas. O conhecimento de tais mecanismos é de fundamental importância para o emprego de métodos racionais de biocontrole e, principalmente, para aumentar a vantagem competitiva no ambiente. Espécies de *Trichoderma* são capazes de secretar metabólitos secundários tóxicos a fitopatógenos, sendo que essa característica é variável, dependendo da linhagem (HOWELL, 2003).

O acúmulo de informações quanto à capacidade antagônica e habilidade de colonização e proliferação em diferentes habitats, associado a sistemas de produção massal, formulação e aplicação eficientes, tem levado ao desenvolvimento de produtos estáveis à base de *Trichoderma*, especialmente *T. harzianum* (LIMA, 2002).

Esse hiperparasita é um fungo mitospórico que tem a fase sexuada no Phylum Ascomycota, Classe Euasmycetes, Ordem Hypocreales, Família Hypocreaceae, gênero Hypocrea (MONTE, 2001), sendo as espécies *T. harzianum*, *T. virens*, e *T. viride* as mais utilizadas como agentes de controle biológico de fitopatógenos (HERMOSA et al., 2000).

Desde o trabalho realizado por Weindling e Fawcett (1936), no controle de *Rhizoctonia solani* em citros, diversas linhagens de *Trichoderma* tem sido reportadas como sendo eficientes no controle de doenças de plantas causadas por fungos (AIT-LAHSEN et al., 2001).

O sucesso do *Trichoderma* é devido a sua alta capacidade reprodutiva, habilidade de sobreviver sob condições desfavoráveis, eficiência na utilização de

nutrientes, capacidade de modificar a rizosfera, alta agressividade contra fungos fitopatogênicos, e eficiência em promover o crescimento (BENITEZ et al., 2004), além de estímulo a mecanismos de defesa da planta (YEDIDIA et al, 2001; DE MEYER et al., 1998).

O uso de *Trichoderma* tem sido efetivo contra patógenos radiculares como: nematóide da raiz *Meloidogine javanica* (SHARON et al., 2001), *Pythium* (LIU et al., 2009), *Rhizoctonia* (CÚNDOM et al., 2003), *Phytophthora* (EZZIYYANI et al., 2007) e patógenos da parte aérea, como *Venturia* spp., e *Botrytis* (LISBOA et al., 2007; HJELJORD et al., 2001; MÓNACO et al., 2009), *Moniliophthora perniciosa*, agente causal da vassoura-de-bruxa do cacau (SANOGO et al., 2002), dentre outros.

Também são utilizados no controle de fitopatógenos de produtos de pós-colheita, como tubérculos (OKIBO; IKEDIUGWU, 2000), frutos (BATTA, 2004) e na proteção de sementes (MUTHUKUMAR et al., 2010). No controle de diversas doenças de plantas pode-se usar somente uma espécie de *Trichoderma* como, por exemplo, *Trichoderma harzianum*, ou em combinação com outras espécies do mesmo gênero (OZBAY; NEWMAN, 2004).

Sá (2009), realizou o primeiro trabalho com controle biológico da podridão vermelha do sisal, identificando em laboratório, isolados de *Trichoderma* com potencial para controle de *A. niger*.

Os métodos de produção massal de *Trichoderma* podem ser artesanais, realizados pelos próprios agricultores, ou industriais, com mais tecnologia e complexidade e, talvez com uma maior produtividade, como por exemplo, no uso do método de encapsulação (MAFIA et al., 2003). O gênero *Trichoderma*, apesar das dificuldades em sua classificação, é um fungo de fácil cultivo e de manutenção. A produção tem sido realizada, tanto em meio sólido utilizando arroz parboilizado (GAVA; MENEZES, 2012) como em meio líquido (SANTORO et al., 2005). Há perspectivas de aumento da sua eficiência de cultivo em meio líquido, o que poderá elevar a capacidade de produção desse fungo, bem como da diminuição de custos (SANTORO et al., 2005). Outro aspecto importante se relaciona ao aumento da vida útil dos biofungicidas, com a secagem dos conídios. Há necessidade de realizar a separação dos conídios do substrato e realizar a extração de água, fazendo com que os conídios permaneçam com 5 a 10% de umidade, aumentando assim o tempo de prateleira (MAFIA et al., 2003).

No Brasil, existem produtos à base de *Trichoderma* spp. disponíveis no mercado. Os mais conhecidos e comercializados no Brasil são Trichodermil, contra vários fungos de solo; Biotrich, com ação preventiva contra os gêneros *Rhizoctonia*, *Sclerotinia*, *Fusarium*, *Phytium*, *Phomopsis* e *Rosilinia*; Biomix, utilizado para o controle de Oídio, *Uncinula necator*, em videira; Trichonat EF e Trichonat PM, contra *Botrytis*, *Phytophthora*, *Verticilium*, *Colleotrichum*, *Armillaria*, *Rhizopus*, *Moniliophthora*; Tricovab, controla *Moniliophthora perniciosa*, agente etiológico da vassoura-de-bruxa em cacau (LUCON, 2008).

### **As actinobactérias**

A busca por micro-organismos benéficos, agentes de controle biológico, como alternativa para aumentar a produtividade de plantas e melhorar o seu estado fitossanitário, vem sendo um dos principais objetivos da pesquisa agrícola nas últimas décadas. Dentre estes micro-organismos, as actinobactérias (procariontes gram-positivos) apresentam grande potencial (CARRER FILHO et al., 2009)

Actinobactérias são bactérias Gram-positivas filamentosas. A maioria desse grupo é saprofítica e encontra-se amplamente distribuída no solo (GENILLOUD et al., 2011). Actinobactérias são conhecidas pela sua capacidade de produzir uma grande variedade de enzimas extracelulares e antibióticos, e colonizar plantas (BARAKATE et al., 2002). Possuem aspectos morfológicos e de ciclo celular diferenciados dos demais organismos Gram-positivos. Podem ser aeróbios, microaerófilos ou anaeróbios (LACAZ et al., 2002). Mais recentemente, são classificadas dentro do Filo e da classe Actinobacteria, a qual compreende seis ordens, 39 famílias, 139 gêneros e centenas de espécies. As actinobactérias compartilham duas características: todas são Gram-positivas e apresentam alta razão de guanina/citosina em seu DNA, podendo exceder 70% do total de bases nucleotídicas, variando de 51% em *Corynebacteria* e mais de 70% em *Streptomyces* e *Frankia*. Uma exceção a isso é o genoma do patógeno *Tropheryma whippelii*, com menos de 50% de Guanina+Citosina em seu DNA (BRENNER et al., 2004).

As actinobactérias produzem elementos filamentosos em forma de micélio, semelhantes a hifas fúngicas (OLMOS et al., 2013). Em algumas espécies, reproduzem-se pela formação de esporos, esporangiósporos ou conidiósporos. Os esporos constituem a principal forma de multiplicação e são produzidos em grande

número, cada esporo com potencial de germinação e crescimento, levando ao surgimento de um novo organismo. Embora não sejam resistentes ao calor, os conidiósporos e os esporangiósporos são resistentes às dessecações e podem auxiliar na sobrevivência das espécies durante a estiagem. Em outras espécies, como *Nocardia*, a reprodução ocorre por meio da fragmentação, em que as hifas fragmentam-se em muitas células baciliformes e cocóides, cada uma capaz de formar um novo micélio (VENTURA et.al., 2007).

As actinobactérias colonizam muito bem o solo por meio do desenvolvimento de hifas. São importantes na comunidade rizosférica, região fortemente influenciada pelas raízes que contém uma grande diversidade de micro-organismos do solo (LAUBER et al., 2009), sendo capazes de influenciar no desenvolvimento das plantas e proteger as raízes contra os agentes patogênicos.

Durante o processo de compostagem, as actinobactérias, principalmente as pertencentes ao gênero *Streptomyces*, compõem importante grupo de bactérias do solo, que atuam na degradação de moléculas complexas, especialmente celulose, lignocelulose, xilana e lignina, presentes em abundância na biomassa vegetal (DING et al., 2004; PETROSYAN et al., 2003). Além da atuação na decomposição da matéria orgânica, esses micro-organismos possuem grande potencial como agentes de controle biológico de fitopatógenos (HOSTER et al., 2005), devido à produção de antibióticos, sideróforos e enzimas com ação antimicrobiana, favorecendo também o crescimento das plantas (NASSAR et al., 2003), por meio da produção de fitormônios, sendo reconhecidos como PGPR (rizobactérias promotoras de crescimento de plantas) (MERZAEVA; SHIROKIKH 2006).

Como as actinobactérias produzem compostos bioativos importantes de alto valor comercial, este grupo de micro-organismos vem sendo examinado rotineiramente para novas substâncias bioativas. Cerca de 61% de todos os metabolitos microbianos bioativos foram isolados a partir de actinobactérias (MONCHEVA et al., 2002). Dos antibióticos mais comuns produzidos por micro-organismos do solo, cerca de dois terços pertencem ao gênero *Streptomyces*, tais como, aminoglicósidos, antraciclinas, cloranfenicol, b-lactâmicos, macrólidos e tetraciclinas, entre outros (LEE; HWANG, 2002; DUFOSSE, 2009).

A produção de grande número de compostos anti-microbianos por *Streptomyces* spp. antagonistas a fungos patogênicos estão bem documentados,

mas poucas espécies têm sido implicados no controle biológico de doenças de plantas (BERDY, 2005; BRESSAN, 2003).

Várias espécies de *Streptomyces* foram isoladas e usadas para controlar patógenos de plantas, tais como *Sclerotinia sclerotiorum* que causa podridão no girassol (BANIASADI et al., 2009), *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia rolfsii* que causam o tombamento na beterraba açucareira (SADEGHI et al., 2006; ERRAKHI et al., 2007) e *Pyricularia oryzae* e *R. solani* que causam a brusone e a queima da bainha em arroz (PRABAVATHY et al., 2006); *Rhizoctonia solani* e *Pseudomonas solanacearum* em tomate (PATIL et al., 2011; LEMESSA; ZELLER, 2007), *Fusarium oxysporum* em trigo, e de *Colletotrichum musae*, agente da antracnose em banana (TAECHOWISAN et al., 2003). *S. rochei* controla a podridão radicular de pimenta causada por *Phytophthora* (EZZIYYANI et al., 2007); *S. griseoviridis* controla a podridão radicular e murcha de tomate causada por *Fusarium* (MINUTO et al., 2006); *S. hygroscopicus* age sobre *Colletotrichum gloeosporioides*, agente causal da antracnose de várias culturas (PRAPAGDEE et al., 2008).

Alguns trabalhos demonstram a capacidade de *Streptomyces* spp. em produzir enzimas extracelulares como endoglucanases, o que pode estar relacionado à degradação da parede celular de fitopatógenos como *Phytophthora cinnamomi*, *Phytophthora fragariae*, *Ralstonia solanacearum*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium moniliforme*, *Sclerotium rolfsii* (BOUKAEW et al., 2011; LEMESSA; ZELLER, 2007; MELANDER et al., 2006).

A eficácia dos antagonistas de actinobactérias no controle biológico foi demonstrado contra fungos patogênicos às plantas. Muitas actinobactérias podem controlar fungos fitopatogênicos por diversos mecanismos, tais como hiperparasitismo, antibiose, enzimas degradantes da parede celular, (EL-TARABILY; SIVASITHAMPARAM, 2005) e indução de resistência em plantas (HASSANIN et al., 2007).

Trabalhos sobre a ação de controle biológico por actinobactérias endofíticas são relativamente poucos e incluem a supressão de *Fusarium oxysporum* (CAO et al., 2005), *F. pseudograminearum* (FRANCO et al., 2007), *Verticillium dahliae* (KRECHEL et al., 2002), *Rhizoctonia solani* (CAO et al., 2004; COOMBS et al., 2004), *Plectosporium tabacinum* (EL-TARABILY, 2003), *Gauemannomyces graminis* var. *tritici* (FRANCO et al., 2007; COOMBS et al., 2004) e *Pythium* spp. (EL-TARABILY et al., 2009; FRANCO et al., 2007).



A associação de actinobactérias com plantas confere muitas vantagens as plantas hospedeiras, tais como a produção de fito-hormônios e sideróforos, a fixação de nitrogênio e a proteção contra agentes patogênicos de plantas por meio da produção de antibióticos ou enzimas extracelulares (BAILEY et al., 2006).

O efeito supressivo de micro-organismos agentes de biocontrole é muito afetado pelas condições ambientais. Assim, o uso combinado de diferentes microrganismos no controle biológico pode torná-los mais eficientes, permitindo melhores resultados em campo (GUETSKY et al., 2001).

Isolados de *Trichoderma* spp. obtidos do solo e actinobactérias do resíduo do sisal e do solo, preservados na coleção de culturas de micro-organismos do Laboratório de Fitopatologia e Microbiologia Agrícola da UFRB têm demonstrado efeito antagônico a *A. niger*. Assim, a combinação desses organismos em um inóculo poderá melhorar o potencial de biocontrole da doença em mudas e no campo. Este trabalho teve como objetivo avaliar isolados de *Trichoderma* spp. e actinobactérias, isoladamente e combinados, no controle da podridão vermelha do sisal.

No primeiro capítulo foi avaliado o efeito dos isolados de *Trichoderma* no controle de *A. niger* em experimentos realizados em laboratório, sobre segmentos de caule de sisal. Também se avaliou o efeito supressivo de isolados de *Trichoderma* em diferentes solos com e sem o resíduo de sisal e testou-se uma formulação de *Trichoderma* com adição de protetor solar. Além dos ensaios em laboratório, realizou-se a avaliação *in vivo* do potencial dos isolados de *Trichoderma* no controle da podridão vermelha em mudas de sisal, no campo, em dois municípios da região sisaleira. Adicionalmente, foi avaliada a sobrevivência desses micro-organismos em diferentes solos da região sisaleira e testada a possível utilização do resíduo de sisal como substrato para produção de inóculo desses micro-organismos.

No segundo capítulo avaliou-se o efeito de isolados de actinobactérias no controle de *A. niger*, em experimentos realizados em culturas *in vitro* de *A. niger* e em segmentos de caule de sisal, em condições de laboratório. Também foi avaliado o efeito supressivo das actinobactérias em diferentes solos com e sem o resíduo de sisal e testou-se a possibilidade de multiplicação das actinobactérias no resíduo de sisal. Além dos ensaios em laboratório, realizou-se a avaliação *in vivo* do potencial das actinobactérias no controle da podridão vermelha em mudas de sisal no campo, em dois municípios da região sisaleira.

No terceiro capítulo avaliou-se o efeito de isolados de *Trichoderma* formulados e actinobactérias na supressão de *A. niger* em diferentes solos com e sem o resíduo de sisal e se as misturas entre formulações de *Trichoderma*, a combinação de *Trichoderma* com actinobactérias e a combinação de isolados de actinobactérias potencializam o efeito de biocontrole da podridão vermelha do sisal.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ABREU, K. C. L. de M. **Epidemiologia da podridão vermelha do sisal no Estado da Bahia**. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, 2010.

AGUIAR, C. M., MARGONAR, M. H. L., DE LUCENA, S. L.. Produção de celulases por *Aspergillus niger* e efeito do pH e da Temperatura na hidrólise enzimática de resíduos lignocelulósicos . **In: XVI Encontro de Química da Região Sul (16-SBQSul) FURB**, Resumos... 13 a 15 de novembro de 2008. p. 1 - 6.

AIT-LAHSEN, H.; SOLER, A.; REY, M.; DE LA CRUZ, J.; MONTE, E.; LLOBELL, A. An antifungal exo- $\alpha$ -1,3-glucanase (AGN13.1) from the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum*. **Applied Environmental Microbiology**, v.67, n.12, p.5833-5839, 2001.

ALLEN, D. J. Control of zebra-disease of *Agave* hybrids by breeding for resistance to *Phytophthora* spp. **Pans**. v.17, n.1, p.42-46, 1971.

ALVES, M. O.; SANTIAGO, E. G.; LIMA, A. R. M. **Diagnóstico sócioeconômico do setor sisaleiro do Nordeste brasileiro**. Fortaleza, Banco do Nordeste do Brasil, 2005, (Série Documentos do ETENE nº 04).

BAILEY, B. A.; BAE, H.; STREM, M. D.; ROBERTS, D. P.; THOMAS, S. E.; CROZIER, J. SAMUELS, G. J.; CHOI, I. Y.; HOLMES, K. A. Fungal and plant gene expression during the colonization of cacao seedlings by endophytic isolates of four *Trichoderma* species. **Planta**, v.224, p.1449-1464, 2006.

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

BANIASADI, F.; BONJAR, G H S.; BAGHIZADEH, A.; KARIMI NIK, A.; JORJANDI, M.; AGHIGHI, S.; FAROKHI, P. R. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum*, causal agent of sunflower head and stem rot disease, by use of soil borne actinomycetes isolates. **Agriculture and Biological Sciences**, v.4, p.146-151, 2009.

BARAKATE, M.; OUHDOUCH, Y.; OUFDOU, K.; BEAULIEU, C. Characterization of rhizospheric soil streptomycetes from Moroccan habitats and their antimicrobial activities. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.17, p.49–54, 2002.

BATTA, Y. A. Postharvest biological control of apple gray mold by *Trichoderma harzianum* Rifai formulated in an invert emulsion. **Crop Protection**, v.23, p.19-26, 2004.

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

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

BERDY, J. Bioactive microbial metabolites. **Journl of Antibiotics**, v.58, p.1–26, 2005.

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

BETTIOL, W.; MORANDI, M, A, B. Controle Biológico de Doenças de Plantas no Brasil. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M, A, B.(Eds) **Biocontrole de Doenças de plantas: usos e perspectivas**. Embrapa, 2009, 341p.

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

BOUKAEW, S.; CHUENCHIT, S.; PETCHARAT, V. Evaluation of *Streptomyces* spp. for biological control of *Sclerotium* root and stem rot and *Ralstonia* wilt of chili pepper. **BioControl**, v. 56, p.365-374, 2011.

BRENNER, D. J.; KRIEG N. R.; STALEY J. T. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, v. 2, 2 Ed., Editora Springer, 2004.

BRESSAN, W.. Biological control of maize seed pathogenic fungi by use of actinomycetes. **Biocontrol**. v.48, p.233-240, 2003.

BROTMAN, Y.; GUPTA, K. J.; VITERBO, A. *Trichoderma*. **Current Biology**, v.20, p.R390-R391, 2010.

CAO, L.; QIU, Z.; DAI, X.; TAN, H.; LIN, Y.; ZHOU, S. Isolation of endophytic actinomycetes from roots and leaves of banana (*Musa acuminata*) plants and their activities against *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.20, p.501-504, 2004.

CAO, L.; QIU, Z.; YOU, J.; TAN, H.; ZHOU, S. Isolation and characterization of endophytic streptomycete antagonists of *Fusarium* wilt pathogen from surfacesterilized banana roots. **FEMS Microbiology Letters**, v.247, p.147-152, 2005.

CARRER FILHO, R.; ROMEIRO, R.S.; AMARAL, L.S.; GARCIA, F.A. Potencialidade de um actinomiceto de rizosfera de tomateiro como agente de biocontrole de doenças. Minas Gerais. **Horticultura Brasileira**, v. 27, n.3, 2009.

CNA. **Sisal**: problemas e soluções. Disponível em: <<http://www.cna.org.br>>. Acesso em: 25/01/2010.

CONSOLI, M.A., SCARE, R. F., PINTO, M. J. A. MARKESTRAT. **Plano de Melhoria Competitividade do APL dos Fornecedores da Indústria Automotiva**. Ribeirão Preto, 2009, p.119.

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

COOMBS, J. T.; MICHELSEN, P. P.; FRANCO, C. M. M.. Evaluation of endophytic actinobacteria as antagonists of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* in wheat. **Biological Control**, v.29, p.359-366, 2004.

COUTINHO, W. M.; LUZ, C. M.; SUASSUNA, N. D.; SILVA O. F. E.; SUINAGA, F. A. **A podridão vermelha do tronco do Sisal**, Embrapa, 2006.

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

DE MEYER, G.; BIGIRIMANA, J.; ELAD, Y.; HOFTE, M. Induced systemic resistance in *Trichoderma harzianum* T39 biocontrol of *Botrytis cinera*. **European Journal of Plant Pathology**, v.104, p.279-286, 1998.

DING, C. H.; JIANG, Z. Q.; LI, X. T.; LI, L. T.; KUSAKABE, I. High activity xylanase production by *Streptomyces olivaceoviridis* E-86. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v.20, p.7-10, 2004.

DUFOSSE, L. Pigments, Microbial. In: Schaechter, M. (Ed). **Encyclopedia of microbiology**, 3 ed. Academic, Oxford, 2009.

EL-TARABILY, K. A.; NASSAR, A. H.; HARDY, G. E. ST J.; SIVASITHAMPARAM, K. Plant growth promotion and biological control of *Pythium aphanidermatum*, a pathogen of cucumber, by endophytic actinomycetes. **Journal of Applied Microbiology**, v.106, p.13-26, 2009.

EL-TARABILY, K. A.; SIVASITHAMPARAM, K. Non-streptomycete actinomycetes as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. **Soil Biology and Biochemistry**, v.38, p.1505–1520, 2005.

EL-TARABILY, K. A. An endophytic chitinase-producing isolate of *Actinoplanes missouriensis*, with potential for biological control of root rot of lupin caused by *Plectosporium tabacinum*. **Australian Journal of Botany**, v.51, p.257-266, 2003.

ERRAKHI, R.; BOUTEAU, F.; LEBRIHI, A.; BARAKATE, M. Evidences of biological control capacities of *Streptomyces* spp against *Sclerotium rolfsii* responsible for damping-off disease in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). **Microbiology and Biotechnology**, v.23, 1503-1509, 2007.

EZZIYYANI, M.; REQUENA, M. E.; EGEA-GILABERT, C.; CANDELA, M. E. Biological control of phytophthora root rot of pepper using *Trichoderma harzianum* and *Streptomyces rochei* in combination. **Phytopathology**, v.155, p.342–349,2007.

FELIX, A. A. A.. **Identificação e desenvolvimento de técnica alternativa de controle de fungos em sementes utilizadas no artesanato**. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia). Universidade de Brasília. Brasília, 2007. p. 88.

FRANCO, C. M. M.; MICHELSEN, P.; PERCY, N.; CONN, V.; LISTIANA, E.; MOLL, S.; Actinobacterial endophytes for improved crop performance. **Australian Journal of Plant Pathology**, v.36, p.524–531, 2007.

GALVÃO, A. **Valente, estrela do semi-árido**. Clio, 2004.

GAVA, C. A. T.; MENEZES, M. E. L. Eficiência de isolados de *Trichoderma* spp no controle de patógenos de solo em meloeiro amarelo. **Revista Ciência Agronômica**, v.43, n.4, 2012.

GENILLOUD, O.; GONZA´LEZ, I.; SALAZAR, O.; MARTI´N, J.; TORMO, J. R.; VICENTE, F. Current approaches to exploit actinomycetes as a source of novel natural products. **Journal of Indian Microbiology and Biotechnology**, v.38, p.375-389, 2011.

GIRAUD, F., DUPONT, J., HAON, M., BOUZID, O., ALIBEU, O., NAVARRO, D., SAGE, L., SIGLE-MURANDI, F., ASTHER, M., LESAGE-MEESSEN, L. Phylogenetic analysis of the *Aspergillus niger* aggregate in relation to feruloyl esterase activity. **Research in Microbiology**, v.158, 413-419, 2007.

GOMES, D. N. F. **Diversidade e potencial biotecnológico de fungos filamentosos isolados do manguezal Barra das Jangadas, Jaboatão dos Guararapes, Pernambuco**. Tese (Doutorado em Biologia dos Fungos), Universidade Federal de Pernambuco: Pernambuco, 2007. 114p.

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

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

HERMOSA, M. R.; GRONDONA, I.; ITURRIAGA, E. A.; DIAZ-MINGUEZ, J. M.; CASTRO, C.; MONTE, E.; GARCIA-ACHA, I. Molecular characterization and

identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. **Applied Environmental Microbiology**, v.66, p.1890-1898, 2000.

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

HOSTER, F.; SCHMITZ, J.E.; DANIEL, R. Enrichment of chitinolytic microorganisms: isolation and characterization of schitinase exhibiting antifungal activity against phytopathogenic fungi from a novel *Streptomyces* strain. **Applied Microbiology Biotechnology**, Berlim, v.66, p.434-442, 2005.

HOWELL, C. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolutions of current concepts. **Plant Disease**, v.87, n.1, p. 4-10, 2003.

IBGE, 2011. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Levantamento Sistemático da produção agrícola, agosto de 2011.

IDR (Instituto de desenvolvimento da região do sisal). **Cadeia Produtiva de Sisal**. Disponível em:< <http://www.idrsisal.org.br/sisal/17.php>> Acesso em: 20/08/2010.

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

KRECHEL, A.; FAUPEL, A.; HALLMANN, J.; ULRICH, A.; BERG, G. Potato associated bacteria and their antagonistic potential towards plant-pathogenic fungi and the plantparasitic nematode *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood. **Canadian Journal of Microbiology**, v.48, p.772–786, 2002.

LACAZ, C. S.; PORTO, E. ; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACCARI, E. M.; MELO, N. T. **Tratado de Micologia Médica**, 9. ed. São Paulo: Sarvier Editora de Livros Médicos, 2002.

LAUBER, C. L.; HAMADY, M.; KNIGHT, R.; FIERER, N. Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. **Applied and Environmental Microbiology**, v.75, p.5111–5120, 2009.

LEE, J. Y.; HWANG, B. K. Diversity of antifungal actinomycestes in various vegetative soils of Korea. **Canadian Journal of Microbiology**, v.48, p.407-417, 2002.

LEMESSA, F.; ZELLER, W. Screening rhizobacteria for biological control of *Ralstonia solanacearum* in Ethiopia. **Biological Control**, v.42, p.336-344, 2007.

LIMA, E. O.. Plantas e suas propriedades antimicrobianas: uma breve análise histórica, p. 482-501. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**, Chapecó: Argros, 2002.

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

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

LIU, J. B.; GILARDI, G.; GULLINO, M. L.; GARIBALDO, A. Effectiveness of *Trichoderma* spp. obtained from re-used soilless substrates against *Pythium ultimum* on cucumber seedlings. **Journal of Plant Disease Protection**, v.116, p.156-163, 2009.

LOCK, G. W. **Sisal**. London, Spottiswoode, Ballantyne, 1962. 355p.

LUCON, C. M. M.; **Trichoderma no controle de doenças de plantas causadas por patógenos de solo**. 2008. Disponível em: < [http://www.biologico.sp.gov.br/artigos\\_ok.Php?id\\_artigo=77](http://www.biologico.sp.gov.br/artigos_ok.Php?id_artigo=77)> Acesso em: 08/01/2013.

MAFIA, R.; ALFENAS, A. C.; MAFFIA, L. A.; VENTURA, G.; SANFUENTES, E. A. Encapsulamento de *Trichoderma inhamatum* para o controle biológico de *Rhizoctonia solani* na propagação clonal de Eucalyptus. **Fitopatologia brasileira**, 28, n.1, p.101-105, 2003.

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

MELANDER, C.; ADDEN, R.; BRINKMALM, G.; GORTON, L.; MISCHNICK, P.. New approaches to the analysis of enzymatically hydrolyzed methyl cellulose. Part 2. Comparison of various enzyme preparations. **Biomacromolecules**, v.7, p.1410-1421, 2006.

MERZAEVA, O. V.; SHIROKIKH I. G. Colonization of plant rhizosphere by actinomycetes of different genera. **Microbiology**, v.75, p.226–230, 2006.

MINUTO, A.; SPADARO, D.; GARIBALDI, A.; GULLINO, M. L. Control of soilborne pathogens of tomato using a commercial formulation of *Streptomyces griseoviridis* and solarization. **Crop Protection**, v. 25, p.468-475, 2006.

MÓNACO, C.; DAL BELLO, G.; ROLLÁN, M. C.; RONCO, L.; LAMPUGNANI, G. Biological control of *Botrytis cinerea* on tomato using naturally occurring fungal antagonists. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v.42, p.729-737, 2009.

MONCHEVA, P.; TISHKOV, S.; DIMITROVA, N.; CHIPEVA, V.; NIKOLOVA, S. A.; BOGATZEVSKA, N. Characteristics of soil actinomycetes from Antarctica. **Journal of Cultural Collection**, v.3, p.3–14,2002.

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

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

MUTHUKUMAR, A.; ESWARAN, A.; NAKKEERAN, S.; SANGEETHA, G. Efficacy of plant extracts and biocontrol agents against *Pythium aphanidermatum* inciting chilli damping-off. **Crop Protection**, v.29, p.1483-1488, 2010.

NASSAR, A. H.; EL-TARABILY, K. A.; SIVASITHAMPARAM, K. Growth promotion of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by a polyamineproducing isolate of *Streptomyces griseoluteus*. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v.40, p.97-106, 2003.

NETO, I. L. da C.; MARTINS, F. M. Anatomia dos órgãos vegetativos de *Agave sisalana* Perrine ex Engelm (agavaceae). **Revista Caatinga**, Mossoró, v.25, n.2, p. 72-78, 2012

OKIGBO, R. N.; IKEDIUGWU, F. E. O. Studies on biological control of postharvest rot in yams (*Dioscorea* spp.) using *Trichoderma viride*. **Journal of Phytopathology**, v.148, p.351-355, 2000.

OLMOS, E.; MEHMOOD, N.; HAJ HUSEIN, L.; GOERGEN, J. L.; FICK, M.; DELAUNAY, S. Effects of bioreactor hydrodynamics on the physiology of *Streptomyces*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, V.36, n.3, p.259-272, 2013

OZBAY, N.; NEWMAN, S. E. Biological control with *Trichoderma* spp. With emphasis on *T. harzianum*. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v.7, n.4, p.478-484, 2004.

PATIL H. J.; SRIVASTAVA, A. K.; SINGH, D. P.; CHAUDHARI, B. L.; ARORA, D. K. Actinomycetes mediated biochemical responses in tomato (*Solanum lycopersicum*) enhances bioprotection against *Rhizoctonia solani*. **Crop Protection**, v.30, p.1269-1273, 2011.

PERAZZOLLI, M.; DAGOSTIN, S.; FERRARI, A.; ELAD, Y.; PERTOT, I. Induction of systemic resistance against *Plasmopara viticola* in grapevine by *Trichoderma harzianum* T39 and benzothiadizole. **Biological Control**, v.47, p.228-234, 2008.

PEREIRA, A, I, A; CURVÊLO, C. R. S; BANDEIRA, C. M. **Controle Biológico na Agricultura: Fundamentos e Aplicações**. UFPB, Areia-PB, 2007, 175p.



PETROSYAN, P.; GÁRCIA-VARELA, M.; LUZ-MADRIGAL, A.; HUITRÓN, C.; FLORES, M.E. *Streptomyces mexicanus* sp., a xylanolytic micro-organism isolated from soil. **Internacional Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.53, p.269-273, 2003

PRABAVATHY, V. R.; MATHIVANAN, N.; MURUGESAN, K. Control of blast and sheath blight diseases of rice using antifungal metabolites produced by *Streptomyces* sp. PM5. **Biological Control**, v.39, p.313-319, 2006.

PRAPAGDEE, B.; KUEKULVONG, C.; MONGKOLSUK, S. Antifungal potential of extracellular metabolites produced by *Streptomyces hygroscopicus* against phytopathogenic fungi. **Journal of Biological Science**, v.4, p.330-337, 2008.

SÁ, J. O. de. **Patogênese de *Aspergillus niger* e biocontrole da podridão vermelha do sisal por *Trichoderma* spp.**, 2009. 53 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2009.

SADEGHI, A.; HESSAN, A. R.; ASKARI, H.; AGHIGHI, S.; BONJAR, G. H. S. Biological control potential of two *Streptomyces* isolates on *Rhizoctonia solani*, the causal agent of damping-off of sugar beet. **Journal of Biological Science**, v.9, p.904-910, 2006.

SAMSON R. A.; NOONIM P.; MEIJER M.; HOUBRAKEN J.; FRISVAD J. C.; VARGA, J. Diagnostic tools to identify black aspergilli. **Studies in Mycology**, v.59, p.129-145, 2007

SANOGO, S., POMELLIA, A., HEBBAR, P. K., BAILEY, B., COSTA, J. C. B., SAMUELS, G. J.; LUMSDEN, R. D. Production and germination of conidia of *Trichoderma stromaticum*, a mycoparasite of *Crinipelis perniciosa* on cacao. **Phytopathology**, v.92, n.10, p.1032-1037, 2002.

SANTORO, P. H.; NEVES, P. M. O. J; SILVA, R. Z; AKIMI, S; ZORZETTI, J. Produção de esporos de *Beauveria bassiana* (Bals). Vuill. num processo bifásico utilizando diferentes meios líquidos. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.26, n.3, p.313-320, 2005.

SANTOS, W. N. L. dos; CAVALCANTE, D. D.; DA SILVA, E. G. P.; DAS VIRGENS, C. F.; DIAS, F. S. Biosorption of Pb(II) and Cd(II) ions by *Agave sisalana* (sisal fiber). **Microchemical Journal**, v.97, p.269-273, 2011.

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

SCOTT E. B. *Aspergillus niger* genomics: Past, present and into the future. **Medical Mycology**, v.44, p.17-21, 2006.

SHARON, E.; BAR-EYAL, M.; CHET, I.; HERRARA-ESTRELLA, A.; KLEIFELD, O.; SPIEGEL, Y. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. **Biological Control**, v.91, n.7, p.687-693, 2001.

SHORESH, M.; YEDIDIA, I.; CHET, I. Involvement of jasmonic acid/ethylene signaling pathway in the systemic resistance induced in cucumber by *Trichoderma asperellum* T203. **Phytopathology**, v.95, p.76-84, 2005.

SILVA, J. R. Q. **Agente etiológico da podridão vermelha do sisal: Densidade populacional, sobrevivência, caracterização genética e de agressividade**. 2012. 98 f. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2012a.

SILVA, M. H. S. da. **Aspectos bioecológicos de *Aspergillus niger*, fungo causador da podridão vermelha do sisal**, 2012. 86 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2012b.

SILVA, O. R. R. F. DA; COUTINHO, W. M.; CARTAXO, W. V.; SOFIATTI, V. SILVA FILHO, J. L.; CARVALHO, O. S.; COSTA, L. B. da **Cultivo do Sisal no Nordeste Brasileiro**, Circular Técnica n. 123, Embrapa, Campina Grande, PB, julho, 2008.

SINDIFIBRAS. **A revolução do sisal na fabricação de compósitos e na geração de emprego e renda na Bahia**. 2008. Disponível em: <<http://www.brazilianfibres.com.br/?p=774>>. Acesso em 20/12/2011.

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

SUINAGA, F. A.; SILVA, O. R. F. da; COUTINHO, W. M. **Cultivo do sisal na região semiárida do Nordeste brasileiro**. Embrapa Algodão. Sistemas de Produção, 2006.

TAECHOWISAN, T.; PEBERDY, J. F.; LUMYONG, S. Isolation of endophytic actinomycetes from selected plants and their antifungal activity. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.19, p.381–385, 2003.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Porto Alegre, Artmed, 2004.

VENTURA, M.; CANCHAYA, C.; CHANDRA, G.; FITZGERALD, G. F.; CHATER, K. F.; SINDEREN, D. Genomics of Actinobacteria: Tracing the evolutionary History of an Ancient Phylum. **Microbiology And Molecular Biology Reviews**, v.71, n. 3, p.495–548, 2007.

VINALE, F.; SIVASITHAMPARAM, K.; GHISALBERT, E.L.; MARA, R.; BARBETTI, M.J.; LI, H.; WOO, S.L.; LORITO, M. A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.72, p.80-86, 2008.

VITERBO, A.; HAREL, M.; HORWITZ, B.A.; CHET, I.; MUKHERJEE, P. K. *Trichoderma* mitogen-activated protein kinase signaling is involved in induction of

plant systemic resistance. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, p.6241-6246, 2005.

WRÓBEL-KWIATKOWSKA, M.; LORENC-KUKULA, K.; STARZYCKI, M.; OSZMIANSKI, J.; KEPCZYNSKA, E.; SZOPA, J. Expression of  $\beta$ -1,3-glucanase in flax causes increased resistance to fungi. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.65, p.245-256, 2004.

YEDIDIA, I.; SRIVASTVA, A. K.; KAPULNIK, Y.; CHET, I. Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and growth of cucumber plants. **Plant and Soil**, v.235, p.235-242, 2001.

ZILLI, J. E.; XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N. G. **BR 3262: Nova estirpe de *Bradyrhizobium* para a Inoculação de feijão-caupi em Roraima**. Boa Vista, Embrapa Roraima, 2008. 07p.

# CAPÍTULO 1

## BIOCONTROLE DA PODRIDÃO VERMELHA DO SISAL COM *Trichoderma* spp.<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup> Artigo a ser ajustado e submetido ao comitê editorial do periódico científico Scientia Agricola

## BIOCONTROLE DA PODRIDÃO VERMELHA DO SISAL COM *Trichoderma* spp.

**Autores:** Jefferson Oliveira de Sá; Ana Cristina Fermino Soares; Rafael Mota da Silva; Caroline Lopes Damasceno, Ricardo Harakava

**RESUMO:** A cultura do sisal (*Agave sisalana* Perrine) tem grande importância para a região semiárida nordestina. Entretanto, a podridão vermelha do sisal causada por *Aspergillus niger* tem causado perdas consideráveis à cultura, sendo o controle biológico com *Trichoderma* spp. uma alternativa. O objetivo do trabalho foi avaliar isolados de *Trichoderma* spp. no controle da podridão vermelha do sisal em dois municípios; sua sobrevivência em diferentes solos e a utilização do resíduo de sisal, do desfibramento das folhas, e arroz como substrato para produção e formulação de inóculo com protetor solar. Foram avaliados 55 isolados de *Trichoderma*, identificados em sete espécies: *T. longibrachiatum*; *T. saturnisporum*; *T. erinacium*; *T. virens*; *T. harzianum* e duas espécies próximas a *T. atroviride* e a *T. viride*. Foi observado antagonismo entre *Trichoderma* e *A. niger*. *Trichoderma viride* (isolado TCS09), *T. virens* (isolados TCS28, TCS39, TCS43) e *T. harzianum* (isolado TCS35) promoveram o controle da podridão vermelha do sisal em mudas inoculadas nas condições de Conceição do Coité-BA, com reduções na incidência de 70%, 80%, 80%, 70% e 80%, respectivamente. Em Ouralândia-Ba, *T. harzianum* (isolados TCS76, TCS45, TCS30, TCS06, TCS42 e TCS10), *T. longibrachiatum* (isolado TCS15), *T. erinaceum* (isolados TCS19, TCS73, TCS75) e *T. viride* (isolado TCS14) controlaram a podridão vermelha do sisal, com reduções na incidência de 87,5%, 25%, 37,5%, 37,5%, 62,5%, 37,5%, 50%, 62,5%, 50%, 62,5%, 25%, respectivamente. *Trichoderma* spp. não reduziu a população de *A. niger* em dois tipos de solo da região sisaleira e não multiplicaram bem no resíduo de sisal. O arroz foi o melhor substrato para preparo de inóculo de *Trichoderma*. A formulação com protetor solar não foi eficiente, sendo o resíduo de sisal prejudicial ao desenvolvimento de *Trichoderma*, havendo efeito do protetor solar por apenas uma hora.

**Palavras-chave:** *Aspergillus niger*; *Agave sisalana*; formulações.

## BIOCONTROL OF SISAL STEM RED ROT DISEASE WITH *Trichoderma* spp.

**Author:** Jefferson Oliveira de Sá; Ana Cristina Fermino Soares; Rafael Mota da Silva; Caroline Lopes Damasceno; Ricardo Harakava

**ABSTRACT:** Sisal (*Agave sisalana* Perrine) is an important crop for the semiarid region of the Northeastern region of Brazil. However, sisal stem red rot disease caused by *Aspergillus niger* has brought considerable losses to this crop. Biological control with *Trichoderma* can be an alternative for control of this disease. This work aimed to evaluate *Trichoderma* isolates for control of sisal red rot disease in two municipalities in Bahia State, to evaluate its survival in different soils and the use of sisal residue from leaf decortication, and use of rice, for production and formulation of *Trichoderma* inoculum with chemical protection for solar radiation. A total of 55 *Trichoderma* isolates were identified as belonging to seven species: *T. longibrachiatum*; *T. saturnisporum*; *T. erinacium*; *T. virens*; *T. harzianum*, two species close to *T. atroviride*, and one specie close to *T. viride*. Antagonism between *Trichoderma* and *A. niger* was observed. *Trichoderma viride* (isolate TCS09), *T. virens* (isolates TCS28, TCS39, and TCS43), and *T. harzianum* (isolate TCS35) promoted control of sisal stem red rot disease in plants inoculated in the environmental conditions of Conceição do Coité-BA, with reductions of in disease incidence of 70%, 80%, 80%, 70%, and 80%, respectively. In Ourolândia, Bahia, *T. harzianum* (isolates TCS76, TCS45, TCS30, TCS06, TCS42, and TCS10), *T. longibrachiatum* (isolate TCS15), *T. erinaceum* (isolates TCS19, TCS73, and TCS75), and *T. viride* (isolate TCS14) promoted control of sisal stem red rot disease, with reductions in disease incidence of 87.5%, 25%, 37.5%, 37.5%, 62.5%, 37.5%, 50%, 62.5%, 50%, 62.5%, and 25%, respectively. *Trichoderma* did not cause a reduction in population of *A. niger* in two soils from sisal fields and did not grow well on sisal residue. Rice was the best growth substrate for production of *Trichoderma* inoculum. The formulation with chemical solar protection was not efficient, and gave protection for only one hour. Sisal resíduo inhibited *Trichoderma* growth.

**Keywords:** *A. niger*; *Agave sisalana*; biological control.

## INTRODUÇÃO

O cultivo de sisal representa um importante segmento econômico para o Nordeste, pois constitui fonte de renda e emprego em regiões do semiárido, nas quais o clima limita as alternativas agrícolas. O agronegócio do sisal envolve mais de 800 mil pessoas nos estados da Bahia, Paraíba e Rio Grande do Norte, permitindo a fixação do homem no campo e evitando o êxodo rural (CNA, 2010).

O Brasil é o maior produtor de sisal do mundo, cuja receita proveniente da exportação de fibras já foi superior a US\$ 100 milhões. A Bahia é o principal Estado produtor de sisal no Brasil, contribuindo com 88,1% da produção nacional de fibras. A área explorada com sisal já alcançou 300 mil hectares, caiu para 160 mil em 1996 e, atualmente, não ultrapassa 143,5 mil hectares, concentrando-se nos municípios de Campo Formoso, Santa Luz, Conceição do Coité, Ouro-lândia, Valente, Jacobina e Queimadas (IDR, 2010).

A cultura do sisal continua sofrendo o declínio em sua produção e vários fatores têm contribuído para esta decadência, dentre os quais, a podridão vermelha do sisal, doença que tem ameaçado a sustentabilidade desta cultura no Brasil (ABREU, 2010; COUTINHO et al., 2006).

A podridão vermelha do sisal é causada por *Aspergillus niger*, um fungo mitosporico e saprófita, comumente encontrado no solo (SILVA, 2012a; SILVA, 2012b; MORAES et al., 1997). Esta patologia é caracterizada pelo amarelecimento e murcha das folhas, descoloração avermelhada dos tecidos internos e podridão do caule, causando a morte da planta (SÁ, 2009).

Devido à importância econômica e social da fibra de sisal, o desenvolvimento de métodos de controle da podridão vermelha faz-se imprescindível para o manejo e expansão desta cultura. Entretanto, não existem registros de produtos químicos ou de outros métodos de controle para esta doença, além das patologias relacionadas a fungos veiculados ao solo, a exemplo da podridão vermelha, serem de difícil controle. Apesar da dificuldade de controle de patógenos veiculados pelo solo, existem vários relatos de sucesso com o controle biológico (HOOPEN et al., 2012; CORDIER et al., 2010; JOHN et al., 2010). Além disso o controle biológico é menos danoso para o meio ambiente (BETTIOL; MORANDI, 2009).

Dentre os micro-organismos antagonísticos, destacam-se os fungos do gênero *Trichoderma*, que têm sido relatados em trabalhos sobre o controle de diversas doenças e experiências práticas (EZZIYYANI et al, 2007; LISBOA et al., 2007; BEZERRA et al., 2003).

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

Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar isolados de *Trichoderma* obtidos de regiões produtoras de sisal, no controle da podridão vermelha do sisal. Adicionalmente, foi avaliada a sobrevivência desses micro-organismos nas diferentes condições edafoclimáticas da região e a utilização do resíduo de sisal como substrato para produção e formulação de inóculo de *Trichoderma*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Obtenção de isolados de *Trichoderma*

Os isolados de *Trichoderma* spp. foram obtidos a partir de amostras compostas de solo de áreas com plantio de sisal dos municípios da região sisaleira da Bahia (Araci, Barrocas, Campo Formoso, Conceição do Coité, Jacobina, Miguel Calmon, Ouriolândia, Retirolândia e Valente), coletadas na região próxima as raízes de plantas de sisal (Tabela 1). O isolamento foi feito pela técnica da diluição seriada e plaqueamento em meio BDA (batata, dextrose e ágar), diluído para 20% e com 1 mL L<sup>-1</sup> de Tormicina. As culturas puras dos isolados foram identificadas (Tabela 1), conservadas à temperatura ambiente em frascos de vidro esterilizados, contendo quatro mL de água destilada e esterilizada, identificados e fechados hermeticamente.



**Tabela 1.** Isolados de *Trichoderma* spp. obtidos de amostras de solo de diferentes localidades de municípios da região sisaleira, na Bahia.

| <b>Municípios na Bahia</b> | <b>Codificação dos isolados</b> |
|----------------------------|---------------------------------|
| Araci                      | TCS30 a TCS35                   |
| Barrocas                   | TCS46                           |
| Campo Formoso              | TCS01 a TCS29                   |
| Conceição do Coité         | TCS45                           |
| Jacobina                   | TCS73 a TCS75                   |
| Miguel Calmon              | TCS78; TCS79                    |
| Ourolândia                 | TCS70 a TCS72                   |
| Retirolândia               | TCS36 a TCS44; TCS77            |
| Valente                    | TCS76                           |
| <b>Total</b>               | <b>55 isolados</b>              |

### Identificação molecular dos isolados de *Trichoderma*

Os isolados de *Trichoderma* foram identificados em nível de espécie por meio de sequenciamento do DNA e comparação das sequencias, conforme descrito a seguir. Para extração do DNA, os isolados de *Trichoderma* foram cultivados em meio líquido batata-dextrose (BD), a temperatura de 28 °C por três dias. Após os três dias de incubação, o micélio foi transferido para tubos do tipo Eppendorf, com capacidade para 2 mL, sendo em seguida liofilizado, por um período de 24 horas e armazenado a -20 °C. Posteriormente, cerca de 150 mg do micélio liofilizado foram macerados em nitrogênio líquido e o DNA foi extraído por meio de um protocolo padrão conforme método CTAB descrito por Doyle e Doyle (1987).

A reação em cadeia pela polimerase (PCR) para a amplificação da região ITS do rDNA foi realizada com os oligonucleotídeos iniciadores ITS1 (5' – TCCGTAGGTGAACCTGCGG – 3') e ITS4 (5' – TCCTCCGCTTATTGATATGC – 3') (tamanho do produto de aproximadamente 570 pb) (WHITE et al., 1990). O fragmento do gene codificador do fator de alongação (EF) foi amplificado com o par de primers tef71F (5' – CAAAATGGGTAAGGAGGASAAGAC – 3') e tef997R (5' – CAGTACCGGCRGCRATRATSAG – 3') (tamanho do produto de aproximadamente

930 pb) (SHOUKOUHI; BISSETT, 2008). As reações foram efetuadas em termociclador PTC100 (*MJ Research*) seguindo a seguinte programação: desnaturação inicial a 94 °C/2 min, 40 ciclos de 94 °C/30 s – 54 °C/30 s – 72 °C/60 s, extensão final a 72 °C/4 min. Os produtos de PCR foram purificados por precipitação com polietilenoglicol, segundo protocolo descrito por Schmitz e Riesner (2006).

O sequenciamento foi realizado pelo método de terminação de cadeia com o reagente BigDye 3.1 (*Applied Biosystems*) e sequenciador automático ABI3500 (*Applied Biosystems*).

O programa BLAST (ALTSCHUL et al., 1997) foi usado para comparar as seqüências de cada isolado com aquelas encontradas no banco de dados público TrichOKEY, disponíveis em *International Subcommission on Trichoderma and Hypocrea Taxonomy* (2011), que permitem realizar a identificação molecular de fungos do gênero *Trichoderma*, por meio da comparação com seqüências de espécies “vouchers” (NAGY et al., 2007; DRUZHININA et al., 2005; KOPCHINSKIY et al., 2005;), baseado no reconhecimento de trechos da seqüência, característicos de cada espécie de *Trichoderma*. As árvores filogenéticas foram construídas por meio do programa MEGA5.

### **Seleção de isolados de *Trichoderma* para o controle de *A. niger*, em segmentos de caule de sisal**

Foram avaliados 45 isolados de *Trichoderma* da região semiárida da Bahia (TCS01 a TCS45). Para a seleção *in vitro* desses isolados quanto ao antagonismo à *A. niger*, segmentos do tecido interno de caule de sisal, em forma de discos de 17 mm de diâmetro x 0,5 cm de altura, foram cortados, lavados e desinfestados em álcool 70% e hipoclorito de sódio 1%, ambos por cinco minutos, seguido de três lavagens com água destilada e esterilizada. Posteriormente, os segmentos do caule foram transferidos para copos de plástico descartáveis, com capacidade para 100 mL, contendo no fundo, uma fina camada de papel toalha esterilizado.

Esses segmentos de caule foram inoculados na superfície por meio da aplicação de 1 mL de suspensão de esporos de *Trichoderma* na concentração de  $10^7$  conídios mL<sup>-1</sup> e, após o período de 48 horas, foi aplicado 1 mL de suspensão de esporos de *A. niger* na mesma concentração. O controle negativo consistiu apenas

da aplicação de *A. niger*. Além disso, foi utilizado um controle positivo composto por segmentos de caule não inoculados, com o propósito de verificar a eficiência do processo de desinfestação dos discos de caule. O material foi incubado a duas temperaturas,  $30\pm 2$  e  $40\pm 2$  °C, por um período de cinco dias. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial com 45 isolados x 2 temperaturas, e quatro repetições.

Após a incubação por cinco dias, os segmentos de caule foram transferidos para frascos de Erlenmeyer com capacidade de 50 mL, contendo 20 mL de solução salina (0,85 % NaCl), com 100 µL de Tween20<sup>®</sup>, agitando-se durante 1 minuto para obtenção da suspensão dos esporos presentes no segmento de caule. Em seguida, fez-se a avaliação da concentração de esporos de *A. niger* nessa suspensão, com auxílio de câmara de Neubauer e microscópio ótico com aumento de 100 vezes, sendo calculada a concentração de esporos no volume total de 20 mL da solução salina com Tween20<sup>®</sup>.

### **Seleção *in vivo* de isolados de *Trichoderma* nas condições da região semiárida da Bahia, produtora de sisal.**

Mudas de sisal do tipo rebento, com aproximadamente 20 cm de altura, foram colhidas no campo e conduzidas para área experimental nos municípios de Conceição do Coité e Ouro-lândia, onde foram transplantadas para sacos de polietileno preto contendo 2 L de solo coletado da camada arável (0-20 cm) da área de produção de sisal. As mudas de sisal foram mantidas em área aberta, no campo, sendo irrigadas periodicamente. Após 60 dias de transplante foram feitos ferimentos padronizados nas mudas (quatro perfurações equidistantes, com 2 cm de profundidade e 1 mm de diâmetro), com auxílio de agulha, e foi aplicado nos ferimentos do caule, 1 mL de suspensão de esporos de *Trichoderma*, com auxílio de uma pipeta automática, exceto nas mudas do controle negativo, no qual foi colocado somente água potável.

Para a obtenção da suspensão de esporos, discos de cultura de *Trichoderma* foram transferidos para frascos de Erlenmeyer contendo 70 g de arroz parbolizado umedecido em água destilada e autoclavado por 55 minutos, conforme descrito por Soares et al., (2007). As culturas no arroz foram incubadas durante 20 dias a temperatura ambiente. Após o período de incubação, foram adicionados 100 mL de

água potável aos frascos de Erlenmeyer, contendo a cultura de *Trichoderma* em arroz, agitados os frascos e removida a suspensão de esporos de *Trichoderma*. A concentração da suspensão de esporos foi aferida em câmara de Neubauer, com auxílio de microscópio ótico, com aumento de 40 vezes, e ajustada para concentração de  $10^6$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ , mediante diluições com água esterilizada.

Após 24 horas da inoculação das mudas de sisal com *Trichoderma*, estas foram inoculadas com *A. niger*, fazendo-se novas lesões no caule, próximas as lesões anteriores, e aplicando-se 1 mL da suspensão de esporos na concentração de  $10^7$  esporos  $\text{mL}^{-1}$ , exceto no controle positivo que recebeu somente água.

Os tratamentos consistiram de 42 isolados de *Trichoderma* (isolados que esporularam no arroz utilizado para preparo do inóculo), e um controle positivo (apenas lesão e água) e um controle negativo inoculado apenas com *A. niger*. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 10 repetições.

A severidade dos sintomas da doença foi avaliada por meio de corte transversal da muda e observação da presença de sintomas de podridão vermelha no caule, adotando-se a seguinte escala de notas: 0 – Sem sintomas, apenas lesões mecânicas causadas pela perfuração da agulha; 1 – Sintoma inicial, lesão maior do que a causada pela agulha, podridão na base da folha mais externa; 2 – Sintoma avançado, podridão no interior da planta, planta ainda viva; 3 – Planta morta, caule totalmente destruído (Figura 1).



**Figura 1.** Escala descritiva de notas para avaliação da severidade da podridão vermelha do sisal. **(A)** 0 – Sem sintomas, apenas lesões mecânicas causadas pela perfuração da agulha; **(B)** 1 – Sintoma inicial, lesão maior do que a causada pela agulha, podridão na base da folha mais externa; **(C)** 2 – Sintoma avançado, podridão no interior da planta, planta ainda viva; **(D)** 3 – Planta morta, caule totalmente destruído.

Os dados de severidade foram transformados para Índice de Severidade da Doença, conforme McKinney (1923), sendo calculado pela fórmula:

$$\text{Índice de severidade da doença} = \frac{\sum(\text{Grau da escala} \times \text{frequência}) \times 100}{\text{n}^\circ \text{ total de unidades} \times \text{grau máximo da escala}}$$

Realizou-se a análise de Clusters em função do índice de severidade da doença, com base em distância Euclidiana, utilizando o método de Ward de agrupamento.

## Avaliação da sobrevivência de *Trichoderma* em dois tipos de solo da região semiárida produtora de sisal da Bahia.

Com o objetivo de avaliar a sobrevivência de *Trichoderma* spp. em dois solos da região sisaleira da Bahia, amostras compostas de dois solos das áreas produtoras de sisal nos municípios de Conceição do Coité e Jacobina foram coletadas próximo as plantas de sisal e acondicionadas em recipientes plásticos com capacidade para 100 mL. As características químicas e físicas das amostras de solo estão descritas na tabela 2. Como fonte de matéria orgânica foi utilizado o resíduo de sisal fresco, resíduo fresco seco em estufa e resíduo coletado no campo, após processo natural de decomposição das pilhas de resíduo deixadas no campo. O resíduo é oriundo do desfibramento das folhas de sisal, coletado em área de produção de sisal, logo após o desfibramento das folhas é coletado nas pilhas de resíduo deixadas no campo por período indeterminado. Foi utilizada a proporção de resíduo e solo de 1:3 (v/v).

**Tabela 2.** Características químicas das amostras de solo coletadas nos municípios de Jacobina (S1, Argiloso) e Conceição do Coité (S2, Médio-arenoso). As análises foram realizadas pelo Departamento de Ciências do Solo da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, USP. Protocolo de análises segundo Raij et al., (2001).

| <b>Macronutrientes</b> |           |            |          |          |           |           |             |           |            |          |
|------------------------|-----------|------------|----------|----------|-----------|-----------|-------------|-----------|------------|----------|
| <b>Solos</b>           | <b>pH</b> | <b>M.O</b> | <b>P</b> | <b>K</b> | <b>Ca</b> | <b>Mg</b> | <b>H+Al</b> | <b>SB</b> | <b>CTC</b> | <b>V</b> |
| <b>S1(Argiloso)</b>    | 6,8       | 24         | 13       | 6,4      | 128       | 16        | 13          | 150,9     | 164,3      | 92       |
| <b>S2(M-arenoso)</b>   | 5,5       | 37         | 7        | 0,9      | 45        | 28        | 22          | 73,7      | 95,9       | 77       |

| <b>Micronutrientes</b> |          |           |           |           |           |           |           |
|------------------------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| <b>Solos</b>           | <b>B</b> | <b>Cu</b> | <b>Fe</b> | <b>Mn</b> | <b>Zn</b> | <b>Na</b> | <b>Si</b> |
| <b>S1(Argiloso)</b>    | 0,56     | 0,9       | 7         | 28,3      | 1,1       | 4         | 25,6      |
| <b>S2(M-arenoso)</b>   | 0,36     | 0,7       | 38        | 15,8      | 2,96      | 20        | 12,1      |

Unidades: M.O. ( $\text{g.dm}^{-3}$ ); P ( $\text{mg.dm}^{-3}$ ); K, Ca, Mg, H+Al, SB e T ( $\text{mmolc.dm}^{-3}$ ); V %. B; Cu, Fe, Mn, Zn, Na e Si ( $\text{mg.dm}^{-3}$ ). Métodos: pH em  $\text{CaCl}_2$  (acidez ativa) -  $\text{CaCl}_2$   $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$ ; M.O.-Dicromato/Colorimétrico; Fósforo, Potássio, Cálcio e Magnésio - Resina trocadora de íons; H+Al (acidez potencial) - pH SMP; Boro - água quente/microondas; Cu, Fe, Mn e Zn - extração DTPA - TEA em pH 7,3; Na - extração duplo ácido; Si - extração  $\text{CaCl}_2$   $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$ .

As amostras de solo foram infestadas com suspensão de esporos de *Trichoderma harzianum*, isolado codificado como TCS34, na concentração de  $10^7$  esporos  $\text{mL}^{-1}$  e colocadas em copos de plástico com capacidade para 100 mL, com

tampa de plástico e incubadas em câmara do tipo BOD, à temperatura de 32°C. A umidade do solo foi mantida a 20%, sendo controlada por meio do peso e reposição de água nos recipientes com o solo. O delineamento experimental foi em blocos casualizados em esquema fatorial 2 x 4 (dois tipos de solo x solo sem resíduo, solo com resíduo de sisal em processo de decomposição (mineralização) e seco, solo com resíduo fresco, seco em estufa e solo com resíduo fresco), com três repetições.

Sub-amostras de 10g de solo foram retiradas a cada sete dias durante 28 dias e submetidas à diluição seriada e plaqueamento em meio seletivo TSM adaptado (BARAKAT et al., 2006; WILLIAMS et al., 2003; LUCATERO et al., 2004) (0,2 g de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,9 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,15 g de KCl; 1 g de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>; 3 g de dextrose; 0,15 g de rosa de bengala; 3 mL de Triton X100; 2mL de Carbendazin (solução estoque 0,05 mL L<sup>-1</sup>)), com incubação por 3 dias. Calculou-se o número de unidades formadoras de colônias (UFCs) por grama de solo, e as áreas abaixo das curvas (AAC) geradas foram calculadas pela fórmula descrita por Shaner; Finney (1977):

$$AAC = \sum_{i=1}^n [(Y_{i+1} + Y_i)/2] \times [(T_{i+1} - T_i)]$$

Onde: n é o número de observações; Y<sub>i</sub> é o número de UFCs g solo<sup>-1</sup> na “i”-ésima observação; T<sub>i</sub> é o tempo em dias na “i”-ésima observação. Os dados foram comparados pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

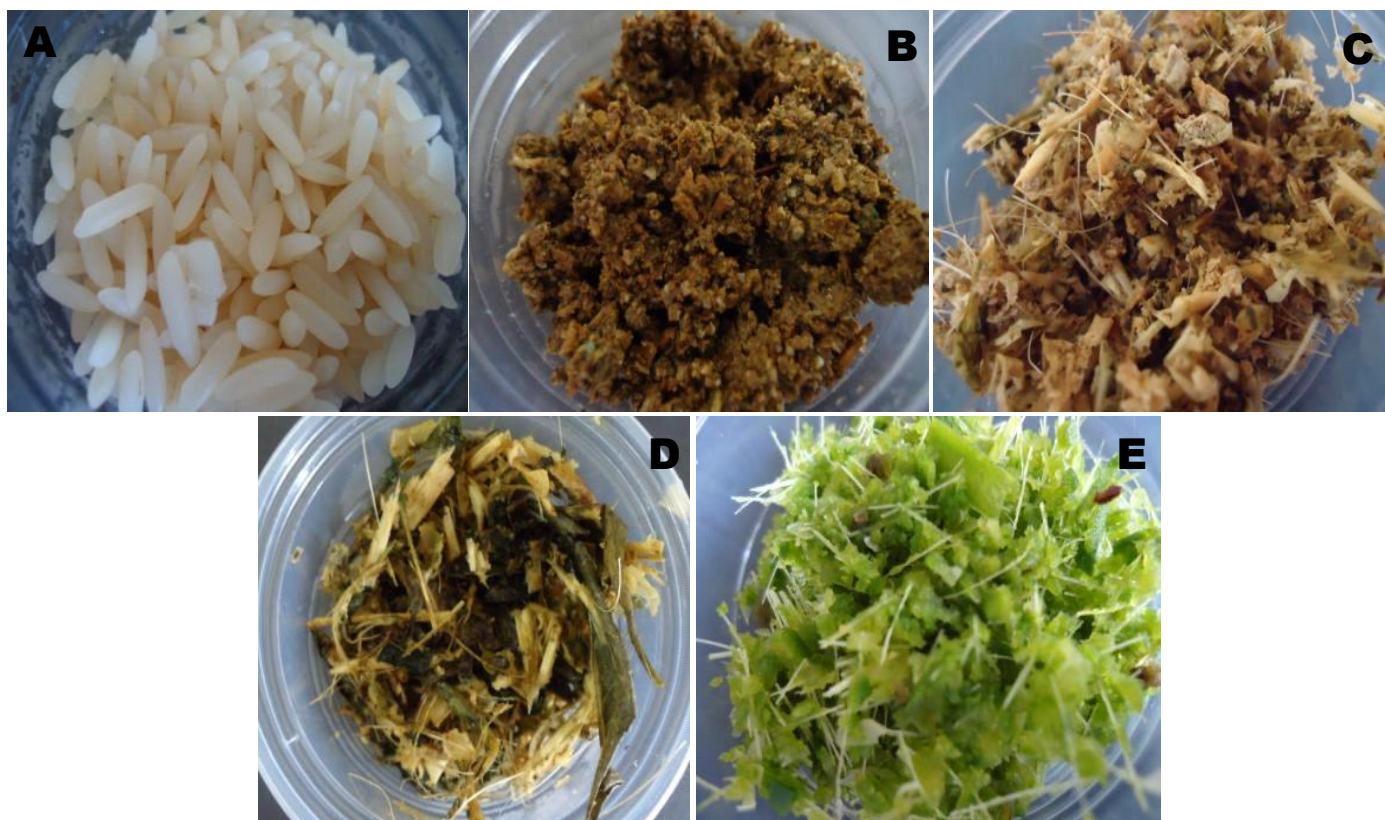
### **Avaliação da multiplicação e sobrevivência de *Trichoderma* em resíduo de sisal enriquecido.**

Amostras de resíduo de sisal oriundo do desfibramento das folhas foram coletadas em área de produção de sisal do município de Conceição do Coité-BA. Os tratamentos consistiram de amostras de 20 gramas de: composto de resíduo de sisal (20% esterco + 10% farinha de rocha + 70% resíduo de sisal); resíduo decomposto de sisal acrescido de 1,8 g de NO<sub>4</sub>(NO<sub>3</sub>); resíduo decomposto de sisal acrescido de glicíndia (*Gliricidia sepium*) e, como controle, amostras de 20g de arroz parboilizado umedecido e esterilizado e resíduo fresco de sisal (Figura 2). As amostras foram acondicionadas em recipientes plásticos com capacidade para 100 mL e foram infestadas com 3 mL da suspensão de esporos de *Trichoderma harzianum*, isolado TCS34, na concentração de 10<sup>7</sup> esporos mL<sup>-1</sup>.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 8 (tratamentos) x 4 (avaliações), com três repetições. Os recipientes com as



amostras foram vedados com tampas plásticas e incubados a temperatura de 32°C, em incubadora do tipo B.O.D. A umidade foi mantida em 20%, com reposição periódica, avaliando-se o peso dos recipientes.



**Figura 2.** Tratamentos utilizados. **(A)** Arroz parboilizado umedecido e esterilizado, **(B)** Composto de resíduo de sisal, **(C)** Resíduo decomposto de sisal acrescido de  $\text{NO}_4(\text{NO}_3)$ , **(D)** Resíduo decomposto de sisal acrescido de gliricídia e **(E)** Resíduo fresco de sisal.

Para quantificação da população de *Trichoderma* no resíduo, subamostras (1 g) de resíduo foram retiradas a cada sete dias por um período de 28 dias dos copos de plástico incubados e foram submetidas à diluição seriada e plaqueamento em meio TSM (descrito acima), com incubação por três dias. Após incubação, contou-se o número de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs), calculando-se as UFCs por grama de substrato. Os dados foram analisados pelo teste de comparação de médias de Tukey a 5% de probabilidade.



### **Avaliação da supressão de *Aspergillus niger* por isolados de *Trichoderma* em solo.**

Com o objetivo de avaliar a eficiência de *Trichoderma* no controle de *A. niger* em solo da região sisaleira da Bahia, foi realizado um experimento com sete isolados de *Trichoderma* pré-selecionados (*T. viride*, isolado TCS09; *T. virens*, isolado TCS28; *T. harzianum*, isolado TCS34; *T. harzianum*, isolado TCS 35; *T. harzianum*, isolado TCS36; *T. virens*, isolado TCS39 e *T. virens*, isolado TCS43) com base no potencial de biocontrole destes isolados para a podridão vermelha do sisal.

Amostras de solo argiloso (Tabela 2) provenientes de áreas produtoras de sisal, acrescidas de resíduo seco decomposto de sisal foram acondicionadas em recipientes plásticos com capacidade para 100 mL (60 g de solo por recipiente). As amostras de solo foram infestadas com a suspensão de esporos de diferentes isolados de *Trichoderma*. Os tratamentos consistiram da infestação do solo com 3 mL de uma suspensão de esporos de *Trichoderma* na concentração de  $10^7$  esporos mL<sup>-1</sup> de *A. niger*; *A. niger* + *T. viride* – isolado TCS09; *A. niger* + *T. virens* – isolados TCS28, TCS39 e TCS43, *A. niger* + *T. harzianum* – isolados TCS34, TCS35 e TCS36) e o controle (sem infestação). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com três repetições, sete tratamentos e um controle infestado apenas por *A. niger*.

As microparcelas constituídas pelo solo infestado com os isolados de *Trichoderma* e *A. niger* e o tratamento controle foram mantidas em câmara incubadora tipo BOD à 32°C, e a umidade do solo ajustada para 20%. Sub-amostras das microparcelas foram retiradas a cada sete dias e submetidas à diluição seriada e plaqueamento em meio TSM adaptado e meio semi-seletivo para *A. niger* (BDA salino (6% de NaCl) com Tormicina (1mL L<sup>-1</sup>), ambos com incubação por três dias. Após a incubação, fez-se a contagem das unidades formadoras de colônias e o cálculo de UFCs por grama de solo úmido.

## **Elaboração e avaliação de formulação de *Trichoderma***

Amostras de 10 g de resíduo de sisal seco e moído (formando um pó) foram transferidas para copos de plástico com capacidade para 100 mL, sendo em seguida, adicionados 10% (v/v) da suspensão de esporos de *Trichoderma harzianum* (isolado TCS 34), na concentração de  $10^7$  esporos  $\text{mL}^{-1}$ . Os tratamentos consistiram da formulação com adição de protetor solar; formulação com adição de protetor solar e 1% de carboximetilcelulose; formulação com adição de apenas 1% de carboximetilcelulose e um controle sem adição de carboximetilcelulose e protetor solar. O protetor solar utilizado foi o bloqueador solar físico (dióxido de silício e dióxido de titânio), cuja mistura na proporção de 10% de Dióxido de Zinco e 5% de Dióxido de Titânio, proporciona um fator de proteção de 30 FPS, conforme orientação de um farmacêutico. Um tratamento consistiu de exposição direta ao sol, por meio da colocação dos recipientes plásticos com as formulações em área aberta, cuja incidência solar era constante e sob a temperatura ambiente ( $28 \pm 2$  °C) e o outro tratamento consistiu em manter a formulação no ambiente de laboratório, sob temperatura ambiente de 25 a 28 °C. O delineamento experimental foi em esquema fatorial 4 (formulações) x 2 (expostos ao sol e mantidos no laboratório a temperatura ambiente), com três repetições. A avaliação ocorreu com a retirada de subamostras de 1 g da formulação de ambos tratamentos (com exposição ao sol e sem exposição ao sol) durante 0, 2, 5 e 8 horas, e quantificação das Unidades Formadoras de Colônias por meio da técnica de diluição seriada e plaquemaento em meio TSM adaptado.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Identificação molecular dos isolados de *Trichoderma***

Foram identificadas sete espécies de *Trichoderma* de amostras de solo da região sisaleira da Bahia. As espécies encontradas foram: *T. longibrachiatum*; *T. saturnisporum*; *T. erinacium*; *T. virens*; *T. harzianum*, duas espécies próximas a *T. atroviride* e uma próxima a *T. viride* (Tabela 3).

**Tabela 3.** Identificação molecular dos isolados de *Trichoderma* estudados por meio do sequenciamento de duas regiões distintas: ITS (*internal transcribed spacer*), com 570 pb e EF (*translation-elongation factor*), com 930 pb.

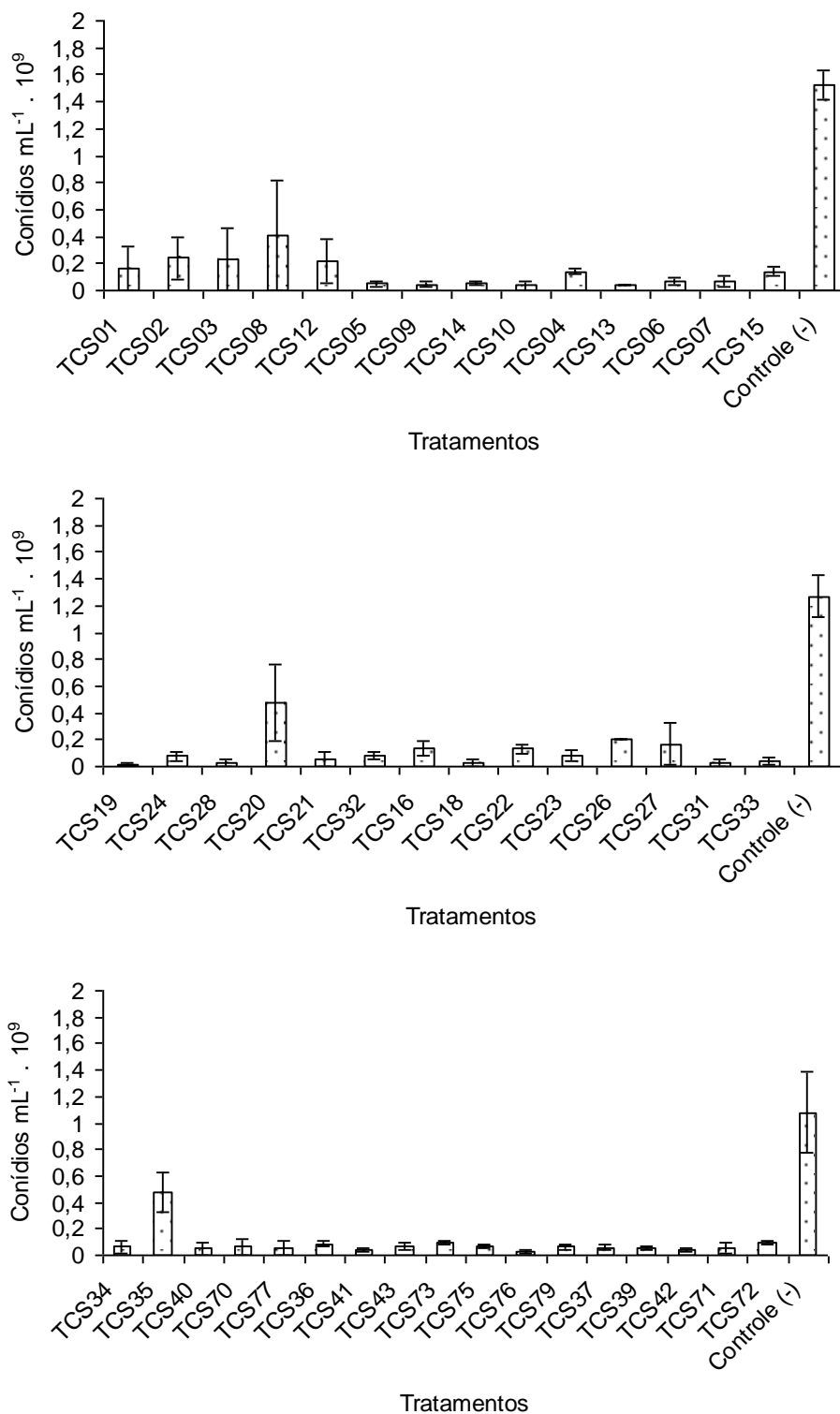
| Isolado | Identificação pelo Trichokey utilizando ITS | Identificação pela árvore filogenética utilizando EF |
|---------|---|--|
| TCS01   | <i>T. harzianum</i>                         |  |
| TCS02   | <i>T. harzianum</i>                         | <i>T. harzianum</i>                                  |
| TCS03   | <i>T. harzianum</i>                         | <i>T. harzianum</i>                                  |
| TCS04   | <i>T. harzianum</i>                         | <i>T. harzianum</i>                                  |
| TCS05   | <i>T. harzianum</i>                         | <i>T. harzianum</i>                                  |
| TCS06   | <i>T. harzianum</i>                         |  |
| TCS07   | <i>T. harzianum</i>                         | <i>T. harzianum</i>                                  |
| TCS08   | <i>T. atroviride</i>                        | <i>T. atroviride</i>                                 |
| TCS09   | <i>T. erinaceum</i>                         | próximo a <i>T. viride</i>                           |
| TCS10   | <i>T. harzianum</i>                         |  |
| TCS11   | <i>T. harzianum</i>                         | <i>T. harzianum</i>                                  |
| TCS12   | <i>T. harzianum</i>                         | <i>T. harzianum</i>                                  |
| TCS13   | <i>T. erinaceum</i>                         | próximo a <i>T. atroviride</i>                       |
| TCS14   | <i>T. erinaceum</i>                         | <i>T. viride</i>                                     |
| TCS15   | <i>T. longibrachiatum/H. orientalis</i>     |  |
| TCS16   | <i>T. virens</i>                            | <i>T. virens</i>                                     |
| TCS17   | <i>T. erinaceum</i>                         | próximo a <i>T. atroviride</i>                       |
| TCS18   | <i>T. longibrachiatum/H. orientalis</i>     | <i>T. longibrachiatum</i>                            |
| TCS19   | <i>T. erinaceum</i>                         |  |
| TCS20   | <i>T. harzianum</i>                         |  |
| TCS21   | <i>T. erinaceum</i>                         |  |
| TCS22   | <i>T. erinaceum</i>                         |  |
| TCS23   | <i>T. erinaceum</i>                         | <i>T. viride</i>                                     |
| TCS24   | <i>T. harzianum</i>                         |  |
| TCS25   | <i>T. erinaceum</i>                         | <i>T. viride</i>                                     |
| TCS26   | <i>T. harzianum</i>                         |  |
| TCS28   | <i>T. virens</i>                            | <i>T. virens</i>                                     |
| TCS29   | <i>T. harzianum</i>                         |  |
| TCS30   | <i>T. harzianum</i>                         | <i>T. harzianum</i>                                  |
| TCS31   | <i>T. harzianum</i>                         | <i>T. harzianum</i>                                  |
| TCS32   | <i>T. harzianum</i>                         |  |
| TCS33   | <i>T. harzianum</i>                         |  |
| TCS34   | <i>T. harzianum</i>                         |  |
| TCS35   | <i>T. harzianum</i>                         |  |
| TCS36   | <i>T. harzianum</i>                         |  |
| TCS37   | <i>T. virens</i>                            |  |
| TCS39   | <i>T. virens</i>                            |  |
| TCS40   | <i>T. harzianum</i>                         |  |
| TCS41   | <i>T. harzianum</i>                         |  |
| TCS42   | <i>T. harzianum</i>                         |  |
| TCS43   | <i>T. virens</i>                            |  |
| TCS45   | <i>T. harzianum</i>                         |  |

| Isolado | Identificação pelo Trichokey utilizando ITS | Identificação pela árvore filogenética utilizando EF |
|---------|---|--|
| TCS58   | <i>T. harzianum</i>                         |  |
| TCS70   | <i>T. konilangbra</i>                       | <i>T. saturnisporum</i>                              |
| TCS71   | <i>T. harzianum</i>                         | <i>T. harzianum</i>                                  |
| TCS72   | <i>T. konilangbra</i>                       | <i>T. saturnisporum</i>                              |
| TCS73   | <i>T. erinaceum</i>                         | <i>T. erinaceum</i>                                  |
| TCS74   | <i>T. erinaceum</i>                         |  |
| TCS75   | <i>T. erinaceum</i>                         |  |
| TCS76   | <i>T. harzianum</i>                         |  |
| TCS77   | <i>T. harzianum</i>                         |  |
| TCS78   | <i>T. longibrachiatum/H. orientalis</i>     | <i>T. longibrachiatum</i>                            |
| TCS79   | <i>T. longibrachiatum/H. orientalis</i>     |  |

Para a identificação molecular das espécies de *Trichoderma*, fez-se o sequenciamento de duas regiões distintas: ITS (*internal transcribed spacer*) e EF (*translation-elongation factor*). Os dados do sequenciamento das duas regiões são complementares, permitindo a separação de espécies (CHAVERRY et al., 2004). Um único gene não é considerado suficiente para caracterizar espécies de *Trichoderma* e novas espécies, necessitando-se o uso de vários genes, incluindo actina, calmodulina, endoquitinase e EF (CHAVERRY et al., 2004; LU et al., 2004; BISSET et al., 2003). Embora geralmente a região ITS é espécie específica, identificações baseadas em suas seqüências devem ser usadas com cuidado, pois às vezes espécies estreitamente relacionadas não podem ser distinguidas com este gene. Isto deve ser levado em consideração por exemplo, para *T. viride*, sendo que mais de uma espécie podem partilhar a mesma seqüência ITS. A região EF é mais variável do que o ITS, sendo capaz de refletir as diferenças de espécies dentro e entre grupos de espécies estreitamente relacionadas (SAMUELS, 2006). Os isolados TCS70 e TCS72 foram identificados como *T. konilangbra* pelo TrichOKEY, mas é mais provável que sejam *T. saturnisporum*. Os isolados TCS13, TCS17, TCS19, TCS21 e TCS22 foram identificados como *T. erinaceum* pelo TrichOKEY, mas pelo gene EF são mais próximos a *T. atroviride*. Os isolados TCS13 e TCS17 podem ser espécies novas de *Trichoderma*. Os isolados TCS09, TCS14, TCS23 e TCS25 foram identificados como *T. erinaceum* pelo TrichOKEY, mas pelo gene EF são mais próximos de *T. viride* (Tabela 3).

### Seleção de *Trichoderma* em segmentos do caule da planta

Os isolados de *Trichoderma* inibiram o crescimento micelial e a esporulação de *A. niger* sobre os segmentos de caule de sisal à temperatura de 30 °C (Figura 3).



**Figura 3.** Esporulação de *A. niger* em segmentos de caule de sisal desinfestados, inoculados com suspensão de esporos de diferentes isolados de *Trichoderma* e após 24 horas por suspensão de esporos de *A. niger*, sendo incubados à temperatura de 30°C. Controle (-) corresponde à inoculação apenas com *A. niger*. Barras representam o erro padrão da média.

Estes isolados de *Trichoderma* apresentam potencial para o controle da podridão vermelha do sisal, por apresentarem tolerância a temperatura constante de 30 °C, promoverem a inibição de *A. niger* a essa temperatura, e serem adaptados a essa região, já que foram obtidos de amostras de solos de municípios da região sisaleira no semiárido da Bahia. Entretanto, esse potencial tem que ser avaliado em estudos *in vivo*, nas condições edafoclimáticas das áreas de produção de sisal.

A 40 °C não houve desenvolvimento de *A. niger* e nem de *Trichoderma* spp. nos discos de caule. Essa temperatura causou a desidratação dos discos de caule, os quais não ofereceram umidade suficiente para o desenvolvimento de *A. niger* e os isolados de *Trichoderma*. *A. niger* tolera uma ampla faixa de temperatura que vai de 6 a 47 °C, sendo a temperatura ideal entre 35 a 37°C (SCHUSTER et al., 2002).

As avaliações *in vitro*, apenas revelam alguns mecanismos diretos de controle biológico por *Trichoderma* spp., como a antibiose, competição e micoparasitismo (BENITEZ et al, 1998), desconsiderando as variações ambientais que ocorrem naturalmente no campo. *Trichoderma* spp. pode apresentar outros mecanismos de biocontrole, por meio da interação fungo x planta (BADRI et al., 2009), que só podem ser avaliados em trabalhos *in vivo*.

### **Seleção *in vivo* de isolados de *Trichoderma* nas condições da região semiárida da Bahia, produtora de sisal.**

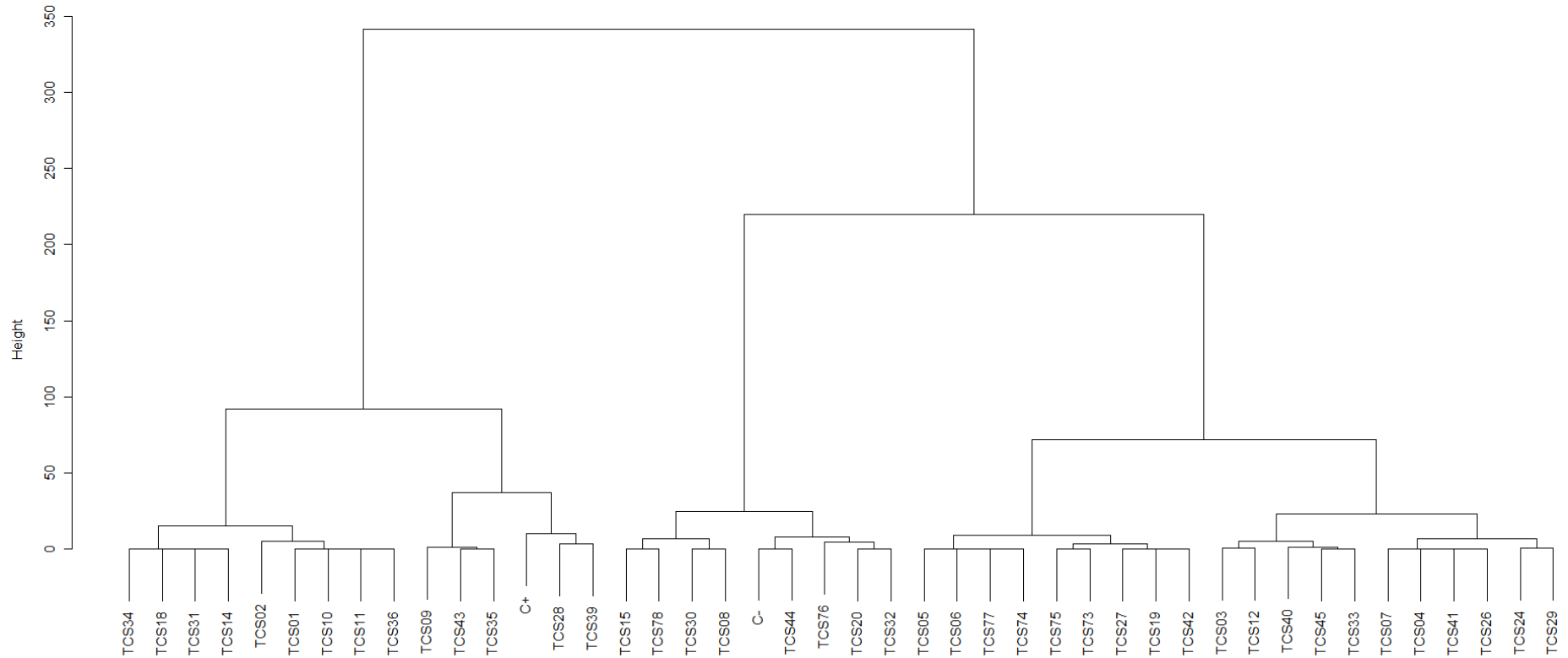
Dos 55 isolados de *Trichoderma*, apenas 42 esporularam em arroz esterilizado, sendo esses 42 isolados avaliados quanto ao controle da podridão vermelha do sisal, nas condições climáticas dos municípios de Conceição do Coité e Ourorândia (Figuras 4 e 5).

Os trabalhos realizados com os 42 isolados de *Trichoderma*, nas condições de semiárido, no município de Conceição do Coité demonstraram que cinco isolados, *T. viride* (isolado TCS09), *T. virens* (isolado TCS28), *T. harzianum* (isolado TCS35), *T. virens* (TCS39) e *T. virens* (TCS43), reduziram o índice da severidade da doença, sendo agrupados segundo a análise de *clusters* próximo ao controle não inoculado com *A. niger*. Dentre esses isolados de *Trichoderma* os isolados de *T. virens* (TCS28 e TCS39), foram os que apresentaram os melhores resultados, com mudas de sisal apresentando valores de índice de severidade da podridão vermelha mais próximo

ao controle não inoculado com *A. niger* (Figura 4).

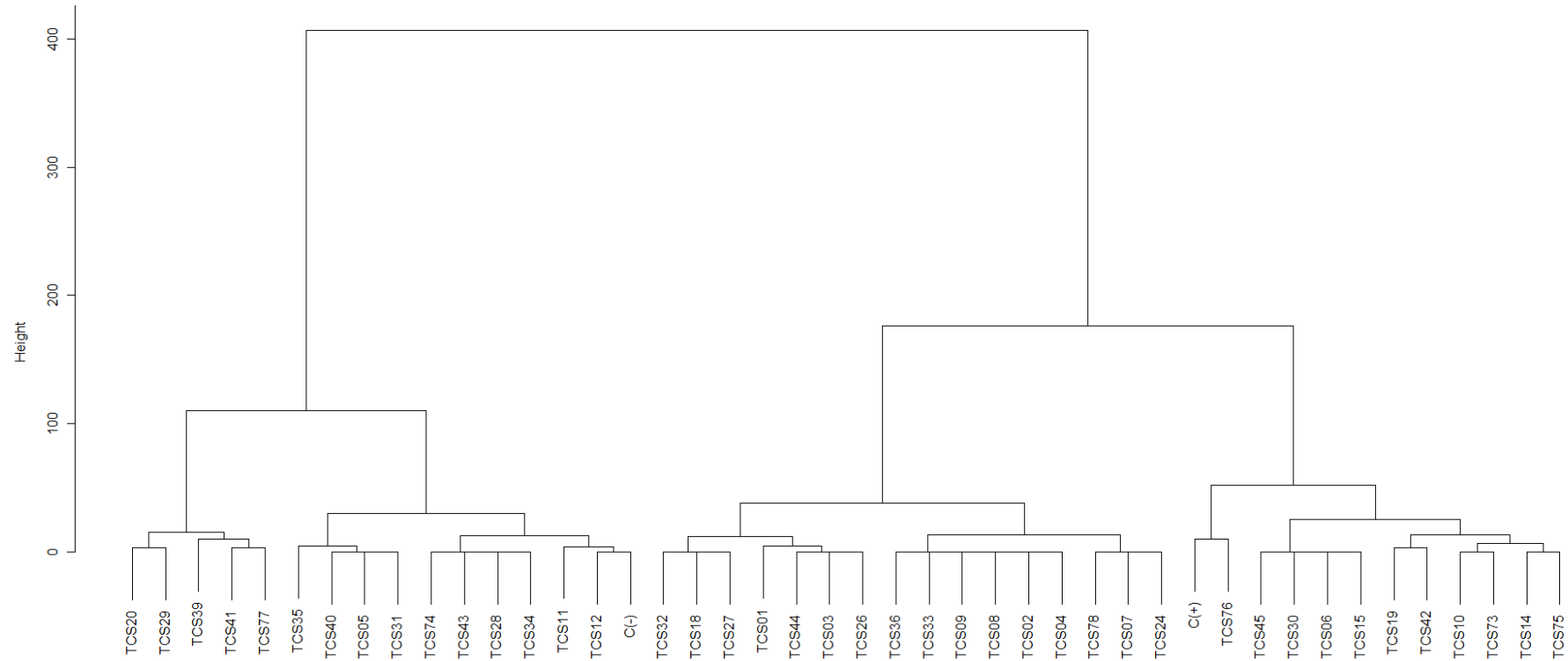
Entretanto, no município de Ourolândia, onze isolados de *Trichoderma*, *T. harzianum* (isolados TCS76, TCS45, TCS30, TCS06, TCS42, TCS10), *T. longibrachiatum* (isolado TCS15), *T. erinaceum* (isolados TCS19, TCS73, TCS75) e *T. viride* (isolado TCS14), proporcionaram reduções no índice da severidade da podridão vermelha, sendo agrupados, pela análise de *clusters*, próximos ao controle não inoculado com *A. niger*, destacando-se o isolado *T. harzianum* (TCS76) (Figura 5).

Os resultados demonstraram não existir repetição do efeito de *Trichoderma* nos dois municípios, pois nenhum dos isolados de *Trichoderma* avaliados tiveram efeito positivo no controle da doença em ambos os ambientes avaliados, indicando que as condições ambientais são limitantes para esses micro-organismos.



**Figura 4.** Representação gráfica da análise de *Clusters* em função do índice de severidade da podridão vermelha do sisal em mudas inoculadas com isolados de *Trichoderma* e após 24 horas por *A. niger* no município de Conceição do Coité-BA. CT- corresponde ao controle negativo (inoculado apenas com *A. niger*), CT+ corresponde a não inoculação. Os dados foram analisados com base em distância Euclidiana, utilizando o método de agrupamento de Ward.





**Figura 5.** Representação gráfica da análise de *Clusters* em função do índice de severidade da podridão vermelha do sisal em mudas inoculadas com isolados de *Trichoderma* e, após 24 horas, inoculadas com *A. niger*, no município de Ouriolândia-BA. CT- corresponde ao controle negativo (inoculado apenas com *A. niger*), CT+ corresponde ao tratamento sem inoculação. Os dados foram analisados com base em distância Euclidiana, utilizando o método de agrupamento de Ward.

A incidência da podridão vermelha em mudas de sisal, nos experimentos conduzidos nos dois municípios, indicam efeito positivo dos isolados *T. viride* (isolado TCS09), *T. virens* (isolado TCS28), *T. harzianum* (isolado TCS34), *T. harzianum* (isolado TCS35) e *T. virens* (isolado TCS39), que promoveram uma redução no número de plantas sintomáticas, com valores de incidência da doença igual ou inferior a 30%, nas condições edafoclimáticas de Conceição do Coité (Tabela 4).

**Tabela 4.** Incidência da podridão vermelha em mudas de sisal inoculadas com *A. niger* e diferentes isolados de *Trichoderma*, em dois experimentos realizados nos municípios de Conceição de Coité e Ourolândia-BA.

| Isolado | Conceição de Coité (%) | Ourolândia (%) |
|---------|------------------------|----------------|
| TCS01   | 60                     | 70             |
| TCS02   | 50                     | 60             |
| TCS03   | 70                     | 60             |
| TCS04   | 80                     | 60             |
| TCS05   | 70                     | 70             |
| TCS06   | 70                     | 50             |
| TCS07   | 50                     | 90             |
| TCS08   | 90                     | 60             |
| TCS09   | 30                     | 60             |
| TCS10   | 60                     | 50             |
| TCS11   | 50                     | 90             |
| TCS12   | 70                     | 80             |
| TCS14   | 50                     | 60             |
| TCS15   | 90                     | 40             |
| TCS18   | 80                     | 70             |
| TCS19   | 70                     | 30             |
| TCS20   | 80                     | 90             |
| TCS24   | 80                     | 60             |
| TCS26   | 70                     | 70             |
| TCS27   | 80                     | 70             |
| TCS28   | 20                     | 70             |
| TCS29   | 70                     | 80             |
| TCS30   | 70                     | 50             |
| TCS31   | 50                     | 80             |
| TCS32   | 100                    | 60             |
| TCS33   | 60                     | 90             |
| TCS34   | 30                     | 80             |
| TCS35   | 20                     | 70             |
| TCS36   | 40                     | 60             |
| TCS39   | 20                     | 100            |
| TCS40   | 90                     | 80             |
| TCS41   | 90                     | 90             |
| TCS42   | 90                     | 30             |
| TCS43   | 30                     | 70             |
| TCS44   | 100                    | 60             |

| <b>Isolado</b>    | <b>Conceição de Coité (%)</b> | <b>Ourolândia (%)</b> |
|-------------------|-------------------------------|-----------------------|
| TCS45             | 70                            | 60                    |
| TCS73             | 80                            | 40                    |
| TCS74             | 70                            | 80                    |
| TCS75             | 60                            | 30                    |
| TCS76             | 90                            | 10                    |
| TCS77             | 60                            | 90                    |
| TCS78             | 90                            | 70                    |
| Controle positivo | 0                             | 20                    |
| Controle negativo | 100                           | 80                    |

\*Incidencia calculada para uma população de 10 plantas.

O município de Conceição do Coité apresenta temperaturas que variam de 21 a 34 °C, com umidade relativa de 34 a 88%, com predominância de solos médio-arenosos. Já Ourolândia apresenta maiores temperaturas que variam de 26 a 39 °C, e umidade relativa do ar de 31 a 81% e predominância de solos argilosos, o que pode ter influenciado no comportamento dos isolados de *Trichoderma* e, conseqüentemente, no controle da podridão vermelha do sisal.

No experimento conduzido em Ourolândia, os tratamentos com *T. erinaceum* (isolado TCS19), *T. harzianum* (isolado TCS42), *T. erinaceum* (isolado TCS75) e *T. harzianum* (isolado TCS76) apresentaram incidências da doença inferiores ou iguais a 30%. O tratamento com o isolado TCS76 de *T. harzianum* promoveu a menor incidência entre todos os tratamentos, com 10% de plantas sintomáticas (Tabela 4).

No experimento realizado em Ourolândia, plantas lesionadas, mas não inoculadas com *A. niger* apresentaram sintomas de podridão vermelha do caule, o que sugere a ocorrência de infecção natural por *Aspergillus niger*.

As maiores limitações do controle biológico de doenças de plantas são os fatores ambientais, e isso resulta na não repetibilidade dos resultados em locais com condições ambientais diferenciadas (Guetsky et al., 2001). O motivo de muitos organismos suprimirem doenças em condições controladas, mas sem eficiência no campo pode ser explicado pela interação do agente de biocontrole com a comunidade microbiana e outras características do habitat e das raízes, como nutrição e microclima, as quais não são reproduzidas em laboratório ou casa-de-vegetação (MARIANO et al., 2005).

No presente trabalho, os resultados de laboratório relacionados ao controle da podridão vermelha por isolados de *Trichoderma* não se repetiram no campo e nem os resultados de campo se repetiram nos dois municípios em que foram avaliados.

Estes municípios apresentavam características climáticas e de solo diferentes, reforçando a importância do ambiente na ação deste fungo.

As espécies do gênero *Aspergillus* crescem em altas concentrações de açúcar, nutrindo-se de água extraída de substâncias relativamente secas (SCHUSTER, et al., 2002). *A. niger* cresce em ampla faixa de temperatura variando de 6 a 47 °C, sendo o ótimo de crescimento entre 35 a 37 °C, e a faixa de pH também é extremamente ampla. *A. niger* cresce em uma faixa de pH extremamente ampla, de 1,4 a 9,8 (SCHUSTER, et al., 2002). Essas habilidades e a produção profusa de conidiósporos, que são dispersos por meio do ar, asseguram a ocorrência ubíqua da espécie, com uma frequência maior em lugares quentes e úmidos (SCHUSTER, et al., 2002). A ampla faixa de pH e de temperatura, com predominância de temperaturas diurnas altas e as condições de extrema deficiência hídrica são comuns na região semiárida da Bahia, produtora de sisal, contribuindo para a ocorrência da podridão vermelha nessas regiões.

Diversos trabalhos tem revelado o sucesso das espécies de *Trichoderma* no controle de várias doenças de plantas (SHARON et al., 2001; YEDIDIA et al., 2001; OKIGBO; IKEDIUGWU, 2000; ETEBARIAN et al., 2000; BURNS; BENSON, 2000). As espécies *T. harzianum*, *T. viride* e *T. virens* são as mais descritas no controle biológico de doenças de plantas.

Para diminuir o efeito do ambiente nos agentes de controle biológico pode-se utilizar estratégias como a formulação adequada dos agentes de biocontrole, de forma a proteger os micro-organismos dos agentes externos nas fases iniciais de contato e infecção dos tecidos da planta, além da potencialização por meio da combinação de vários micro-organismos com diferentes capacidades de competição e sobrevivência no ambiente (EZZIYYANI et al., 2007; MAFIA et al., 2003).

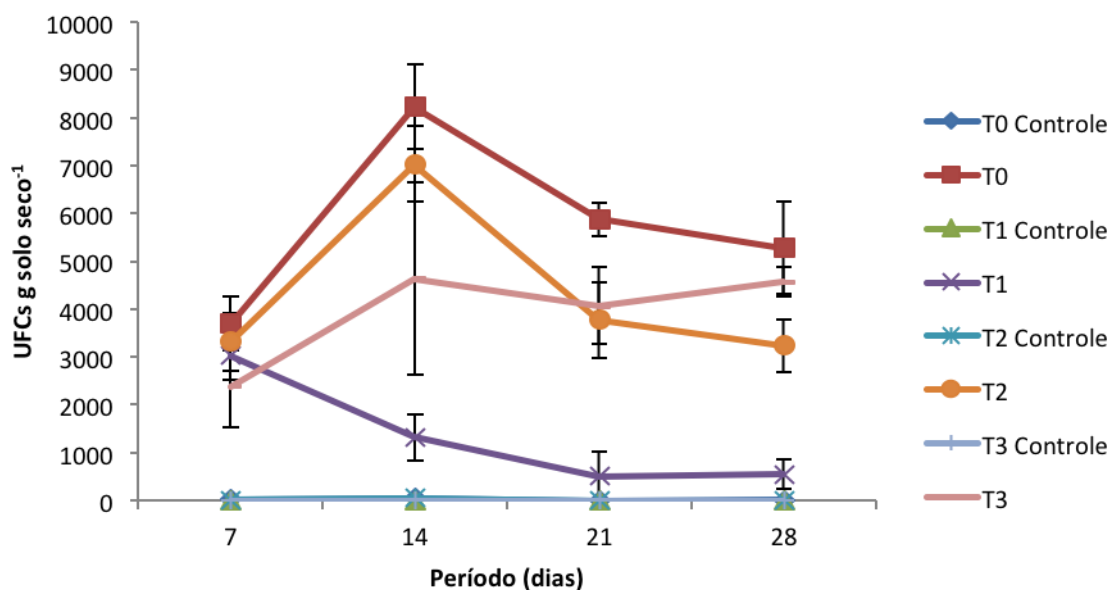
### **Avaliação da sobrevivência de *Trichoderma* em dois tipos de solo da região semiárida produtora de sisal da Bahia.**

No estudo sobre a sobrevivência de *Trichoderma harzianum*, isolado TCS34, nas diferentes amostras de solo da região semiárida produtora de sisal, com a incorporação de resíduo de sisal, foram observadas poucas variações no comportamento populacional de *Trichoderma* no período avaliado. Para os dois solos avaliados, o aumento populacional de *Trichoderma* ocorreu até os 14 dias de

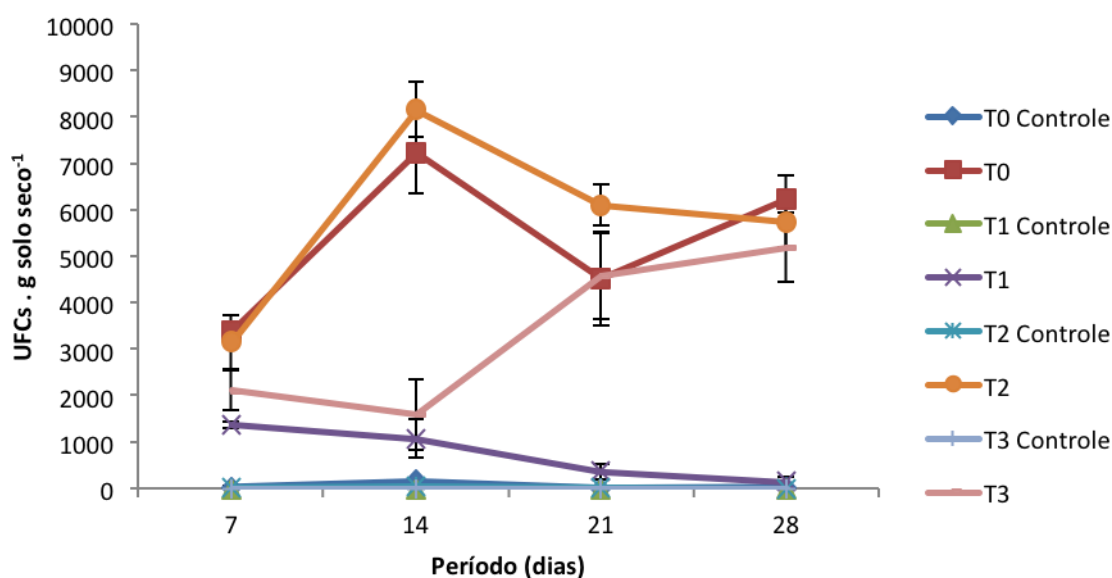
incubação do solo, que corresponde ao período de estabelecimento do fungo no solo, exceto no tratamento com o resíduo de sisal seco, que promoveu a redução da população deste fungo no solo (Figuras 6 e 7). A incorporação do resíduo de sisal ao solo foi avaliada por ser uma prática dos produtores de sisal, podendo este se constituir em uma alternativa de substrato para incorporação de *Trichoderma* e de matéria orgânica ao solo.

O resíduo seco de sisal (seco ao sol) teve efeito tóxico ao desenvolvimento de *T. harzianum* (isolado TCS34), causando diminuição drástica da sua população. É possível que a adição de água a esse substrato tenha promovido o início do processo de decomposição e a liberação de substâncias prejudiciais ao desenvolvimento do agente antagonico. Observações de campo e em laboratório indicam que o resíduo de sisal úmido entra rapidamente em processo de decomposição, causando o aumento do pH.

O decréscimo na população de *Trichoderma harzianum* também ocorreu nos dois solos com a incorporação de resíduo fresco de sisal. O resíduo fresco de sisal é muito instável, alterando rapidamente o seu pH, devido a processos microbianos e/ou químicos. Novamente, a adição de água ao solo com o substrato pode ter promovido o início do processo de decomposição, o que prejudicou o desenvolvimento de *Trichoderma*. Os resultados indicam que o resíduo de sisal não é uma boa fonte de matéria orgânica para os isolados de *Trichoderma*. Entretanto, os estudos em discos de caule de sisal indicam que *Trichoderma* coloniza os tecidos internos do caule de sisal e inibe o crescimento micelial e esporulação de *A. niger*, apresentando, portanto, o potencial de biocontrole da podridão vermelha do sisal. O resíduo de sisal é constituído por tecidos da folha de sisal, após o desfibramento. Ressalta-se que o resíduo fresco de sisal estimula o crescimento de *A. niger*, aumentando a severidade e progresso da podridão vermelha do sisal (SOUZA, 2010).



**Figura 6.** Sobrevivência de *Trichoderma harzianum* em solo argiloso da região sisaleira. **T0**: Solo sem resíduo de sisal; **T1**: Solo com resíduo seco de sisal; **T2**: Solo com resíduo decomposto e seco de sisal; **T3**: Solo com resíduo fresco de sisal.



**Figura 7.** Sobrevivência de *Trichoderma harzianum* em solo médio arenoso da região sisaleira. **T0**: Solo sem resíduo de sisal; **T1**: Solo com resíduo seco de sisal; **T2**: Solo com resíduo decomposto seco de sisal; **T3**: Solo com resíduo fresco de sisal.

De acordo com Howel (2003), alguns fatores, além do teor de matéria orgânica, a exemplo da temperatura, umidade, nutrientes, tipo de solo, microbiota, aeração e pH também afetam a sobrevivência de *Trichoderma* em solo ou substrato. As condições controladas neste experimento, em relação à umidade, temperatura,

tipo de solo e matéria orgânica não se apresentaram favoráveis à sobrevivência de *Trichoderma*.

As áreas abaixo da curva de crescimento de *Trichoderma harzianum* nos diferentes solos indicam que o resíduo de sisal seco não decomposto foi o mais prejudicial ao desenvolvimento de *Trichoderma*, tendo efeito supressivo no desenvolvimento do fungo nos solos avaliados (Tabela 5). Já o resíduo de sisal decomposto e seco causou uma redução significativa da população de *Trichoderma* apenas no solo argiloso, o que pode estar associado ao pH do solo, pois o solo argiloso estudado possuía um pH de 6,8, que com a adição do resíduo decomposto seco de sisal, que geralmente possui pH alcalino (próximo a 9), ficou com pH mais elevado do que o solo médio-arenoso que possui pH de 5,5. A maioria das espécies de *Trichoderma* não tolera pH alcalino, sendo a faixa ótima de pH para *T. harzianum* de 4,5 a 5,3, indicando que substratos ou solos alcalinos são prejudiciais ao desenvolvimento desses micro-organismos (ETHUR 2002).

**Tabela 5.** Área abaixo da curva de sobrevivência de *Trichoderma* em dois tipos de solo da região produtora de sisal do semiárido baiano.

| Tratamentos   | Solo argiloso            | Solo M-arenoso           |
|---|--------------------------|--------------------------|
| <b>T0</b> - Solo sem resíduo de sisal                       | 1,30 x 10 <sup>5</sup> a | 1,16 x 10 <sup>5</sup> a |
| <b>T1</b> - Solo + Resíduo de sisal seco não decomposto     | 2,50 x 10 <sup>4</sup> c | 1,54 x 10 <sup>4</sup> c |
| <b>T2</b> - Solo + Resíduo de sisal decomposto e seco       | 9,80 x 10 <sup>4</sup> b | 1,31 x 10 <sup>5</sup> a |
| <b>T3</b> - Solo + Resíduo fresco de sisal                  | 8,50 x 10 <sup>4</sup> b | 6,89 x 10 <sup>4</sup> b |
| Controle <b>T0</b> (sem infestação por <i>Trichoderma</i> ) | 6,00 x 10 <sup>2</sup> d | 1,40 x 10 <sup>3</sup> c |
| Controle <b>T1</b> (sem infestação por <i>Trichoderma</i> ) | 0 d                      | 4,00 x 10 <sup>2</sup> c |
| Controle <b>T2</b> (sem infestação por <i>Trichoderma</i> ) | 4,00 x 10 <sup>2</sup> d | 6,00 x 10 <sup>2</sup> c |
| Controle <b>T3</b> (sem infestação por <i>Trichoderma</i> ) | 0 d                      | 2,00 x 10 c              |

Médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem entre si segundo o teste de agrupamento de médias de Tukey a 5% de probabilidade.

As UFCs de *Trichoderma* foram maiores nos solos sem adição de resíduo, exceto quando se adicionou ao solo médio-arenoso, o resíduo decomposto e seco, que não apresentou diferença estatística em relação ao tratamento sem adição de resíduo, indicando que a adição de resíduo de sisal não favoreceu o aumento das UFCs de *Trichoderma* nos solos avaliados.

Os tratamentos controles indicam que os solos avaliados possuem uma população muito baixa de *Trichoderma*, apesar de *Trichoderma* ser um gênero de ampla distribuição no solo. Melo (1998), citado por Ethur (2008) relata que *Trichoderma* é um gênero de ampla distribuição, sendo comum sua ocorrência no mundo inteiro e em grande diversidade de solos, em especial aqueles com alto teor de matéria orgânica. Em solos tropicais pode-se encontrar de 10 a 10<sup>3</sup> UFCs de *Trichoderma* por grama de solo (HARMAN et al., 2004).

Estes resultados indicam que *Trichoderma* sobrevive nos tipos de solo avaliados, mas o resíduo de sisal aplicado ao solo não favorece o desenvolvimento de *Trichoderma*.

### **Avaliação da multiplicação e sobrevivência de *Trichoderma* em resíduo de sisal enriquecido.**

Os testes de sobrevivência de *Trichoderma* em diferentes substratos demonstraram que o fungo não sobrevive nos substratos compostos de resíduo em processo de decomposição, enriquecido com nitrato de amônio ou com glicíndia. O fungo sobrevive bem no arroz esterilizado. Contudo, o *A. niger*, agente causal da podridão vermelha, também cresce bem nesse substrato (Tabela 6).

Foram observadas poucas variações no comportamento populacional de *Trichoderma* nos diferentes substratos utilizados e no tempo avaliado. Exceto no arroz esterilizado, no qual a partir dos sete dias de adição de *Trichoderma*, observou-se um aumento significativo nas UFCs de *Trichoderma*. De acordo com Howel (2003), alguns fatores, além do teor de matéria orgânica, a temperatura, umidade, nutrientes, tipo de solo, microbiota, aeração e pH, afetam a sobrevivência de *Trichoderma* em solo ou substrato.



**Tabela 6.** Sobrevivência de *Trichoderma* em diferentes substratos. **T1:** Arroz; **T2:** Composto de resíduo de sisal (20% esterco + 10% farinha de rocha + 70% resíduo de sisal); **T3:** Resíduo de sisal em decomposição, acrescido de NO<sub>4</sub>(NO<sub>3</sub>); **T4:** Resíduo em decomposição de sisal acrescido de glicírdia e **T5:** Resíduo fresco de sisal.

| Tratamentos | Tempo (Dias)             |                          |                          |                          |                           |
|-------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|
|             | 0                        | 7                        | 14                       | 21                       | 28                        |
| T1          | 3,0 x 10 <sup>4</sup> aC | 6,0 x 10 <sup>5</sup> aC | 6,0 x 10 <sup>7</sup> aB | 1,7 x 10 <sup>8</sup> aA | 1,7 x 10 <sup>8</sup> aA  |
| T2          | 4,5 x 10 <sup>4</sup> aA | 2,7 x 10 <sup>4</sup> aA | 2,9 x 10 <sup>4</sup> bA | 3,0 x 10 <sup>4</sup> bA | 2,7 x 10 <sup>4</sup> bA  |
| T3          | 3,6 x 10 <sup>4</sup> aA | 0 aA                     | 0 bA                     | 0 bA                     | 0 bA                      |
| T4          | 4,5 x 10 <sup>4</sup> aA | 1,5 x 10 <sup>4</sup> aA | 0 bA                     | 0 bA                     | 0 bA                      |
| T5          | 6,0 x 10 <sup>3</sup> aA | 7,0 x 10 <sup>4</sup> aA | 5,4 x 10 <sup>4</sup> bA | 3,8 x 10 <sup>5</sup> bA | 3,05 x 10 <sup>5</sup> bA |

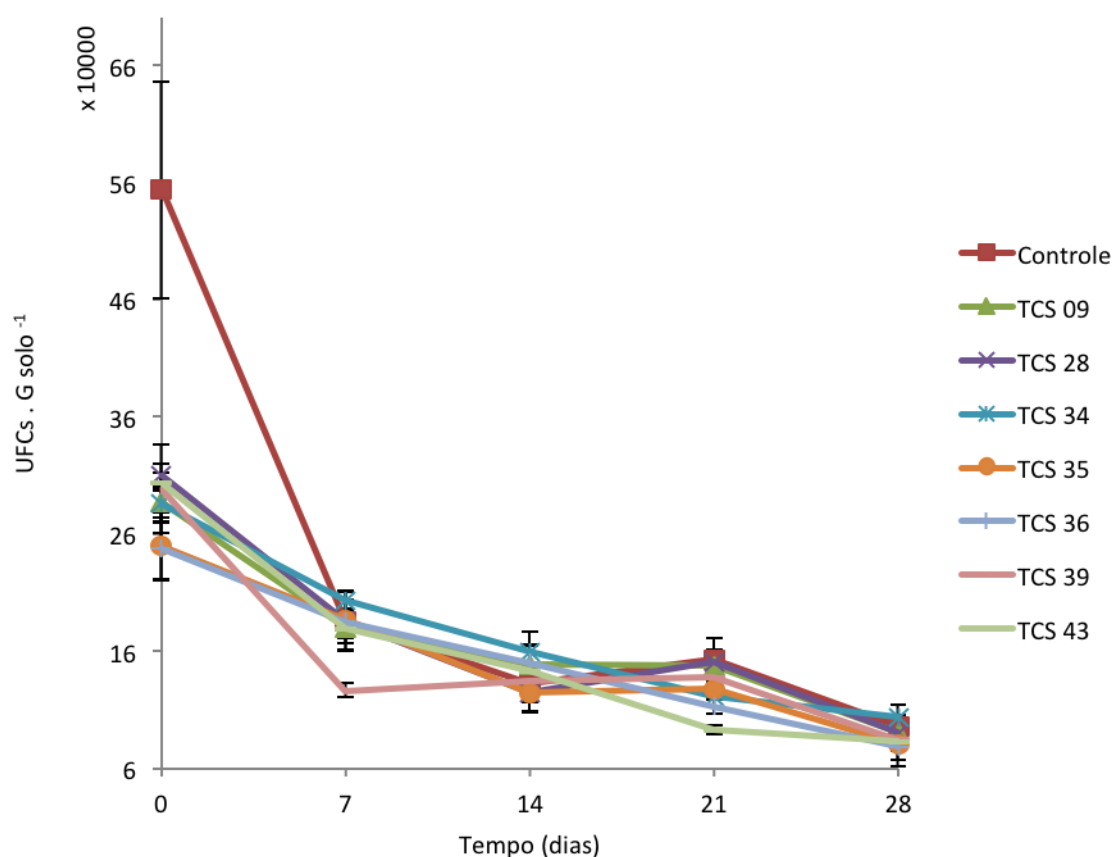
\*Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas e maiúsculas nas linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O tratamento controle, utilizando arroz parboilizado e esterilizado, foi o único que favoreceu o aumento das UFCs. Neste substrato, as UFCs aumentaram significativamente até os 21 dias de avaliação, momento a partir do qual o crescimento tendeu a estabilizar-se (Tabela 6).

*Trichoderma* não se desenvolve bem nos substratos avaliados no presente trabalho, exceto no arroz parbolizado esterilizado, que demonstrou um desenvolvimento bem superior de UFCs em comparação com os demais.

### **Avaliação da supressão de *Aspergillus niger* por isolados de *Trichoderma* em solo.**

A atividade supressiva de *Trichoderma* a *A. niger* foi considerada muito baixa, sendo esta semelhante ao controle somente com *A. niger* (Figura 8).



**Figura 8.** Sobrevivência de *A. niger* em solo argiloso da região sisaleira, em presença de *Trichoderma* spp. Controle (Apenas *A. niger*); *T. Viride* (isolado TCS09; *T. Virens* isolado TCS28; *T. Harzianum* isolado TCS34; *T. Harzianum* isolado TCS 35; *T. Harzianum* isolado TCS36; *T. Virens* isolado TCS39; *T. Virens* isolado TCS43.

No tratamento controle (solo infestado com *A. niger*, sem *Trichoderma*), *A. niger* apresentou uma população inicialmente mais elevada, em termos de UFCs do patógeno e, após sete dias, reduziu de forma significativa, demonstrando que *A. niger* possui baixa sobrevivência no solo, nas condições do experimento. A partir de 14 dias de avaliação, as flutuações populacionais de *A. niger* passaram a ser menores (Figura 8).

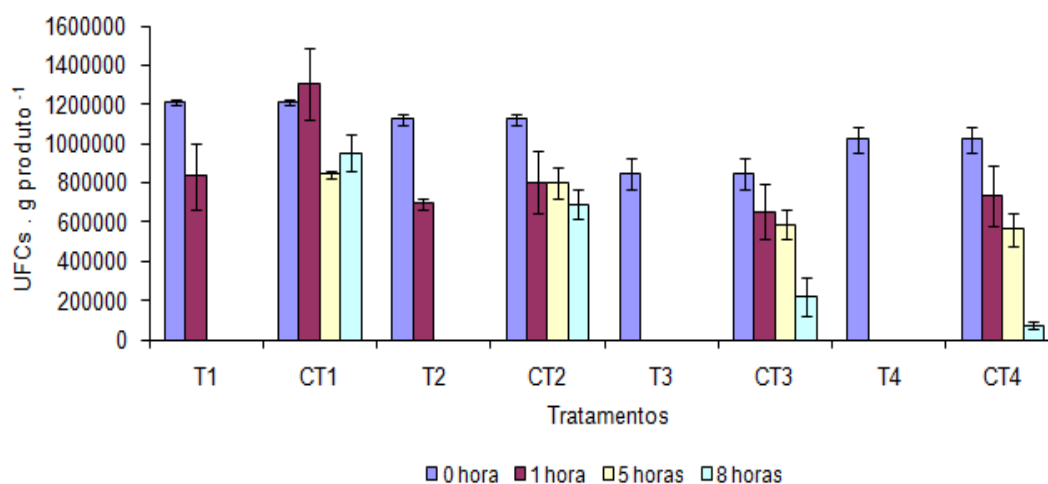
Os tratamentos que combinaram *A. niger* e os diferentes isolados de *Trichoderma* demonstraram comportamento semelhante ao do controle apenas com *A. niger*, diferindo apenas pela população inicial de *A. niger*, a qual se apresentou diferente no controle e nos demais tratamentos, apesar do solo ter sido infestado com a mesma quantidade de inóculo. A partir dos sete dias de avaliação, as UFCs de *A. niger* iniciaram crescente queda. Os valores da área abaixo da curva demonstraram não existir diferença significativa entre os diversos isolados de

*Trichoderma* avaliados para a redução da população de *A. niger* no solo, exceto se considerarmos o número de UFCs inicial do tratamento controle. Sem a sobrevivência do *A. niger* no solo não foi possível avaliar o efeito do *Trichoderma* na população de *A. niger* no solo (Figura 8).

### Elaboração e avaliação de formulação de *Trichoderma*

A avaliação da formulação de *Trichoderma* com utilização de resíduo de sisal com 10% de umidade e com adição de 1% de carboximetil celulose e protetor solar demonstrou que o protetor solar foi eficiente até o período de uma hora de exposição direta ao sol. A partir de cinco horas de exposição ao sol, não houve sobrevivência de *Trichoderma* em nenhum dos tratamentos avaliados (Figura 9).

Os tratamentos com protetor solar, mantidos a temperatura ambiente, no laboratório, apresentaram um maior número de unidades formadoras de colônia (UFCs) que os demais. Possivelmente, houve um efeito positivo da adição dos micronutrientes presentes no protetor solar, principalmente o zinco, na sobrevivência de *Trichoderma* na formulação.



**Figura 9.** Avaliação de formulações de *Trichoderma* quando expostas ao sol por períodos de tempo de 1, 5 e 8 horas. **T1**-10% de umidade + protetor fator 30 FPS. **T2**-10% de umidade + protetor fator 30 FPS + carboximetilcelulose a 1%. **T3**-10% de umidade. **T4**-10% de umidade + carboximetilcelulose a 1%.

A redução das UFCs ao longo do tempo nos tratamentos controle (sem exposição ao sol) revelou a existência de efeito negativo do resíduo de sisal na viabilidade dos esporos de *Trichoderma*, principalmente nos tratamentos sem protetor solar.

A proteção à radiação é necessária para a aplicação de *Trichoderma* no campo, devido a elevada radiação solar na região semiárida e o efeito negativo desta na viabilidade dos esporos do agente de biocontrole que necessita atingir a planta e o solo, germinar e colonizar os tecidos da planta, para que tenha ação contra o fitopatógeno. Segundo Braga et al., (2002), o aumento da radiação UV-B solar pode afetar significativamente os micro-organismos que têm importantes papéis na agricultura, como os antagonistas de patógenos de plantas.

Como ocorreu proteção dos esporos por um período de uma hora, a utilização do protetor solar pode ser viável, se a aplicação do formulado com essa proteção for realizada em horário de baixa radiação solar, no final do dia, melhorando a eficiência do produto.

Vários trabalhos realizados com *Trichoderma* têm demonstrado o sucesso de formulações com arroz esterilizado, existindo produtos comerciais com essas formulações (ETHUR et al., 2008). O resíduo de sisal teve um efeito negativo na sobrevivência de *Trichoderma*. Entretanto, a elaboração de uma formulação com arroz e protetor solar, pode ser uma alternativa para garantir a esporulação e a viabilidade dos esporos de *Trichoderma*.

## CONCLUSÕES

Foram identificadas sete espécies de *Trichoderma* de amostras de solo da região sisaleira da Bahia.

Os isolados de *Trichoderma* avaliados não controlam a população de *A. niger* no solo.

O resíduo oriundo do desfibramento do sisal é prejudicial ao desenvolvimento de *Trichoderma*.

O arroz esterilizado foi o melhor substrato para multiplicação e formulação de *Trichoderma*.

A utilização de resíduo de sisal com 10% de umidade e com adição de 1% de carboximetil celulose e protetor é eficiente em manter a viabilidade dos esporos expostos ao sol, por um período de uma hora.

A eficiência dos isolados de *Trichoderma* na redução da severidade da doença depende das condições ambientais.

Um isolado de *T. viride* (isolado TCS09), três de *T. virens* (isolados TCS28, TCS39, TCS43) e um de *T. harzianum* (isolado TCS35), promoveram o controle da podridão vermelha do sisal em mudas inoculadas nas condições de Conceição do Coité-BA.

Seis isolados de *T. harzianum* (isolados TCS76, TCS45, TCS30, TCS06, TCS42, TCS10), um *T. longibrachiatum* (isolado TCS15), três *T. erinaceum* (isolados TCS19, TCS73, TCS75) e um de *T. viride* (isolado TCS14) promoveram o controle da podridão vermelha do sisal em mudas inoculadas nas condições de Ouriolândia-BA.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, K. C. L. de M. **Epidemiologia da podridão vermelha do sisal no Estado da Bahia**. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, 2010.

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v.25, p.3389-3402, 1997.

BADRI, D. V.; WEIR, T. L.; LELIE, D. V. D.; VIVANCO, J. M. Rhizosphere chemical dialogues: plant–microbe interactions. **Current Opinion in Biotechnology**, v.20, p.642–650, 2009.

BARAKAT, R. M.; Al-Mahareeq, FADEL.; AL- MASRI, M. I. Biological Control of *Sclerotium rolfsii* by Using Indigenous *Trichoderma* spp. Isolates from Palestine. **Hebron University Research Journal**, v.2, n.2, p.27 – 47, 2006.

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

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

BETTIOL, W.; MORANDI, M, A, B. Controle Biológico de Doenças de Plantas no Brasil. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M, A, B.(Eds) **Biocontrole de Doenças de plantas: usos e perspectivas**. Embrapa, 2009, 341p.

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

BISSETT, J.; SZAKACS, G.; NOLAN, C. A.; DRUZHININA, I.; GRADINGER, C.; KUBICEK, C. P. New species of *Trichoderma* from Asia. **Canadian Journal of Botany**, v.81, p.570-586, 2003

BRAGA, G. U. L.; RANGEL, D. E. N.; FLINT, S. D.; MILLER, C. D.; ANDERSON, A. J.; ROBERTS, D W. Damage and recovery from UV-B exposure in conidia of the entomopathogens *Verticillium lecanii* and *Aphanocladium album*. **Mycologia**, v. 94, n. 6, p. 912-920, 2002.

BURNS, J. R.; BENSON, D. M. Biocontrol of damping-off of *Catharanthus roseus* caused by *Pythium ultimum* with *Trichoderma virens* and binucleate *Rhizoctonia* fungi. **Plant Disease**, v.84, n.6, v.644-648, 2000.

CHAVERRY, P.; CASTLEBURY, L. A.; OVERTON, B. E.; SAMUELS, G. J. *Hypocrea/Trichoderma*: Species with conidiophore elongations and green conidia. **Mycologia**, V.95, p.1100-1140, 2004

CNA. **Sisal: problemas e soluções**. Disponível em: <<http://www.cna.org.br/Indice%20Assuntos/sisal1.htm>>. Acesso em: 20/08/2010.

CORDIER, C.; ALABOUVETTE, C. Effects of the introduction of a biocontrol strain of *Trichoderma atroviride* on non-target soil micro-organisms. **European Journal of Soil Biology**, v.45, n.3, p.267-274, 2009.

COUTINHO, W. M.; LUZ, C. M.; SUASSUNA, N. D.; SILVA O. F. E.; SUINAGA, F. A. **A podridão vermelha do tronco do Sisal**, EMBRAPA, 2006.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v.19, n.1, p.11-15, 1987

DRUZHININA, I. S.; KOPTCHINSKI, A. G.; KOMOM, M.; BISSETT, J.; SZAKACS, G.; KUBICEK, C. P. An oligonucleotide barcode for species identification in *Trichoderma* and *Hypocrea*. **Fungal Genetics and Biology**, v.42, p.813-828, 2005.

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

ETHUR, L. Z. **Avaliação de fungos como antagonistas para o biocontrole de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary em pepineiro cultivado em estufa.** Dissertação de Mestrado (Mestrado em Agronomia). Santa Maria : UFSM, 2002, 100p.

ETHUR, L. Z. et al. Presença dos gêneros *Trichoderma* e *Fusarium* em solo rizosférico e não rizosférico cultivado com tomateiro e pepineiro, em horta e estufa, **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.1, p.19-26, 2008.

EZZIYYANI, M.; REQUENA, M. E.; EGEA-GILABERT, C.; CANDELA, M. E. Biological control of *phytophthora* root rot of pepper using *Trichoderma harzianum* and *Streptomyces rochei* in combination. **Phytopathology**, v.155, p.342–349,2007.

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

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

HOOPEN, G. MARTIJN TEN.; KUATÉ, J.; ADIOBO, A.; NGONKEU, M. E. L.; AMBANG, Z.; AKOA, A., TONDJE, P.R.; BEGOUD, B. A. D. *Trichoderma asperellum*: A potential biocontrol agent for *Pythium myriotylum*, causal agent of cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium*) root rot disease in Cameroon. **Crop Protection**, v.36, p.18-22, 2012.

HOWELL, C. R. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. **Plant Disease**, v.87, n.1, p.4-10, 2003.

IDR (Instituto de desenvolvimento da região do sisal). **Cadeia Produtiva de Sisal.** Disponível em:<<http://www.idrsisal.org.br/sisal/17.php>> (Acesso em: 20/08/2010)

JOHN, R. P.; TYAGI, R. D.; PRÉVOST, D.; BRAR, S. K.; POULEUR, S.; SURAMPALLI, R.Y. Mycoparasitic *Trichoderma viride* as a biocontrol agent against *Fusarium oxysporum* f. sp. *adzuki* and *Pythium arrhenomanes* and as a growth promoter of soybean. **Crop protection**, v.29, n.12, p.1452-1459, 2010.

KOPCHINSKIY, A.; KOMON, M.; KUBICEK, C. P.; DRUZHININA, I. S. TrichoBLAST: a multilocus database for *Trichoderma* and *Hypocrea* identifications. **Mycological Research**, v.109, p.658-660, 2005.

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

LU, B. S.; DRUZHININA, I. S.; FALLAH, P.; CHAVERRI, P.; GRADINGER, C.; KUBICEK, C. P.; SAMUELS, G. J. *Hypocrea/Trichoderma* species with

pachybasium-like conidiophores: Teleomorphs for *T. minutisporum* and, *T. polysporum*, and their newly discovered relatives. **Mycologia**, v.96, p.310-342, 2004.

LUCATERO, S.; GALINDO, E.; LARRALDE-CORONA, C. P. Quantitative characterisation of the morphology of *Trichoderma harzianum* cultured in shake-flasks and containing Tween40. **Biotechnology Letters**, v.2, p.41-44, 2004.

MAFIA, R.; ALFENAS, A. C.; MAFFIA, L. A.; VENTURA, G.; SANFUENTES, E. A. Encapsulamento de *Trichoderma inhamatum* para o controle biológico de *Rhizoctonia solani* na propagação clonal de Eucalyptus. **Fitopatologia brasileira**, 28, n.1, p.101-105, 2003.

MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B.; GOMES, A. M. A. Controle biológico de doenças radiculares. In: MICHEREFF, S.J.; ANDRADE, D.E.G.T.; MENEZES, M. (Eds.) **Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais**. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2005. p.303-322.

MCKINNEY, H. H. 1923. Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. **Journal of Agricultural Research**, Washington, v. 26, p.195-218, 1923.

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

NAGY, V.; SEIDL, V.; SZAKACS, G.; KOMON-ZELAZOWSKA, M.; KUBICEK, C. P.; DRUZHININA, I. S. Application of DNA bar codes for screening of industrially important fungi: the haplotype of *Trichoderma harzianum* sensu stricto indicates superior chitinase formation. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, p.7048-7058, 2007.

OKIGBO, R. N.; IKEDIUGWU, F. E. O. Studies on biological control of postharvest rot in yams (*Dioscorea* spp.) using *Trichoderma viride*. **Journal of Phytopathology**, v.148, p.351-355, 2000.

RAIJ, B. van; ANDRADE, J. C.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. A. **Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais**. Campinas Instituto Agrônômico, 2001. 285p.

SÁ, J. O de. **Patogênese de *Aspergillus niger* e biocontrole da podridão vermelha do sisal por *Trichoderma* spp.**, 2009. 53 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2009.

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

SCHMITZ, A.; RIESNER, D. Purification of nucleic acids by selective precipitation with polyethylene glycol 6000. **Analytical Biochemistry**, v.354, p.311-313, 2006.



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

SHANER, G.; FINNEY, R. E. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in knox wheat. **Phytopathology**, v.70, n.1, p.1183-1186, 1977.

SHARON, E.; BAR-EYAL, M.; CHET, I.; HERRARA-ESTRELLA, A.; KLEIFELD, O.; SPIEGEL, Y. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. **Biological Control**, v.91, n.7, p.687-693, 2001.

SHOUKOUHI, P.; BISSETT, J. (2008). **Preferred primers for sequencing the 5' end of the translation elongation factor 1-alpha gene (eEF1a1)**. Disponível em: <<http://www.isth.info/methods>> Acesso em 15 /11/2011.

SILVA, J. R. Q. **Agente etiológico da podridão vermelha do sisal: Densidade populacional, sobrevivência, caracterização genética e de agressividade**. 2012. 98 f. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2012a.

SILVA, M. H. S. da. **Aspectos bioecológicos de *Aspergillus niger*, fungo causador da podridão vermelha do sisal**, 2012. 86 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2012b.

SOARES, A.C.F.; SOUSA, C. da S.; GARRIDO, M. da S.; PEREZ, J. de O. Production of *Streptomyces* inoculum in sterilized rice. **Scientia Agricola**, v. 64, p. 641-644, 2007

SOUZA, L. S. S.. **Extratos aquosos de alho (*Allium sativum* L.) e sisal (*Agave sisalana* Perrine) no controle de *Aspergillus niger* e da podridão vermelha do sisal**, 2010, 91f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2010.

WHITE T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. (Eds) **PCR Protocols: a guide to methods and applications**. Academic Press, New York, USA, p.315-322, 1990.

WILLIAMS, J.; CLARKSON, J. M.; MILLS, P. R.; COOPER, R. M. A Selective Medium for Quantitative Reisolation of *Trichoderma harzianum* from *Agaricus bisporus* Compost. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, n.7, p. 4190–4191, 2003.

YEDIDIA, I.; SRIVASTVA, A. K.; KAPULNIK, Y.; CHET, I. Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and growth of cucumber plants. **Plant and Soil**, v.235, p.235-242, 2001.

## **CAPÍTULO 2**

### **BIOCONTROLE DA PODRIDÃO VERMELHA DO SISAL (*Agave sisalana* Perrine) COM ACTINOBACTÉRIAS**

## **BIOCONTROLE DA PODRIDÃO VERMELHA DO SISAL (*Agave sisalana* Perrine ) COM ACTINOBACTÉRIAS**

Autores: Jefferson Oliveira de Sá; Ana Cristina Fermino Soares; Ana Claudia Souza Campos Sacramento; Cristiano Oliveira do Carmo

**RESUMO:** O sisal (*Agave sisalana* Perrine) é uma planta que ocupa uma extensa área na região semiárida dos Estados da Bahia, Paraíba e Rio Grande do Norte, com grande importância na geração de emprego e renda da região nordestina. Essa cultura vem sendo afetada pela podridão vermelha do caule do sisal causada por *Aspergillus niger*. O controle biológico pode se constituir num importante método de controle desta doença, sendo as actinobactérias potenciais agentes de biocontrole. O objetivo do trabalho foi avaliar o potencial de isolados de actinobactérias no controle de *A. niger*, em condições de laboratório, por meio de ensaios em meio de cultura e em segmentos de caule de sisal, no controle da doença em mudas no campo (em dois municípios) e na supressão do patógeno em dois tipos de solo da região sisaleira. Adicionalmente, verificou-se o potencial de multiplicação das actinobactérias em diferentes resíduos de sisal. A ação antagônica das actinobactérias a *A. niger* foi observada quando avaliadas sobre o caule de sisal. Os isolados AC08, AC12, AC15 e AC16 inibiram o crescimento de *A. niger* em 60% dos fragmentos de caule inoculados, porém as actinobactérias não demonstraram antagonismo nos experimentos em meio de cultura. Os isolados AC12 e AC92 promoveram uma redução na severidade e incidência da doença em mudas de sisal, nas condições edafoclimáticas de Ourorândia-BA, observando-se uma redução na incidência de 66,67% e 50%, respectivamente. No município de Conceição de Coité, nenhuma actinobactéria foi eficiente na redução da doença. As actinobactérias não controlaram a população de *A. niger* nos solos avaliados. O resíduo de sisal oriundo do desfibramento da folha, quando em processo de decomposição, tem efeito tóxico às actinobactérias não sendo recomendado para multiplicação desses micro-organismos.

**Palavras-chaves:** *Streptomyces* spp.; Controle biológico; semiárido

## BIOCONTROL OF SISAL (*Agave sisalana* Perrine) RED ROD DISEASE BY ACTINOBACTERIA

Authors: Jefferson Oliveira de Sá; Ana Cristina Fermino Soares; Ana Claudia Souza Campos Sacramento; Cristiano Oliveira do Carmo

**ABSTRACT:** Sisal (*Agave sisalana* Perrine) is a plant that occupies a large area in the semiarid region of the States of Bahia, Paraíba and Rio Grande do Norte, with significant impact on employment and income generation in the Northeast of Brazil. This crop is being affected by sisal stem red rot disease, caused by *Aspergillus niger*. Biological control can represent an important control method and actinobacteria have great potential for control of plant diseases. The objective of this study was to evaluate the potential of isolates of actinobacteria to control *A. niger* in laboratory conditions, in growth culture media and in sisal stem tissue, to control this disease in two field conditions, and to evaluate its effect in suppression of the pathogen in the soil. Additionally, the potential for multiplication of actinobacteria in sisal residue was evaluated. The antagonistic action of actinobacteria against *A. niger* was observed on stem tissue of sisal plants. Isolates AC08, AC12, AC15, and AC16 inhibited growth of *A. niger* in 60% of inoculated sisal stem tissue, but these isolates did not show antagonism in cultures grown in solid growth media. Isolates AC 12, and AC 92 promoted a reduction in disease severity and incidence in sisal plants, in environmental conditions of Ourorândia-BA. A reduction in disease incidence of 66.67% and 50% was observed for treatments with isolates AC 12 and AC 92, respectively. In the municipality of Conceição do Cite, none of the actinobacteria showed efficiency for disease reduction. Actinobacteria did not cause a reduction in the population of *A. niger* in soil. Sisal residue from leaf decortication, when in process of decomposition, has a toxic effect on actinobacteria and should not be recommended for actinobacteria growth.

**Keywords:** *Streptomyces* spp.; Biological control; semiarid

## INTRODUÇÃO

O Brasil é o país que mais produz e exporta fibra de sisal no mundo e o Estado da Bahia é o maior produtor de sisal do Brasil, com aproximadamente 94% da produção nacional (SINDIFIBRAS, 2010). A cultura do sisal tornou-se uma alternativa de renda para os pequenos produtores, uma vez que as condições de solo e clima da região semiárida nordestina impossibilitam outros cultivos. A cadeia produtiva do sisal representa uma das melhores alternativas de desenvolvimento para o semiárido baiano, uma das regiões mais secas e mais pobres do Nordeste brasileiro (IDR, 2007).

Entretanto, o sisal vem sendo afetada pela podridão vermelha do caule, o principal problema fitossanitário do sisal na Bahia, que vem causando nas últimas três décadas um declínio contínuo da área cultivada e da produtividade do sisal (ABREU, 2010). A doença causa a descoloração avermelhada dos tecidos internos do caule, até a base das folhas. As folhas ficam amareladas e murcham, o caule apodrece e se desprende facilmente do solo, levando a planta à morte (LIMA et al., 1998).

O fungo *Aspergillus niger* foi identificado como o agente causal da podridão vermelha do sisal (SILVA, 2012a; SILVA, 2012b; SILVA; COUTINHO, 2006). Atualmente, sabe-se que existem diversas espécies de *Aspergillus* semelhantes e algumas são indistinguíveis de *A. niger* por meio do uso de caracteres morfológicos (GIRAUD et al., 2007). Silva, (2012a) identificou por meio de métodos moleculares que várias espécies da seção Nigri do gênero *Aspergillus*, a exemplo de *Aspergillus japonicus* e *Aspergillus terreus* causam sintomas de podridão vermelha do caule em mudas de sisal, em condições de casa de vegetação. Entretanto, no campo, o sintoma de podridão vermelha do caule de sisal está sempre associado a *A. niger* (SILVA, 2012b).

Embora seja fatal para a cultura, plantas de sisal com sintomas de podridão vermelha podem sobreviver por algum tempo, em função do apodrecimento do caule ocorrer de forma lenta (BOCK, 1965 citado por SILVA; COUTINHO, 2006).

O estabelecimento de métodos de controle da doença é de importância vital para a economia da região sisaleira, visto que esta doença causa a morte da planta e a sua disseminação poderá inviabilizar o cultivo do sisal no Brasil, comprometendo toda a cadeia produtiva. O controle biológico da podridão vermelha deve ser

explorado, por se constituir em uma alternativa com potencial para controle de fungos habitantes do solo (BETTIOL; MORANDI, 2009).

A busca por micro-organismos benéficos, agentes de controle biológico, como alternativa para aumentar a produtividade de plantas e melhorar o seu estado fitossanitário, vem sendo um dos principais objetivos da pesquisa agrícola nas últimas décadas. Dentre estes micro-organismos, as actinobactérias (procariotas gram-positivos) apresentam grande potencial para o biocontrole (CARRER FILHO et al., 2009) por serem eficientes contra vários fungos patogênicos de plantas, controlando esses fungos por diversos mecanismos, tais como hiperparasitismo (EL-TARABILY; SIVASITHAMPARAM 2005), antibiose (EL-TARABILY; SIVASITHAMPARAM, 2005; XIAO et al., 2002), degradação enzimática da parede celular de fungos (EL-TARABILY; SIVASITHAMPARAM, 2005) e indução de resistência em plantas (HASSANIN et al. 2007).

Além de colonizar muito bem o solo e o rizoplane, as actinobactérias apresentam a capacidade de promoverem o crescimento de plantas e proteger as raízes contra os agentes patogênicos (BENIZRI et al., 2001).

O objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial de isolados de actinobactérias da coleção de micro-organismos do laboratório de Fitopatologia e Microbiologia Agrícola da UFRB para o controle da podridão vermelha do sisal e supressão de *A. niger* no solo. Adicionalmente será avaliado a possibilidade de multiplicação das actinobactérias no resíduo de sisal.

## MATERIAL E MÉTODOS

### **Efeito do(s) metabólito(s) secundário(s) das actinobactérias no crescimento micelial e germinação de esporos de *A. niger*.**

Cinco isolados de actinobactérias da coleção de micro-organismos do laboratório de Microbiologia Agrícola da UFRB, codificados como AC16, AC19, AC19 GNANE, AC24 e AC92, já testados quanto à atividade de quitinase, xilanase e celulase e pré selecionadas como agentes com potencial de biocontrole de doenças de plantas, foram multiplicados em meio de cultura AGS (Arginina, Glicerol, Sais) (POTER et al., 1960) líquido, em frascos de Erlenmeyer e incubados a temperatura ambiente, em mesa agitadora orbital, sob agitação de 140 rpm, durante 14 dias.

Após esse período de crescimento das culturas, a suspensão foi centrifugada a 4000 rpm por 30 minutos e o sobrenadante recolhido, retirando assim, as células das actinobactérias, restando apenas o meio líquido com os metabólitos produzidos pelos micro-organismos, que foram armazenados em freezer a -4°C.

Para a avaliação do crescimento micelial de *A. niger*, quatro concentrações do meio líquido contendo os metabólitos foram adicionadas ao meio BDA (batata, dextrose, ágar) morno, no momento de verter em placas de Petri, para obtenção da concentração final de 0, 10, 20, 30% v/v, sendo o meio agitado e vertido nas placas de Petri, conforme descrito em Soares et al., (2009). Posteriormente, fez-se o semeio de *A. niger* no meio de cultura, com auxílio de uma alça de platina, raspando-se a superfície da colônia de *A. niger* (crescido em meio BDA por aproximadamente sete dias) e tocando a alça com esporos no centro da placa.

Para avaliação do diâmetro da colônia, utilizou-se régua milimetrada, medindo-se a cada dois dias, até a colônia do tratamento controle (apenas meio BDA) atingir as bordas da placa de Petri. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três repetições.

Ao final das medições do diâmetro das colônias, realizou-se a contagem de esporos produzidos pelo fungo, após a adição de 20 mL de água destilada esterilizada com duas gotas de Tween 20<sup>®</sup>, seguida de raspagem da cultura com alça de Drigalski para obtenção da suspensão de esporos. A contagem foi feita em câmara de Neubauer com auxílio de um microscópio ótico com aumento de 40 vezes.

Para avaliar a inibição da germinação de esporos foram adicionados 150 µL de suspensão de esporos de *A. niger* na concentração  $10^6$  conídios.mL<sup>-1</sup> e 150 µL do meio contendo o metabólito secundário das actinobactérias em poços de placa de Elisa. O tratamento controle consistiu do meio líquido AGS sem o crescimento dos microrganismos. A avaliação da germinação de esporos de *A. niger* foi iniciada 36 horas após a incubação, por meio da contagem aleatória de 200 esporos, quando o tratamento controle apresentou 50% de esporos germinados, momento em que todos os tratamentos receberam uma gota de lactofenol azul para paralisação da germinação. Foi considerado como esporo germinado aquele cujo tubo germinativo atingia comprimento superior ao dobro do diâmetro do esporo. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado sendo avaliados os metabólitos

produzidos por cinco isolados de actinobactérias + controle (apenas AGS), com três repetições.

### **Seleção de actinobactérias em segmentos de caule de sisal**

Para a obtenção da suspensão de actinobactérias, estas foram multiplicadas em meio AGS sólido por 14 dias, com posterior adição de 20 mL de água destilada esterilizada a cada placa de Petri. Após a adição de água, foi realizada a raspagem superficial das colônias com alça de Drigalsky, para a obtenção de uma suspensão de actinobactérias. Para obtenção da suspensão de esporos de *A. niger*, placas de Petri com meio BDA contendo culturas de *A. niger* crescidas por sete dias foram utilizadas semelhante ao descrito com as actinobactérias, porém a concentração de esporos de *A. niger* foi calibrada para  $10^7$  conídios mL<sup>-1</sup> com auxílio de câmara de Neubauer e microscópio ótico.

Para a seleção desses isolados quanto ao antagonismo a *A. niger*, segmentos de tecido interno de caule de sisal em forma de discos de 1,7 cm de diâmetro x 0,5 cm de altura foram cortados, lavados e desinfestados em álcool 70 % e hipoclorito de sódio 1 %, ambos por cinco minutos, seguido de três lavagens com água destilada e esterilizada. Posteriormente, os segmentos do caule foram colocados em copos de plástico (capacidade para 100 mL) descartáveis, contendo uma fina camada de papel toalha esterilizado no fundo. Os segmentos de caule foram inoculados com 1 mL da suspensão de actinobactérias, exceto o controle que recebeu 1 mL de água destilada esterilizada. Os ensaios foram incubados a temperatura ambiente (28<sup>o</sup>C) por três dias. Após o período de incubação, os segmentos de caule foram inoculados com 1 mL da suspensão de esporos de *A. niger*, sendo incubados novamente a temperatura ambiente por um período de 10 dias. Os tratamentos consistiram de 14 isolados de actinobactérias (isolados AC02, AC08, AC12, AC15, AC16, AC19, AC21, AC22, AC26, AC46, AC50, AC52, AC92, AC103). O controle positivo foi composto por segmentos de caule não inoculados, com o propósito de verificar a eficiência do processo de desinfestação dos discos de caule. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com cinco repetições.

Após incubação, os discos do caule foram avaliados quanto à presença de crescimento micelial e esporulação de *A. niger* sobre os discos de caule inoculados.



### Supressão de *A. niger* por actinobactérias em diferentes solos

Amostras compostas de dois solos da região sisaleira foram retiradas identificadas e enviadas ao laboratório de solos da USP-ESALQ, onde foram analisadas, em conformidade com o manual de análises do Instituto Agrônomo de Campinas-IAC (RAIJ et al., 2001) (Tabela 1).

**Tabela 1.** Características químicas das amostras de solo coletadas nos municípios de Jacobina (Solo Argiloso) e Conceição do Coité (Solo Médio-arenoso).

| Macronutrientes      |     |     |    |     |     |    |      |       |       |    |
|----------------------|-----|-----|----|-----|-----|----|------|-------|-------|----|
| Solos                | pH  | M.O | P  | K   | Ca  | Mg | H+Al | SB    | CTC   | V  |
| <b>S1(Argiloso)</b>  | 6,8 | 24  | 13 | 6,4 | 128 | 16 | 13   | 150,9 | 164,3 | 92 |
| <b>S2(M-arenoso)</b> | 5,5 | 37  | 7  | 0,9 | 45  | 28 | 22   | 73,7  | 95,9  | 77 |

| Micronutrientes      |      |     |    |      |      |    |      |
|----------------------|------|-----|----|------|------|----|------|
| Solos                | B    | Cu  | Fe | Mn   | Zn   | Na | Si   |
| <b>S1(Argiloso)</b>  | 0,56 | 0,9 | 7  | 28,3 | 1,1  | 4  | 25,6 |
| <b>S2(M-arenoso)</b> | 0,36 | 0,7 | 38 | 15,8 | 2,96 | 20 | 12,1 |

Unidades: M.O. ( $\text{g.dm}^{-3}$ ); P ( $\text{mg.dm}^{-3}$ ); K, Ca, Mg, H+Al, SB e T ( $\text{mmolc.dm}^{-3}$ ); V %. B; Cu, Fe, Mn, Zn, Na e Si ( $\text{mg.dm}^{-3}$ ). Métodos: pH em  $\text{CaCl}_2$  (acidez ativa) -  $\text{CaCl}_2$   $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$ ; M.O.- Dicromato/Colorimétrico; Fósforo, Potássio, Cálcio e Magnésio - Resina trocadora de íons; H+Al (acidez potencial) - pH SMP; Boro - água quente/microondas; Cu, Fe, Mn e Zn - extração DTPA - TEA em pH 7,3; Na - extração duplo ácido; Si - extração  $\text{CaCl}_2$   $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$ .

As amostras dos solos das áreas produtoras de sisal foram acondicionadas em recipientes plásticos com capacidade para 100 mL. As sub-amostras de solo foram infestadas com 3 mL de suspensão dos isolados de actinobactérias (AC26, AC50 e AC92). Esta suspensão foi obtida por adição de 50 mL de água destilada esterilizada à cultura de actinobactéria crescida em frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 20 g de arroz umedecido e esterilizado em autoclave por 50 minutos.

Após o período de incubação de sete dias a temperatura ambiente, foram adicionados 3 mL de suspensão de esporos de *A. niger* na concentração de  $10^7$  conídios  $\text{mL}^{-1}$  nas sub-amostras de solo, em cada recipiente, sendo estes incubados como descrito anteriormente. Adicionou-se 20% de água em todos os tratamentos, determinando-se a umidade inicial, com base no peso com reposição periódica com pesagem das amostras e adição de água destilada esterilizada.

Sub-amostras de solo foram retiradas a cada sete dias por um período de 30 dias e submetidas à diluição seriada e plaqueamento em meio BDA com 6% de NaCl e 1 mL L<sup>-1</sup> de Tormicina, com incubação por cinco dias a temperatura ambiente. Fez-se a contagem das UFCs e foi calculado o número UFCs de *A. niger* por grama de solo.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três tratamentos (AC26, AC50 e AC92), um controle positivo (solo não infestado) e um controle negativo (infestação do solo com *A. niger*), com três repetições. As áreas abaixo das curvas (AAC) geradas foram calculadas pela fórmula descrita por Shaner; Finney (1977):

$$AAC = \sum_{i=1}^n [(Y_{i+1} + Y_i)/2] \times [(T_{i+1} - T_i)]$$

Onde: n é o número de observações;  $Y_i$  é o número de UFCs g solo<sup>-1</sup> na “i”-ésima observação;  $T_i$  é o tempo em dias na “i”-ésima observação.

Os dados foram comparados pelo teste de comparação de médias de Tukey a 5% de probabilidade.

### **Multiplicação e sobrevivência de actinobactéria no resíduo de sisal**

A multiplicação e a sobrevivência de um isolado de actinobactéria foi avaliada em resíduo de sisal seco decomposto e não decomposto. Amostras de 20 g de resíduo de sisal foram colocadas em frascos de Erlenmeyer de 250 ml e esterilizadas em autoclave, a 121 °C por 30 minutos. Posteriormente, as amostras de resíduo foram infestadas com actinobactéria (isolado AC26) pela adição de 10 mL de suspensão de esporos, obtida conforme descrito acima, com homogeneização periódica. A cada sete dias, foi retirada uma alíquota de 1 g para quantificação das actinobactérias por meio da técnica de diluição seriada e plaqueamento em meio AGS sólido. A quantificação das UFC foi realizada como descrito anteriormente.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três repetições.

## Seleção de actinobactérias em mudas de sisal para o biocontrole da podridão vermelha do sisal

Isolados de actinobactérias selecionados de acordo com os resultados das etapas descritas acima (AC12, AC16, AC19, AC24 e AC92) foram multiplicados em placas de Petri contendo meio de cultivo AGS sólido e incubados a temperatura ambiente por 10 a 14 dias. Após crescimento, foram retirados cinco discos do meio com a cultura de actinobactérias e transferidos para frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo meio de cultivo AGS líquido, sendo incubados sob agitação em mesa agitadora durante 14 dias, a temperatura ambiente.

Mudas de sisal do tipo rebento, com aproximadamente 20 cm de altura, foram lesionadas na região do caule (quatro perfurações padronizadas eqüidistantes, com 2 cm de profundidade e 1 mm de diâmetro), com auxílio de agulha, inoculadas com 1 mL das culturas líquidas contendo as actinobactérias, e após 15 dias foram inoculadas com *A. niger* (suspensão de esporos na concentração  $10^7$  conídios mL<sup>-1</sup>). As mudas foram mantidas em condições de campo e as avaliações realizadas 30 dias após a inoculação com *A. niger*. A incidência da doença foi calculada com base no número de plantas com e sem sintomas de podridão vermelha. A planta foi removida do saco de muda, cortada transversalmente para quantificação da severidade da podridão vermelha, por meio de escala de notas proposta por Sá (2009). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 20 repetições.

Os dados foram transformados para Índice de Severidade da Doença, conforme McKinney (1923), por meio da fórmula:

$$\text{Índice de severidade da doença} = \frac{\sum(\text{Grau da escala} \times \text{frequência}) \times 100}{\text{n}^\circ \text{ total de unidades} \times \text{grau máximo da escala}}$$

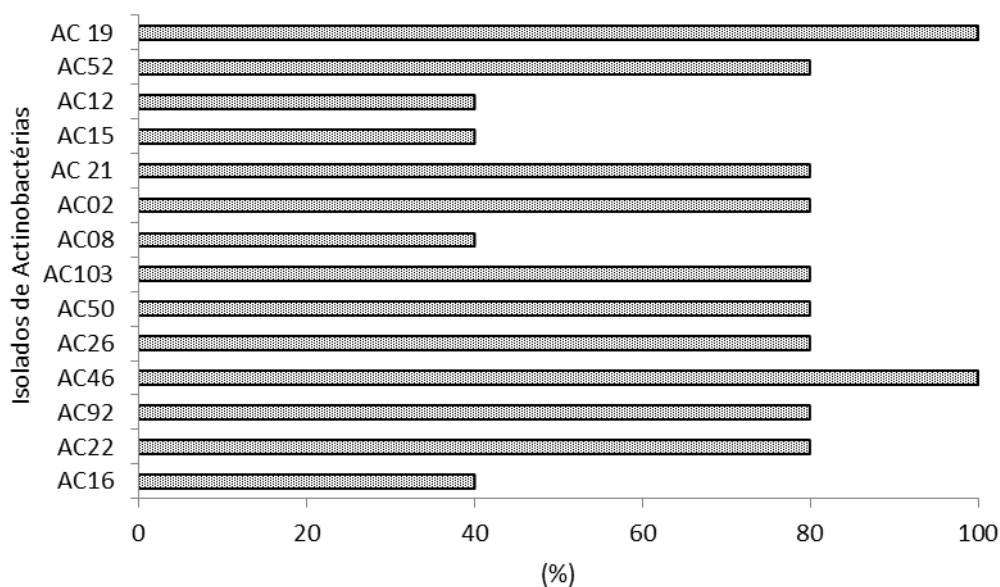
Realizou-se a análise de Clusters em função do índice de severidade da doença com base em distância Euclidiana, utilizando o método de Ward de agrupamento.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Seleção de actinobactérias em segmentos de caule de sisal

Dentre os isolados de actinobactérias avaliados em segmentos do tecido interno de caule de sisal, os isolados AC08, AC12, AC15, AC16 causaram inibição da esporulação e do crescimento micelial de *A. niger* em 60% dos segmentos de caule inoculados, enquanto que os isolados AC19 e AC46 não inibiram o desenvolvimento do patógeno. Os demais isolados inibiram o crescimento de *A. niger* em 20% dos discos de sisal (Figura 1).

Actinobacterias são potenciais agentes de biocontrole devido a produção de metabólitos secundários como enzimas hidrolíticas (glucanase e quitinase), e um grande número de antibióticos (BERDY, 2005; HOSTER et al., 2005). A inibição de *A. niger* nos segmentos de caule de sisal pode ter sido causada pela ação de metabólitos secundários produzidos pelos isolados de actinobactérias, além da competição desses micro-organismos por espaço e nutrientes nos discos de sisal, inibindo o desenvolvimento de *A. niger*.

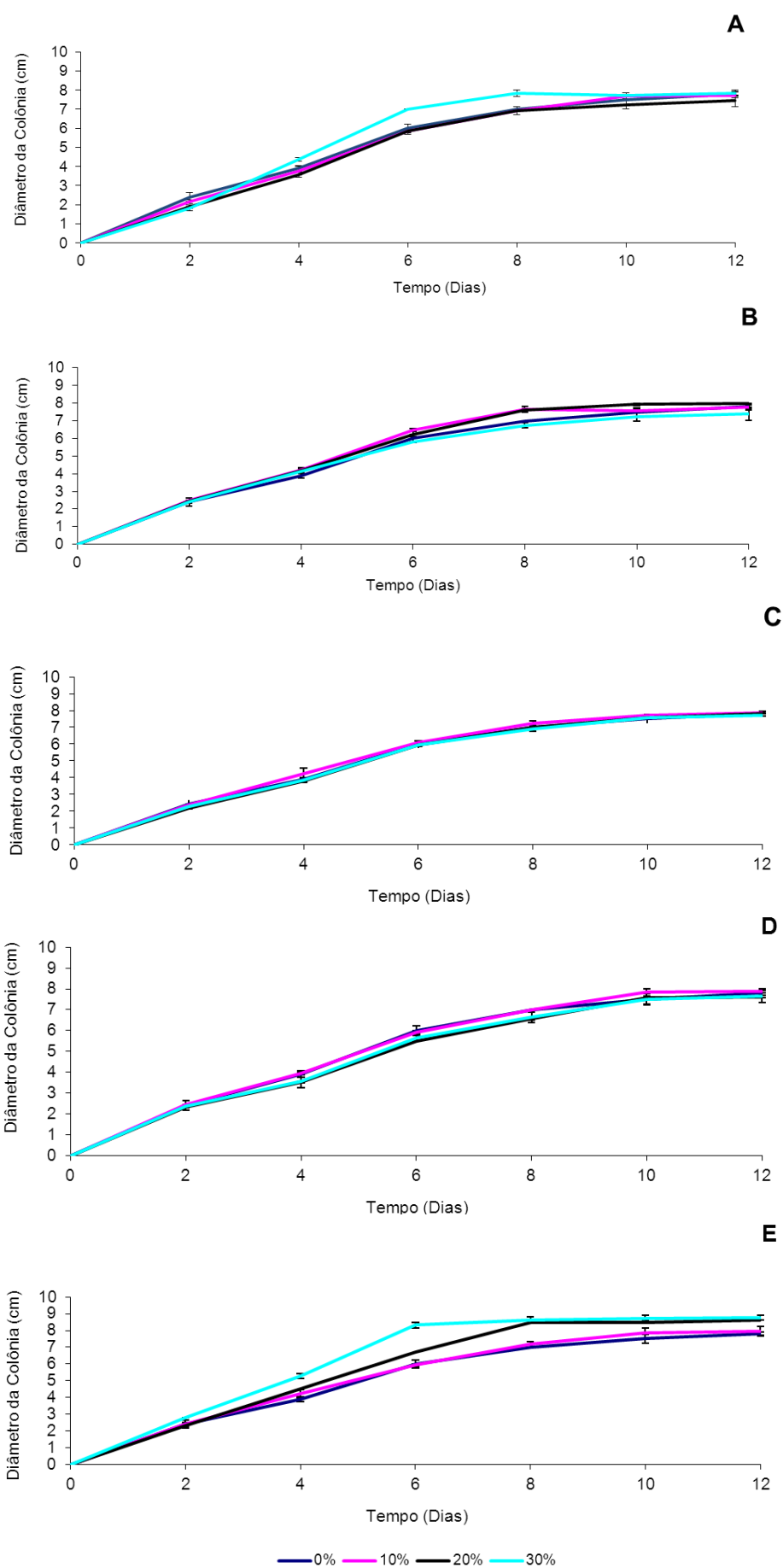


**Figura 1.** Percentual de discos de caule de sisal apresentando crescimento de *A. niger* na superfície. Os discos de caule foram inoculados com diferentes isolados de actinobactérias e após três dias com *A. niger*, sendo avaliados 10 dias após inoculação com *A. niger*.

Apesar dos fungos crescerem mais rápido que as actinobactérias, o período de três dias de incubação dos segmentos de caule de sisal inoculados com actinobactérias possibilitou o estabelecimento desses micro-organismos e a inibição de *A. niger*. A inoculação de mudas de sisal com actinobactérias pode possibilitar a produção de mudas protegidas por esses micro-organismos, já que as actinobactérias cresceram na superfície dos segmentos de caule de sisal e causaram a inibição do crescimento micelial e esporulação de *A. niger*.

**Efeito do(s) metabólito(s) secundário(s) das actinobactérias no crescimento micelial e germinação de esporos de *A. niger*.**

Não houve efeito significativo na inibição do crescimento micelial e nem da esporulação de *A. niger*, quando se adicionou ao meio BDA, diferentes concentrações do meio de cultura contendo os metabólitos produzidos durante o crescimento de actinobactérias (Figura 3).

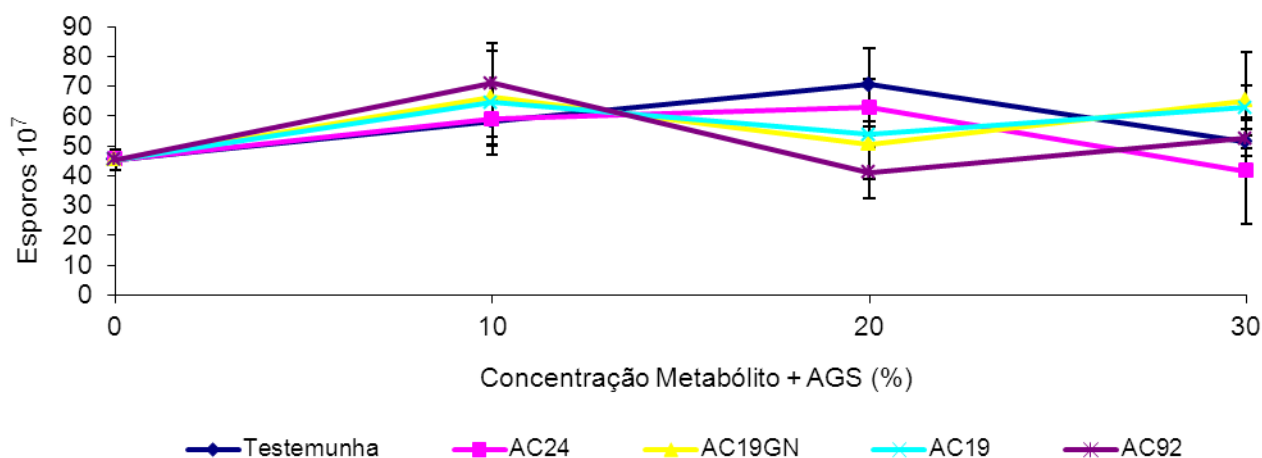


**Figura 2.** Efeito de diferentes concentrações de filtrado de actinobactérias crescidas em meio AGS, adicionados em meio BDA, no crescimento micelial de *A. niger*. **(A)** Filtrado do isolado AC19GN; **(B)** Filtrado do isolado AC24; **(C)** Filtrado do isolado AC19; **(D)** Filtrado do isolado AC92; **(E)** Testemunha, somente meio AGS. Barras representam o erro padrão da média.

Apesar destes trabalhos realizados com adição de metabólitos secundários no meio de cultivo BDA não indicarem que as actinobactérias inibem o *A. niger*, a possibilidade das mesmas promoverem o controle da doença no campo não pode ser descartada, pois os trabalhos realizados na superfície do caule de sisal demonstraram efeito positivo.

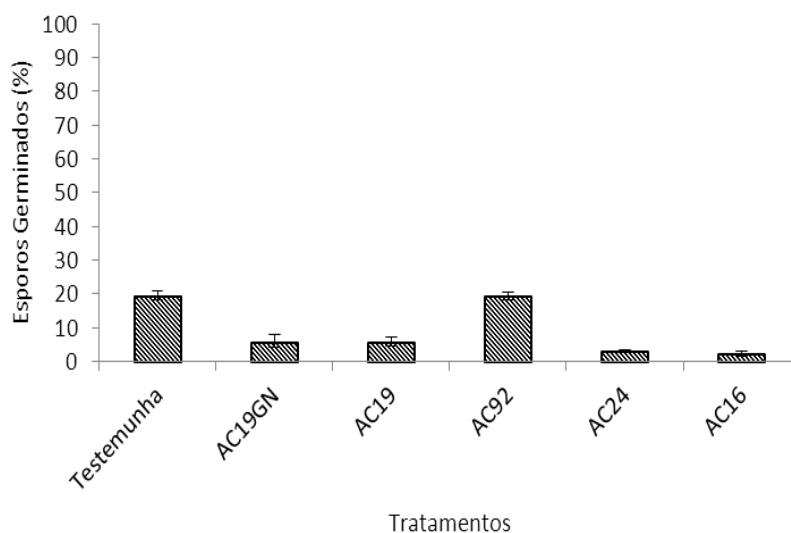
Essa resposta diferenciada nesses experimentos pode estar relacionada aos substratos em que o fungo e as actinobactérias cresceram. O meio de cultura pode não ter promovido as condições necessárias para a síntese de metabólitos secundários com efeito inibitório a *A. niger*, mas nos tecidos de caule de sisal, ocorreu inibição, o que indica um potencial de biocontrole que deve ser mais investigado.

Outra hipótese é que a competição entre as actinobactérias e *A. niger* tenha desfavorecido o desenvolvimento do fungo, já que não houve antibiose a *A. niger*, demonstrado pela não inibição significativa no crescimento micelial e esporulação de *Aspergillus* (Figura 3 e 4).



**Figura 3.** Efeito de diferentes concentrações de filtrado de actinobactérias AC19GN; AC24; AC19 e AC92 adicionados ao meio BDA na esporulação de *A. niger*. Testemunha corresponde a adição somente meio AGS. Barras representam o erro padrão da média.

Houve efeito significativo do meio AGS após o crescimento dos isolados de actinobactérias, na germinação de esporos de *A. niger*. O meio AGS com os filtrados dos isolados AC19GN, AC19, AC24 e AC16 diminuíram o percentual de esporos germinados de *A. niger*. O tratamento com o isolado AC92 teve o mesmo comportamento que o meio AGS sem o crescimento de actinobactérias (Figura 4).



**Figura 4.** Germinação de esporos de *A. niger*, submetidos a diferentes concentrações de filtrados de actinobactérias AC19GN, AC24, AC19 e AC92 crescidas em meio de argenina, glicerol e sais (AGS). Barras representam o erro padrão da média.

Muitas estratégias têm sido utilizadas para encontrar potenciais agentes antagonistas de patógenos de solo. Chan et al. (2003) relataram o ensaio *in vitro* de difusão em ágar, usado como método de seleção inicial para o antagonismo microbiano, como sendo um meio preferido e prático para a seleção de um grande número de isolados antagônicos, em relação aos bioensaios de campo com plantas. No entanto, os bioensaios de campo continuam a ser essenciais para verificar a eficácia de potenciais agentes de biocontrole, pois muitas vezes os resultados de testes *in vitro* e *in vivo* não apresentam nenhuma correlação devido a diversos fatores do complexo sistema solo - ambiente - planta que interferem na ação destes micro-organismos.

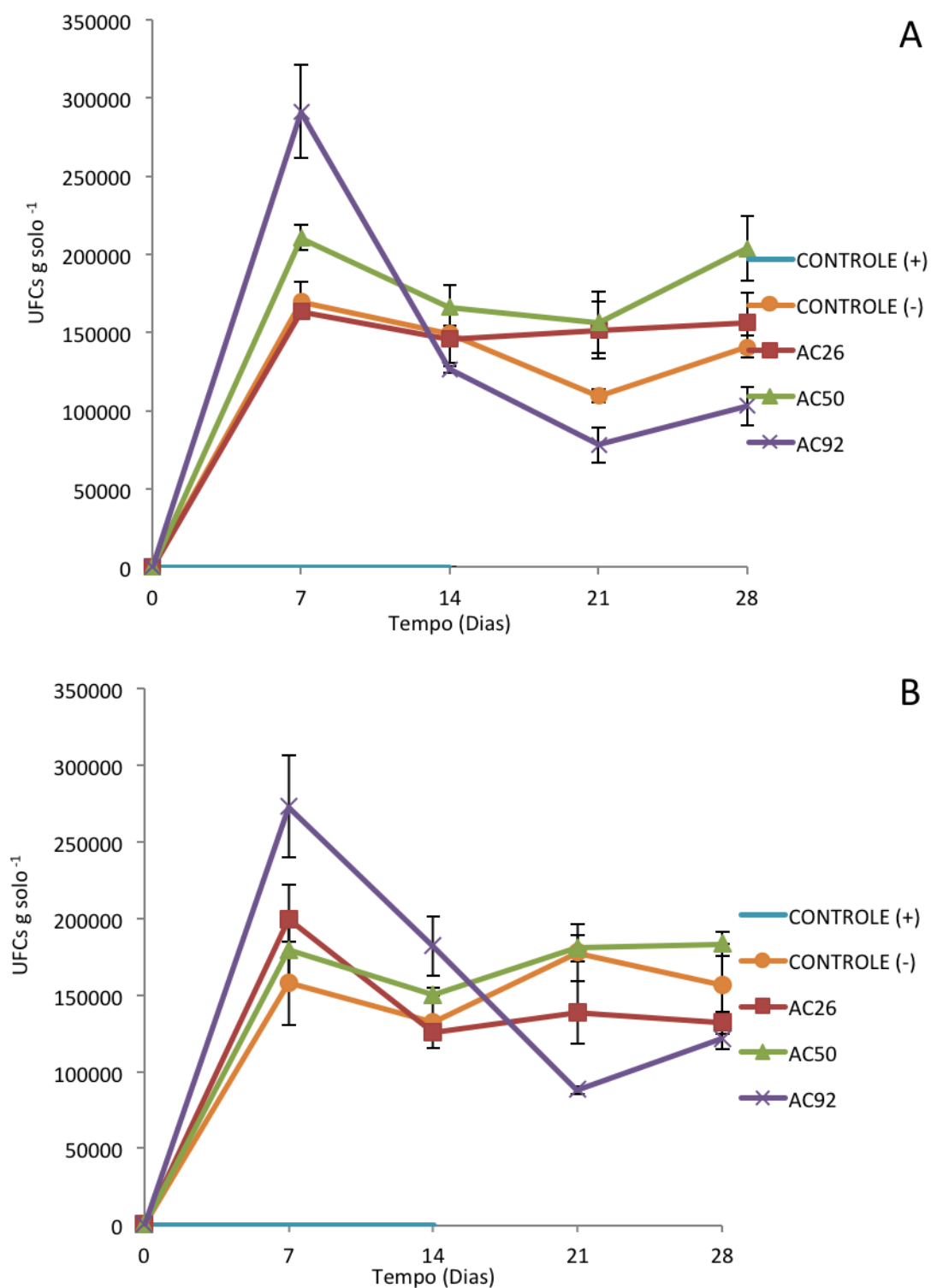


### **Supressão de *A. niger* por actinobactérias em diferentes solos**

No presente trabalho, no experimento conduzido com solo argiloso e solo médio-arenoso, apesar de ter sido adicionada a mesma quantidade de suspensão de esporos de *A. niger*, na mesma concentração, em todos os tratamentos, as unidades formadoras de colônias (UFCs) iniciais (no tempo zero, sem incubação) de *A. niger*, no tratamento com o isolado AC92, foram significativamente superiores aos demais tratamentos, em ambos os solos (Figura 5). O número de UFCs de *A. niger* no tratamento com o isolado de actinobactéria AC50 também foi superior ao tratamento controle com apenas *A. niger*, no início do experimento com o solo médio-arenoso (Figura 5).

A queda das UFCs de *A. niger* no intervalo de tempo avaliado foi mais brusca no tratamento com o isolado AC92, sugerindo que após incubação, os metabólitos produzidos pela actinobactéria inibiram o crescimento de *A. niger*, diminuindo assim, a população deste fungo no solo.

Actinobactérias estão naturalmente presentes no solo e, quando testadas em condições *in vitro*, espécies do gênero *Streptomyces* têm mostrado o potencial para a produção de antibióticos, que reduzem ou inibem o crescimento e desenvolvimento dos fitopatógenos presentes no solo (KIM et al, 2000; OUHDOUCH et al., 2001; BRESSAN, 2003). O grau de controle da doença depende da densidade do agente de controle biológico, densidade do agente patogénico, a eficiência do agente de biocontrole em suprimir o patógeno e a proporção da população do patógeno que é potencialmente afectada pelo agente (MONTESINOS; BONATERRA 1996; SMITH et al. 1997). As diferenças nos mecanismos de ação dos agentes de biocontrole também afetam a relação de dose-resposta dos isolados (LARKIN; FRAVEL 1999).



**Figura 5.** Unidades Formadoras de Colônia de *Aspergillus niger* em solo argiloso (**A**) e solo médio-arenoso (**B**), submetidos ao tratamento com diferentes isolados de actinobactérias. As amostras de solo foram infestadas com *A. niger*, sete dias após incubação com os isolados de actinobactérias. O controle (+) corresponde a solo não infestado e o controle (-) corresponde da infestação por apenas *A. niger*. As barras representam o erro padrão da média. Barras representam o erro padrão da média.

Apesar dos resultados (Figura 6) indicarem que a actinobactéria AC92 reduziu significativamente a população de *A. niger* nos solos, as áreas abaixo da curva do crescimento populacional de *A. niger* nos solos com as actinobactérias (Tabela 2) indicam que não houve efeito significativo na diminuição das UFCs de *A. niger* por nenhuma actinobactéria. Como as áreas abaixo da curva do crescimento populacional levam em consideração todo o período avaliado, além de considerar a população inicial de *A. niger*, podemos inferir que esses resultados são mais precisos que as curvas de crescimento.

**Tabela 2:** Área abaixo da curva do efeito supressivo de isolados de actinobactérias a *A. niger* em dois tipos de solo da região produtora de sisal do semiárido baiano.

| <b>Tratamentos</b> | <b>Solo Argiloso</b>     | <b>Solo Médio -Arenoso</b> |
|--------------------|--------------------------|----------------------------|
| Controle (+)       | 7,70 x 10 <sup>2</sup> a | 2,28 x 10 <sup>4</sup> a   |
| Controle (-)       | 3,49 x 10 <sup>6</sup> b | 3,82 x 10 <sup>6</sup> b   |
| AC26               | 3,77 x 10 <sup>6</sup> b | 3,71 x 10 <sup>6</sup> b   |
| AC50               | 4,44 x 10 <sup>6</sup> b | 4,21 x 10 <sup>6</sup> b   |
| AC92               | 3,83 x 10 <sup>6</sup> b | 4,23 x 10 <sup>6</sup> b   |

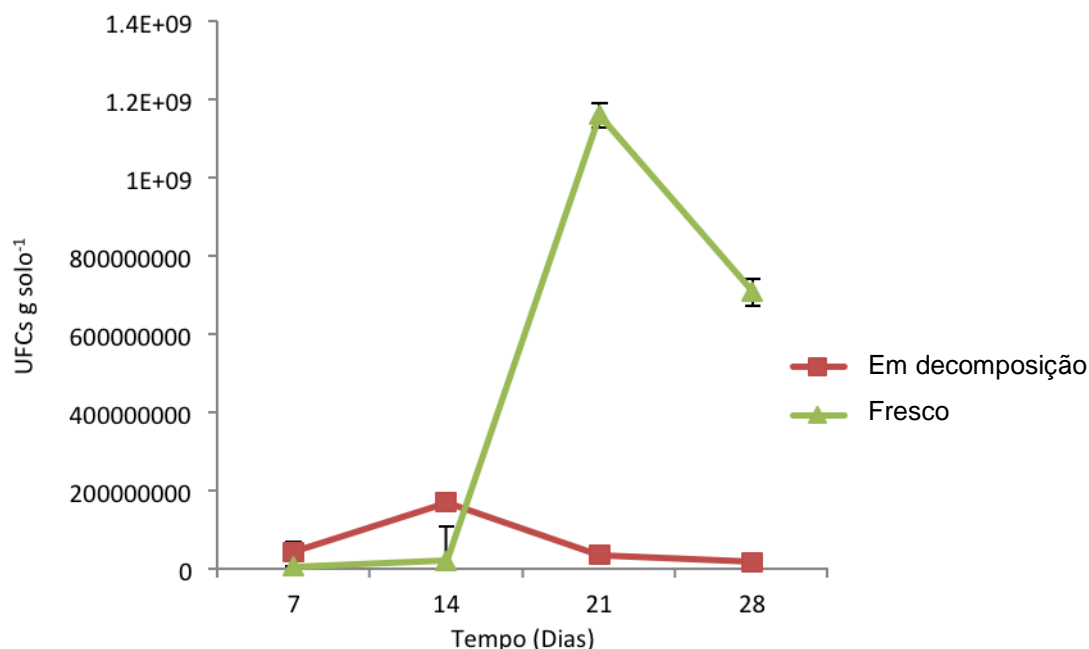
Médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem entre si segundo o teste comparação de médias de Tukey à 5% de probabilidade.

Os resultados corroboram com os ensaios em laboratório, pois esses isolados também não inibiram o crescimento micelial e esporulação de *A. niger*. Além disso a umidade do solo, mantida a 20%, é considerada baixa, o que pode ter interferido na ação das actinobactérias quanto ao antagonismo a *A. niger*.

### **Multiplicação e sobrevivência de actinobactéria no resíduo de sisal**

A avaliação da sobrevivência do isolado de actinobactéria AC26 nos diferentes resíduos de sisal demonstrou que no resíduo de sisal coletado nas pilhas de resíduo deixadas no campo, considerando um resíduo em processo de decomposição, ocorreu menor população inicial da actinobactéria, em relação ao resíduo fresco, coletado logo após o desfibramento da folha, havendo um pequeno aumento no número de UFCs até os 14 dias e após esse período, ocorreu uma

expressiva redução. Provavelmente, o resíduo em decomposição apresentou efeito tóxico as actinobactérias (Figura 6).



**Figura 6.** Sobrevivência de isolado de actinobactéria AC 26 em resíduo de sisal em decomposição e resíduo fresco de sisal. Barras representam o erro padrão da média.

Até os 14 dias, a quantidade de UFCs de actinobactérias no resíduo não fresco foi baixa, aumentando expressivamente aos 21 dias, e caindo até os 28 dias. Como as actinobactérias tem um desenvolvimento lento, esse comportamento no crescimento era esperado, pois houve somente uma população expressiva aos 21 dias. A redução da população a partir dos 21 dias pode ter ocorrido devido a competição das actinobactérias por espaço e nutrientes, bem como o acúmulo de metabólitos secundários no substrato, que interferem no desenvolvimento do micro-organismo, em condições controladas e área de superfície reduzida, ou seja, pequenas quantidades de substrato ou solo.

Uma característica importante das actinobactérias é a capacidade de sintetizarem endósporos, o que facilita a sua formulação (EMMERT; HANDELSMAN, 1999 citado por CARRER FILHO et. al., 2009). Sabaratnam e Traquair (2002) produziram uma formulação à base da estirpe 'Di-944' de *S. griseoviridis*, isolada da

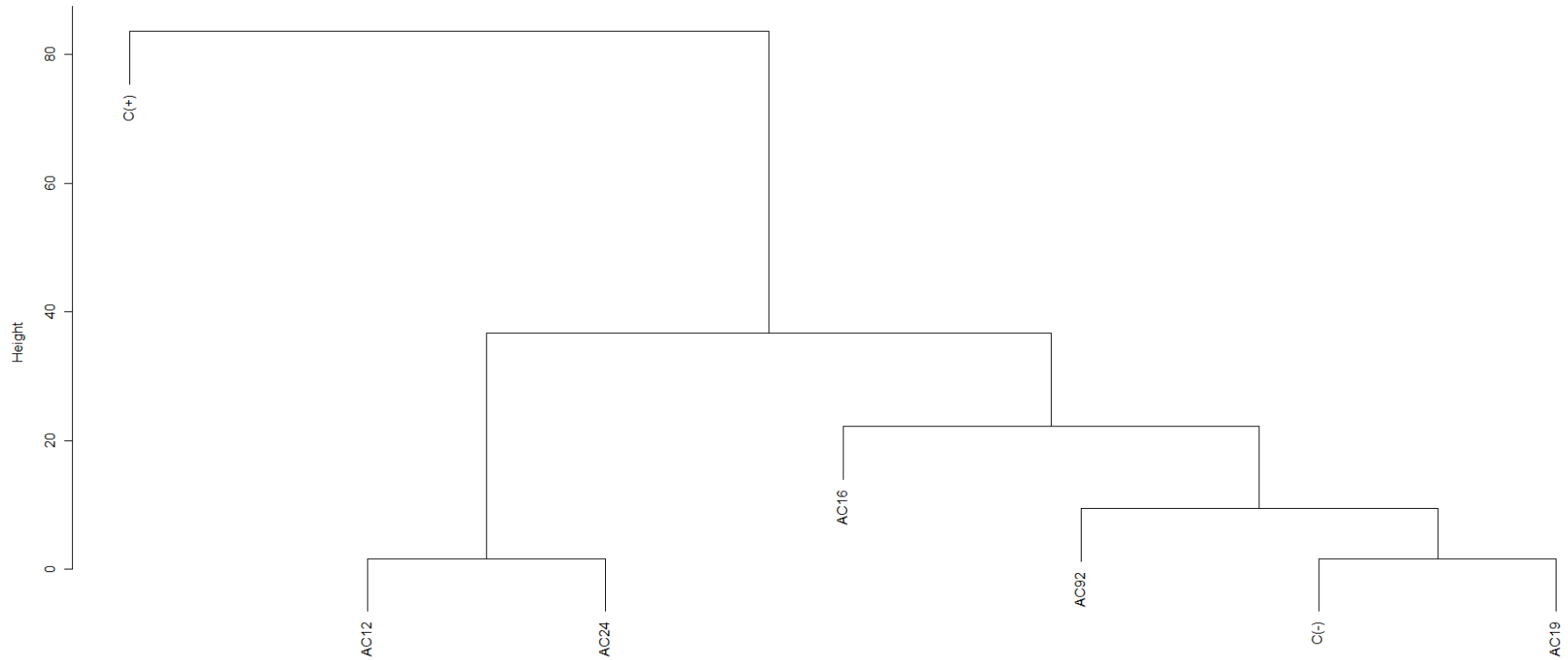
rizosfera de tomateiro, que demonstrou ser eficiente em controlar o tombamento de mudas de tomate causado por *Rhizoctonia solani*.

### **Seleção de actinobactérias em mudas de sisal para o biocontrole da podridão vermelha do sisal**

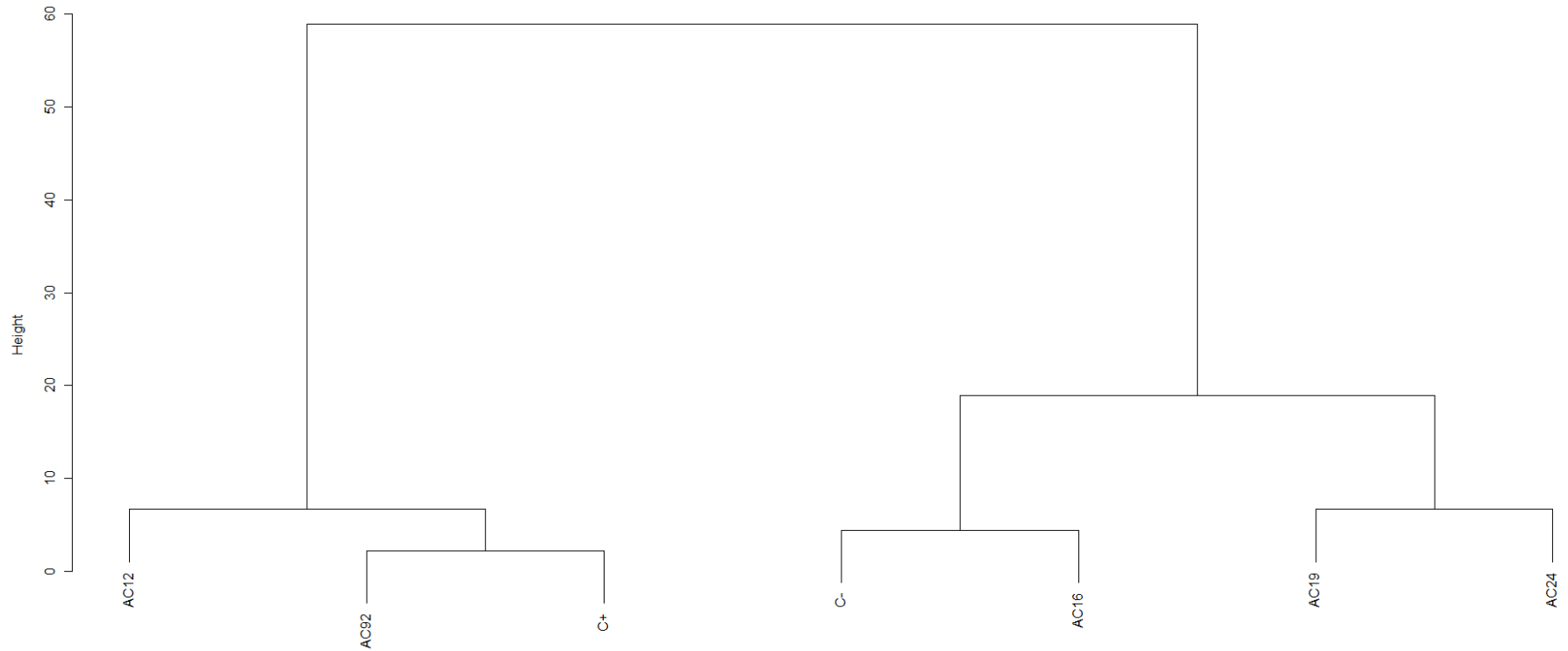
Os tratamentos com a aplicação da cultura líquida das actinobactérias, em mudas de sisal, com intervalo de 15 dias entre a aplicação das actinobactérias e a inoculação com *A. niger*, nas condições de clima de Conceição do Coité -BA, não promoveram a redução da severidade da doença, estando estes distantes do controle positivo, pela análise de *clusters* (Figura 7).

Foram observados resultados diferenciados no comportamento dos isolados, pois em Ourolândia-BA houve uma redução na severidade da doença, nos tratamentos com os isolados AC12 e AC92, que se agruparam próximos ao controle positivo, ou seja, das mudas não inoculadas com *A. niger* (Figura 8). Esses isolados promoveram uma redução na incidência da doença, observando-se incidências de 13,33 e 20% nos tratamentos com aplicação das actinobactérias AC12 e AC92, respectivamente (Tabela 3).

Guetsky et al. (2001), afirmam que as maiores limitações do controle biológico de doenças de plantas são os fatores ambientais, e que isso resulta na não repetibilidade dos resultados em locais com condições ambientais diferenciadas.



**Figura 7.** Representação gráfica da análise de *Clusters* em função do índice de severidade da podridão vermelha do sisal em mudas inoculadas com suspensão de actinobactérias em meio AGS e após 15 dias inoculadas com *A. niger* no município de Conceição do Coité-BA. CT- corresponde ao controle negativo (inoculado apenas com *A. niger*), CT+ corresponde à aplicação de meio AGS. Os dados foram analisados com base em distância Euclidiana, utilizando o método de agrupamento de Ward.



**Figura 8.** Representação gráfica da análise de *Clusters* em função do índice de severidade da podridão vermelha do sisal em mudas inoculadas com suspensão de actinobactérias em meio AGS e após 15 dias inoculadas com *A. niger* no município de Ourolândia-BA. CT- corresponde ao controle negativo (inoculado apenas com *A. niger*), CT+ corresponde à aplicação de meio AGS. Os dados foram analisados com base em distância Euclidiana, utilizando o método de agrupamento de Ward.

**Tabela 3.** Incidência da podridão vermelha do sisal em mudas inoculadas com isolados de actinobactérias e após 15 dias inoculados com *A. niger*. Experimento realizado nos municípios de Conceição do Coité e Ourolândia-BA. Controle positivo corresponde a aplicação de meio AGS líquido e Controle negativo inoculado apenas com *A. niger*.

| Isolados          | Conceição do Coité (%) | Ourolândia (%) |
|-------------------|------------------------|----------------|
| AC12              | 60                     | 13,33          |
| AC16              | 95                     | 33,33          |
| AC19              | 75                     | 46,67          |
| AC24              | 60                     | 46,67          |
| AC92              | 75                     | 20             |
| Controle negativo | 85                     | 40             |
| Controle positivo | 10                     | 13,33          |

Os municípios onde os experimentos foram conduzidos apresentam características edafoclimáticas diferentes. O município de Conceição do Coité localizado a 11° 33' 50" S e 39° 16' 58" O, apresenta temperaturas que variam de 21 a 34 °C, com umidade relativa de 34 a 88%, com predominância de solos médio-arenoso. Ourolândia à 10° 58' 12" S e 41° 04' 58" O, apresenta maiores temperaturas que variam de 26 a 39 °C, e umidade relativa do ar de 31 a 81% e predominância de solos argilosos.

Os resultados sugerem a provável existência de competição no ponto de infecção, já que no experimento realizado nos segmentos de caule de sisal, ocorreu a inibição de *A. niger* pelos isolados de actinobactérias AC12 e AC92, que apesar de não demonstrarem antibiose a *A. niger*, em meio de cultura sólido, reduziram a severidade e incidência da doença no experimento em campo. Além dessa hipótese, a indução de resistência da planta a infecção pelo patógeno também deve ser investigada, pois não se pode concluir que o único mecanismo de controle foi a competição.

No experimento realizado em Ourolândia, os resultados de severidade observados no tratamento controle positivo (sem inoculação de *A. niger*) foram semelhantes aos do controle negativo (inoculação apenas com *A. niger*), o que provavelmente pode ter influenciado nos resultados de biocontrole. No controle



positivo ocorreu uma infecção natural ou contaminação das mudas pelo isolado de *A. niger* utilizado nos tratamentos com inoculação, já que o solo utilizado no experimento foi oriundo de regiões com plantio de sisal, e não foi esterilizado, sendo o experimento conduzido em área de produção de sisal.

A incidência da podridão vermelha observada no controle, inoculado apenas pelo patógeno, no experimento realizado em Ourolândia, também indica que na condição que o experimento foi realizado, o patógeno foi menos agressivo do que no experimento realizado em Conceição do Coité.

Para diminuir o efeito do ambiente nos agentes de controle biológico podem ser avaliadas estratégias como a formulação adequada dos agentes de biocontrole, além da potencialização destes por meio da combinação de vários microrganismos (EZZIYYANI et al., 2007; SABARATNAM; TRAQUAIR, 2002).

Actinobactérias são mais resistentes à dessecação do solo, em relação a outras bactérias. Os esporos de *Streptomyces* podem se manter viáveis em condições de dessecação absoluta. Nos solos de regiões áridas, actinobactérias ocupam um lugar importante no complexo de organismos procariontes desse habitat (ZVYAGINTSEV et al., 2001). Provavelmente, a formulação correta dos isolados de actinobactérias pode potencializar a capacidade biocontroladora melhorando a estabilidade e as características desses micro-organismos.

## CONCLUSÕES

Os isolados de actinobactérias AC08, AC12, AC15, AC16 são antagônicos à *A. niger* e possuem a capacidade de inibição quando aplicados em tecido vegetal de sisal.

O resíduo de sisal, quando em processo de decomposição, tem efeito tóxico às actinobactérias.

Os isolados AC12 e AC92 promoveram uma redução na severidade e incidência da doença em mudas de sisal, nas condições edafoclimáticas de Ourolândia-BA.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, K. C. L. de M. **Epidemiologia da podridão vermelha do sisal no Estado da Bahia**. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, 2010.

BENIZRI, E.; BAUDOIN, E.; GUCKERT, A. Root colonization by inoculated plant growth-promoting rhizobacteria. **Biocontrol Science and Technology**, v.11, p.557-574, 2001.

BERDY, J. Bioactive microbial metabolites. **Journal of Antibiotics**, v.58, p.1–26, 2005.

BETTIOL, W.; MORANDI, M, A, B. Controle Biológico de Doenças de Plantas no Brasil. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M, A, B.(Eds) **Biocontrole de Doenças de plantas: usos e perspectivas**. Embrapa, 2009, 341p.

BRESSAN, W. Biological control of maize seed pathogenic fungi by use of actinomycetes. **Biocontrol**, v.48, p.233-240, 2003.

CARRER FILHO, R.; ROMEIRO, R.S.; AMARAL, L.S.; GARCIA, F.A. Potencialidade de um actinomiceto de rizosfera de tomateiro como agente de biocontrole de doenças. Minas Gerais. **Horticultura Brasileira**, V. 27 n.3. 2009.

CHAN, Y. K.; MCCORMICK, W. A.; SEIFERT, K. A. Characterization of an antifungal soil bacterium and its antagonistic activities against *Fusarium* species. **Canadian Journal of Microbiology**, 49, p.253-262,2003.

EL-TARABILY, K. A.; SIVASITHAMPARAM, K. Non-streptomycete actinomycetes as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. **Soil Biology and Biochemistry**, v.38, p.1505–1520, 2005.

EZZIYYANI, M.; REQUENA, M. E.; EGEA-GILABERT, C.; CANDELA, M. E. Biological control of phytophthora root rot of pepper using *Trichoderma harzianum* and *Streptomyces rochei* in combination. **Phytopathology**, v.155, p.342–349,2007.

GIRAUD, F., DUPONT, J., HAON, M., BOUZID, O., ALIBEU, O., NAVARRO, D., SAGE, L., SIGLE-MURANDI, F., ASTHER, M., LESAGE-MEESSEN, L. Phylogenetic analysis of the *Aspergillus niger* aggregate in relation to feruloyl esterase activity. **Research in Microbiology**, v.158, 413-419, 2007.

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

HASSANIN, S. M.; EL-MEHALAWY, A. A.; HASSANIN, N. M.; ZAKI, S. A. Induction of resistance and biocontrol of rhizoctonia in cotton damping-off disease by rhizosphere bacteria and actinomycetes. **Internet Journal of Microbiology**, v.3, n2, 2007.

HOSTER, F.; SCHMITZ, J.E.; DANIEL, R. Enrichment of chitinolytic microorganisms: isolation and characterization of chitinase exhibiting antifungal activity against phytopathogenic fungi from a novel *Streptomyces* strain. **Applied Microbiology Biotechnology**, Berlim, v.66, p.434-442, 2005.

IDR (Instituto de desenvolvimento da região do sisal). **Cadeia Produtiva de Sisal**. Disponível em:< <http://www.idrsisal.org.br/sisal/17.php>> Acesso em: 20/08/2011.

KIM, B. S.; MOON, S.; HWANG, B. K. Structure elucidation and fungal activity of an anthracycline antibiotic, daunomycin, isolated from *Actinomadura roseola*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, p.1875-1881, 2000.

LARKIN, R. P.; FRAVEL, D. R. Mechanism of action and dose–response relationships governing biological control of Fusarium wilt of tomato by non-pathogenic *Fusarium* spp. **Phytopathology**, v.89, p.1152-1161, 1999.

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

MCKINNEY, H. H. 1923. Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. **Journal of Agricultural Research**, Washington, v. 26, p.195-218, 1923.

MONTESINOS, E.; BONATERRA, A.. Dose–response models in biological control of plant pathogens: An empirical verification. **Phytopathology**, v.86, p.464-472, 1996.

OUHDOUCH, Y.; BARAKATE, M.; FINANCE, C. Actinomycetes of Moroccan habitats: Isolation and screening for antifungal activities. **European Journal of Soil Biology**, v.39, 69-74, 2001.

POTER, J. N.; WILHELM, J. J.; TRESNER, H. D. Method for the preferential isolation of actinomycetes from soils. **Applied Microbiology**, v.8, p.174-178, 1960.

RAIJ, B. van; ANDRADE, J. C.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. A. **Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais**. Campinas Instituto Agrônômico, 2001. 285p.

SÁ, J. O. de. **Patogênese de *Aspergillus niger* e biocontrole da podridão vermelha do sisal por *Trichoderma* spp.**, 2009. 53 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2009.

SABARATNAM S.; TRAQUAIR J. A.. Formulation of a *Streptomyces* biocontrol agent for the suppression of Rhizoctonia damping-off in tomato transplants. **Biological Control**, v.23, 2002.

SHANER, G.; FINNEY, R. E. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in knox wheat. **Phytopathology**, v.70, n.1, p.1183-1186, 1977.

SILVA, J. R. Q. **Agente etiológico da podridão vermelha do sisal: Densidade populacional, sobrevivência, caracterização genética e de agressividade**. 2012. 98 f. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2012a.

SILVA, M. H. S. da. **Aspectos bioecológicos de *Aspergillus niger*, fungo causador da podridão vermelha do sisal**, 2012. 86 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2012b.

SILVA, O. R. R. F. S.; COUTINHO, W. M. **Cultivo do sisal**, Campina Grande, PB, 2006. Disponível em <[www.sistemadeproducao.cnptia.embrapa.br/fontesHTML/sisal/cultivodosisalindex.htm](http://www.sistemadeproducao.cnptia.embrapa.br/fontesHTML/sisal/cultivodosisalindex.htm)> acesso em 07 de agosto de 2011.

SINDIFIBRAS. **Ações para prevenção e controle da Podridão Vermelha do Sisal na região sisaleira do estado da Bahia. (2010)**. Disponível em:<<http://www.Brazilianfibres.com.br/?p=736>>. Acesso em: 09 de julho de 2010

SMITH, K. P.; HANDELSMAN, R. J.; GOODMAN, M. Modeling dose–response relationship in biological control: Partitioning host responses to the pathogen and biocontrol agent. **Phytopathology**, v.87, p.720-729, 1997.

SOARES, A. C. F.; SOUSA, C. da S.; GARRIDO, M. da S. Streptomycetes antagonism against *Cladosporium fulvum* Cooke and *Fusarium oxysporium* f. sp. *lycopersici*. **Ciência Rural**, v.39, n.6, p.1897-1900, 2009

XIAO, K.; KINKEL, L. L.; SAMAC, D. A. Biological control of Phytophthora root rots on alfalfa and soybean with Streptomyces. **Biological Control**, v.23, p.285-295, 2002.

ZVYAGINTSEV, D. G.; ZENOVA, G. M.; **Ekologiya aktinomitsetov (Ecology of Actinomycetes)**, Moscow:GEOS, 2001.

## **CAPÍTULO 3**

### **BIOCONTROLE DA PODRIDÃO VERMELHA DO SISAL COM COMBINAÇÕES DE ISOLADOS DE *Trichoderma* E ACTINOBACTÉRIAS**

## BIOCONTROLE DA PODRIDÃO VERMELHA DO SISAL COM COMBINAÇÕES DE ISOLADOS DE TRICHODERMA E ACTINOBACTÉRIAS

Autores: Jefferson Oliveira de Sá; Ana Cristina Fermino Soares; Ana Claudia Souza Campos Sacramento; Marcelly Santana Mascarenhas; Filipe Costa Lima

**RESUMO:** Na Bahia, o sisal tem importância significativa, sendo fonte de renda para inúmeras famílias da região semiárida. A cultura vem sendo afetada por perdas na produtividade devido a podridão vermelha do caule, causada por *Aspergillus niger*, que causa a morte da planta. O controle biológico pode se constituir em método de controle viável. Fungos do gênero *Trichoderma* e as actinobactérias tem sido destacados com resultados bons em estudos de biocontrole de diversas doenças de plantas. O uso da combinação desses micro-organismos pode representar uma possível alternativa para melhorar a eficiência de controle desta doença no campo. O objetivo do trabalho foi avaliar formulações de isolados de *Trichoderma* da região sisaleira, e combinações destas formulações entre si e com isolados selecionados de actinobactérias, para o controle da podridão vermelha do sisal. Foram realizados testes *in vitro* e *in vivo* em mudas de sisal, no campo, na região produtora de sisal, além da avaliação da capacidade de colonização endofítica de *Trichoderma*. O uso combinado de formulações de *Trichoderma* e actinobactérias não potencializou o controle da doença. As condições edafoclimáticas influenciam na resposta desses micro-organismos. *Trichoderma harzianum*, isolado TCS76, *T. virens*, isolado TCS43 e *T. viride*, isolado TCS09 apresentaram potencial para o controle da podridão vermelha do sisal, nas duas condições ambientais avaliadas, reduzindo a incidência da podridão vermelha em 64,28%, no município de Cruz das Almas-BA. A aplicação das formulações de *Trichoderma* no solo não reduziu a população de *A. niger*. Os resultados também indicaram que *Trichoderma* é um fungo com capacidade de colonização endofítica ao sisal.

**Palavras-chaves:** *Agave sisalana*; *A. niger*, biocontrole, formulações.

## BIOCONTROL OF SISAL RED ROT DISEASE WITH TRICHODERMA AND ACTINOBACTERIA IN COMBINATION

Authors: Jefferson Oliveira de Sá; Ana Cristina Fermino Soares; Ana Claudia Souza Campos Sacramento; Marcelly Santana Mascarenhas; Filipe Costa Lima

**ABSTRACT:** In State of Bahia, Brazil, sisal (*Agave sisalana* Perrine) has significant importance, being a source of income for many families in the semiarid region. Sisal crop has currently been affected by losses in productivity due to stem red rot disease, caused by the fungus *Aspergillus niger* that results in plant death. Biological control can be a potential alternative for control of this disease. Fungi of the genus *Trichoderma* and actinobacteria have been highlighted as microorganisms with good results in several biological control studies. The use of combined formulations of these microorganisms can represent an alternative to improve control of this disease in field conditions. The objective this work was to evaluate *Trichoderma* formulations from the semiarid region of Bahia, combinations of these formulations and of actinobacteria to control sisal red rot disease. In vitro and in vivo experiments with sisal plants in the field were performed. *Trichoderma*'s potential for endophytic colonization of sisal plants was also evaluated. The results indicated that the combined use of *Trichoderma* formulations and actinobacteria do not enhance disease control. Soil and climatic conditions influence the response of these microorganisms. *Trichoderma harzianum*, strain TCS76, *T. virens*, strain TCS43, and *T. viride*, strain TCS09 presented potential for control of sisal stem red rot disease, on both environmental conditions, with a reduction in disease incidence of 64.28%, in the municipality of Cruz das Almas, Bahia. The use of *Trichoderma* formulations in soil did not cause a reduction in population of *A. niger*. These results also indicate that *Trichoderma* has the ability for endophytic colonization of sisal plants.

**Keywords:** *Agave sisalana*; *A. niger*; biocontrol, formulations.

## INTRODUÇÃO

O sisal (*Agave sisalana* Perrine) é uma cultura que promove atividade econômica por meio da cadeia produtiva, para mais de meio milhão de pessoas, em regiões com escassas alternativas para exploração agrícola de outras culturas (COUTINHO et al., 2006). O Estado da Bahia é o maior produtor de sisal do Brasil, com 226.621 toneladas colhidas, atingindo uma área plantada de 252 mil hectares em 2010 (IBGE, 2011), e responde por 94% de toda a produção nacional. O Brasil está na primeira posição do *ranking* mundial da produção de sisal (SEPLAN, 2006).

Apesar da boa resistência ao ataque de pragas e doenças, o sisal pode ser afetado por doenças capazes de causar sérios prejuízos à cultura (BOCK, 1965; MEDINA, 1954), dentre as quais a podridão vermelha do caule, conhecida também como podridão do tronco do sisal, é a principal (LIMA et al., 1998; COUTINHO et al., 2006; SOARES et al., 2006).

As plantas afetadas por essa doença apresentam folhas amareladas e murchas que não servem para o desfibramento e os sintomas internos são a podridão do caule, que leva ao tombamento e morte da planta no campo (LIMA et al., 1998). A incidência da doença pode variar de 5% a 40% nas zonas de produção, causando perda de qualidade e produção da fibra e a devastação dos plantios de sisal (ABREU, 2010).

A doença é causada por *Aspergillus niger*, podendo ser causada por outros *Aspergillus* spp., principalmente da seção Nigri, conforme observado em condições de casa de vegetação (SILVA, 2012a; SILVA, 2012b). Estes são fungos filamentosos pertencentes aos ascomycotas (SCOTT, 2006), comumente encontrados na microbiota do solo, atuando no ciclo do carbono na natureza (GOMES, 2007), o que dificulta o seu controle. Em campo, os sintomas de podridão vermelha são sempre associados a *A. niger* (SILVA, 2012a).

O controle biológico é a melhor estratégia no controle de patógenos veiculados ao solo, por ser considerado um método menos danoso ao meio ambiente, além de reduzir a produção de inóculo do patógeno, com consequente redução na incidência da doença (CAMPANHOLA; BETTIOL, 2003; MICHEREFF et al., 2005).



Diversos micro-organismos são conhecidos e utilizados para o controle biológico de doenças de plantas, a exemplo de fungos do gênero *Trichoderma* e actinobactérias (SAJID et al., 2011; BOUKAEW et al., 2011; OSKAY, 2011).

*Trichoderma* é um fungo hiperparasita, mitospórico que tem a fase sexuada no Phylum Ascomycota, Classe Euasmycetes, Ordem Hypocreales, Família Hypocreaceae, gênero *Hypocrea*, sendo as espécies *T. Harzianum*, *T. virens*, e *T. viride* as mais utilizadas como agentes de controle biológico de fitopatógenos (HERMOSA et al, 2000).

O sucesso de *Trichoderma* é devido a sua alta capacidade reprodutiva, habilidade de sobreviver sob condições desfavoráveis, eficiência na utilização de nutrientes, capacidade de modificar a rizosfera, alta agressividade contra fungos fitopatogênicos e eficiência em promover o crescimento vegetal (BENITEZ et al.,, 2004), além de estimular os mecanismos de defesa da planta (YEDIDIA et al, 2001).

Actinobactérias são bactérias Gram-positivas filamentosas. A maioria desse grupo é saprofítica e encontram-se amplamente distribuídas no solo (KATSIFAS et al., 1999). Actinobactérias são conhecidas pela sua capacidade de produzir uma grande variedade de enzimas extracelulares e antibióticos, e colonizar as plantas (BARAKATE et al 2002).

As actinobactérias colonizam muito bem o solo por meio do desenvolvimento de hifas. São importantes na comunidade rizosférica, região fortemente influenciada pelas raízes que contém uma grande diversidade de micro-organismos (BENIZRI et al., 2001), sendo capazes de influenciar no desenvolvimento das plantas e protegerem as raízes contra os agentes patogênicos.

Devido ao efeito supressivo de micro-organismos de biocontrole ser muito afetado pelas condições ambientais, o uso combinado de diferentes micro-organismos no controle biológico pode tornar este método mais eficiente, permitindo melhores resultados em campo (GUETSKY et al. 2001).

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar isolados de *Trichoderma* spp. (formulados) e actinobactérias, utilizados de forma combinada ou isolada no controle da podridão vermelha do sisal e na supressão de *Aspergillus niger* no solo. Adicionalmente foi avaliado o potencial de colonização endofítica de *Trichoderma* no sisal.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Obtenção dos isolados de micro-organismos

Os isolados de *Trichoderma* spp. foram obtidos a partir de amostras de solo de áreas com plantio de sisal, nos municípios da região sisaleira da Bahia (Araci, Campo Formoso, Jacobina, Retirolândia, Valente), coletadas na região próxima as raízes de plantas de sisal. O isolamento foi feito pela técnica da diluição seriada e plaqueamento em meio BDA (batata, dextrose, ágar) 1/5 com 1 mL L<sup>-1</sup> de Tormicina. As culturas puras dos isolados foram identificadas (Tabela 1), conservadas à temperatura ambiente em frascos de vidro esterilizados, contendo 4 mL de água destilada e esterilizada, identificados e fechados hermeticamente.

Treze isolados de *Trichoderma* foram enviados à empresa Sementes Farroupilha - MG, que é especializada na formulação de micro-organismos, para o desenvolvimento da formulação em pó, com a concentração do *Trichoderma* expressa em Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) por grama do formulado.

Os isolados de actinobactérias utilizados foram oriundos da Região do Recôncavo da Bahia, obtidos da coleção de micro-organismos do Laboratório de Microbiologia e Fitopatologia da UFRB, e não foram formulados. Estes isolados foram pré-selecionadas por meio de ensaios realizados em etapas anteriores (capítulo 2).

**Tabela 1.** Identificação e localidade de isolamento dos isolados de *Trichoderma* utilizados nos trabalhos.

| <b>Codificação</b> | <b>Espécie</b>      | <b>Município/Localidade</b>   |
|--------------------|---------------------|-------------------------------|
| TCS01              | <i>T. harzianum</i> | Campo Formoso/Morrinhos       |
| TCS09              | <i>T. viride</i>    | Campo Formoso/Morrinhos       |
| TCS28              | <i>T. virens</i>    | Campo Formoso/Toca da Novilha |
| TCS31              | <i>T. harzianum</i> | Araci/ Área 2                 |
| TCS34              | <i>T. harzianum</i> | Araci/Área 2                  |
| TCS35              | <i>T. harzianum</i> | Araci/Área 2                  |
| TCS36              | <i>T. harzianum</i> | Retirolândia/Área 1           |
| TCS39              | <i>T. virens</i>    | Retirolândia/Área 1           |
| TCS41              | <i>T. harzianum</i> | Retirolândia/Área 2           |
| TCS42              | <i>T. harzianum</i> | Retirolândia/ Área 2          |
| TCS43              | <i>T. virens</i>    | Retirolândia/Área 2           |
| TCS73              | <i>T. erinaceum</i> | Jacobina/Área 1               |
| TCS76              | <i>T. harzianum</i> | Valente/Área 1                |

### **Antagonismo entre isolados de *Trichoderma* spp. em meio de cultura**

Isolados de *Trichoderma* (*T. viride* – isolado TCS09, *T. virens* -TCS28, *T. harzianum*-TCS34, *T. harzianum* -TCS35, *T. harzianum* -TCS36, *T. virens* -TCS39 e *T. virens* -TCS43) provenientes de áreas de produção de sisal (Figura 1) e que apresentaram antagonismo à *A. niger*, em experimentos realizados em laboratório, foram pareados em meio de cultivo BDA (batata, dextrose, agar) diluído para 1/5, para a verificação do antagonismo entre esses isolados.

Para o pareamento, foi colocado em cada lateral da placa de Petri, um disco de micélio de isolado de *Trichoderma*, ambos a 1,0 cm da borda da placa, em direção oposta. Os tratamentos consistiram de diferentes combinações de isolados de *Trichoderma*, pareados em placas de Petri. Os controles consistiram de placas de Petri contendo apenas um isolado de *Trichoderma*, em uma lateral da placa. A partir de cinco dias foi medido o tamanho da colônia, por meio de medição do raio da colônia de *Trichoderma*, no sentido de seu crescimento para o centro da placa e feita a comparação com o respectivo controle.

### **Avaliação das formulações de *Trichoderma* de forma combinada e isolada, para o controle da podridão vermelha.**

O experimento foi conduzido no município de Ourolândia-BA e Cruz das Almas-BA. Para o preparo da suspensão, o formulado de *Trichoderma* foi adicionado a um becker contendo água, efetuando-se o cálculo das UFCs (determinado no rótulo do produto enviado pela empresa) de forma que a concentração ficasse em  $10^6$  esporos  $\text{mL}^{-1}$ , sendo avaliadas 12 formulações (*T. harzianum* – isolado TCS31, *T. harzianum* - TCS42, *T. harzianum* - TCS76, *T. harzianum* - TCS01, *T. harzianum* - TCS41, *T. harzianum* - TCS35, *T. virens* - TCS28, *T. virens* - TCS43, *T. virens* - TCS39, *T. erinaceum* - TCS73, *T. harzianum* - TCS34, *T. viride* - TCS09) e 7 combinações (C1 (TCS01+TCS76); C2 (TCS09+TCS76); C3 (TCS28+TCS76); C4 (TCS34+TCS76); C5 (TCS35+TCS76); C6 (TCS43+TCS76) e C7 (TCS09+TCS35+TCS76)).

Mudas de sisal com 20 a 30 cm de altura foram transplantadas para sacos pretos de polietileno (sacos para mudas), contendo 3 litros de solo. Para a inoculação, foram feitos ferimentos padronizados com quatro furos em pontos equidistantes ao redor do caule de cada muda. As formulações de *Trichoderma*, e suas combinações foram aplicadas no caule da planta e superfície do solo, com adição de 1 mL da suspensão por planta. Após 24 horas de inoculação com *Trichoderma*, a região do caule foi inoculada com uma suspensão de *A. niger*, por meio da adição de 1 mL de uma suspensão de esporos na concentração de  $10^7$  esporos  $\text{mL}^{-1}$ . A avaliação da doença foi realizada aos 30 dias após a inoculação das mudas, por meio do corte da planta e observação da presença dos sintomas no caule, com escala de notas de severidade da doença desenvolvida por Sá (2009). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 15 repetições.

Os dados foram transformados para Índice de Severidade da Doença, conforme McKinney (1923), por meio da fórmula:

$$\text{Índice de severidade da doença} = \frac{\sum(\text{Grau da escala} \times \text{frequência}) \times 100}{\text{n}^\circ \text{ total de unidades} \times \text{grau máximo da escala}}$$

Realizou-se a análise de Clusters em função do índice de severidade da doença com base em distância Euclidiana, utilizando o método de Ward de agrupamento.

### **Supressão de *Aspergillus niger* por combinações de isolados de *Trichoderma* no solo.**

Com o objetivo de avaliar a eficiência de combinações de *Trichoderma* no controle de *A. niger* em solo da região sisaleira da Bahia, foram realizados experimentos com isolados de *Trichoderma* pré-selecionados.

Amostras de solos das áreas produtoras de sisal foram coletadas e acondicionadas em recipientes plásticos com capacidade para 100 mL (60 g de solo por recipiente). Os tratamentos consistiram da infestação do solo, acrescido de resíduo de sisal, com uma suspensão de esporos de *A. niger* e diferentes combinações de isolados de *Trichoderma* formulados (ambos na concentração de  $10^7$  esporos . mL<sup>-1</sup>). O controle negativo consistiu do solo infestado apenas com suspensão de *A. niger* e o controle positivo foi o solo sem infestação.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três repetições. As microparcels constituídas pelo solo infestado com os micro-organismos e o controle foram mantidas em câmara incubadora tipo B.O.D, a 32°C, com umidade do solo mantida a 20%, sendo controlada por meio do peso e reposição de água nos recipientes com o solo. Sub-amostras das microparcels foram avaliadas a cada sete dias com retirada de 10 gramas de solo, pelo método de diluição seriada e plaqueamento em meio seletivo para *Trichoderma* (meio TSM: 0,2 g de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,9 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,15 g de KCl; 1 g de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>; 3 g de dextrose; 0,15 g de rosa de bengala; 3 ml de Triton 100; 2 ml/L de Carbendazim diluído em acetona; 15 g de agar, 1 L de água destilada esterilizada e 1 mL de tormicina, sendo este adicionado no momento de verter o meio). Também foi feito o plaqueamento em meio semi seletivo para *A. niger*, BDA com 6% de NaCl e 1 mL L<sup>-1</sup> de tormicina. As placas foram incubadas por três dias a temperatura ambiente (28±2 °C). Fez-se a contagem das UFCs e o cálculo por grama de solo, para avaliação da flutuação populacional do patógeno e do antagonista.

As áreas abaixo das curvas (AAC) geradas foram calculadas pela fórmula descrita por Shaner; Finney (1977):

$$AAC = \sum_{i=1}^n [(Y_{i+1} + Y_i)/2] \times [(T_{i+1} - T_i)]$$

Onde:  $n$  é o número de observações;  $Y_i$  é o número de UFCs g solo<sup>-1</sup> na “i”-ésima observação;  $T_i$  é o tempo em dias na “i”-ésima observação.

Os dados foram comparados pelo teste de comparação de médias de Tukey a 5% de probabilidade.

### **Avaliação de isolados de actinobactérias e *Trichoderma* aplicados de forma combinada e isolada para o controle da podridão vermelha.**

Isolados de actinobactérias (AC12, AC16, AC19, AC24 e AC92), selecionados de acordo com resultados de pesquisas anteriores, foram multiplicados em meio de cultivo AGS sólido e incubados a temperatura ambiente por 14 dias. Após crescimento foram retirados cinco discos do meio com a cultura das actinobactérias, sendo estes transferidos para frascos de Erlenmeyer de 250 ml, contendo meio de cultivo AGS líquido, sendo incubados sob agitação em mesa agitadora durante 14 dias, para a obtenção do inóculo de actinobactérias.

Para o preparo de uma suspensão de *Trichoderma*, o formulado de *Trichoderma harzianum*, isolado TCS76 foi adicionado a um becker contendo água, de forma que a concentração ficasse em 10<sup>6</sup> esporos mL<sup>-1</sup>, por meio do cálculo das UFCs determinada no rótulo do produto pela empresa.

Mudas de sisal com 20 a 30 cm de altura foram transplantadas para sacos pretos de polietileno (sacos para mudas), contendo 3 litros de solo. Para a inoculação foram feitos ferimentos padronizados com quatro furos em pontos equidistantes ao redor do caule de cada muda, onde foram inoculadas com as suspensões de actinobactérias e do isolado TCS76 de *T. harzianum* de forma isolada e combinada, por meio da adição de 1 mL de cada suspensão ou da mistura das suspensões.

Os tratamentos constituíram de quatro isolados de micro-organismos (AC12, AC19, AC92 e *T. harzianum* - TCS 76) e sete combinações desses micro-organismos: C1 (AC92 + AC12); C2 (AC92 + AC19); C3 (AC12 + AC19); C4 (AC12 + AC19 + AC92); C5 (TCS76 + AC92); C6 (TCS76 + AC12) e C7 (TCS76 + AC19).

Os controles foram constituídos de aplicação somente de meio AGS (controle positivo) e *A. niger* (controle negativo).

As mudas permaneceram no campo, no município de Ourolândia-Ba e em casa de vegetação no município de Cruz das Almas. Após 15 dias, as mudas foram lesionadas novamente, como descrito anteriormente, e inoculadas com *A. niger*, por meio da aplicação de 1 mL de uma suspensão de esporos de *A. niger* na concentração  $10^7$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ . As avaliações foram realizadas 30 dias após a inoculação com *A. niger*, por meio do corte da planta e observação da severidade por meio de escala de notas proposta por Sá (2009). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 15 repetições.

Os dados foram transformados para Índice de Severidade da Doença, conforme McKinney (1923), por meio da fórmula:

$$\text{Índice de severidade da doença} = \frac{\sum(\text{Grau da escala} \times \text{frequência}) \times 100}{\text{n}^\circ \text{ total de unidades} \times \text{grau máximo da escala}}$$

Realizou-se a análise de Clusters em função do índice de severidade da doença com base em distância Euclidiana, utilizando o método de Ward de agrupamento.

### **Avaliação do potencial de colonização de plantas de sisal com os melhores isolados de *Trichoderma***

Mudas de sisal foram transplantadas para copos de plástico perfurados, com 500 mL de solo e mantidas em casa de vegetação, com irrigação periódica, no município de Cruz das Almas. Para inoculação foram feitos dois furos padronizados ao redor do caule de cada muda, sendo aplicados 2 mL das suspensões das formulações e suas combinações, nessas lesões do caule, conforme descrito anteriormente.

Para preparo da suspensão de inóculo, os formulados dos isolados (*T. viride* - TCS09 e *T. harzianum*, isolados TCS34, TCS35 e TCS76) e as combinações de *Trichoderma* C2 (TCS09 + TCS76) e C4 (TCS34 + TCS76) foram diluídos em água destilada esterilizada, até atingir a concentração final de  $10^6$  esporos.  $\text{mL}^{-1}$ . Foram avaliadas as quatro formulações de *Trichoderma* e duas combinações das formulações preparadas pela Empresa Sementes Farroupilha, com isolados

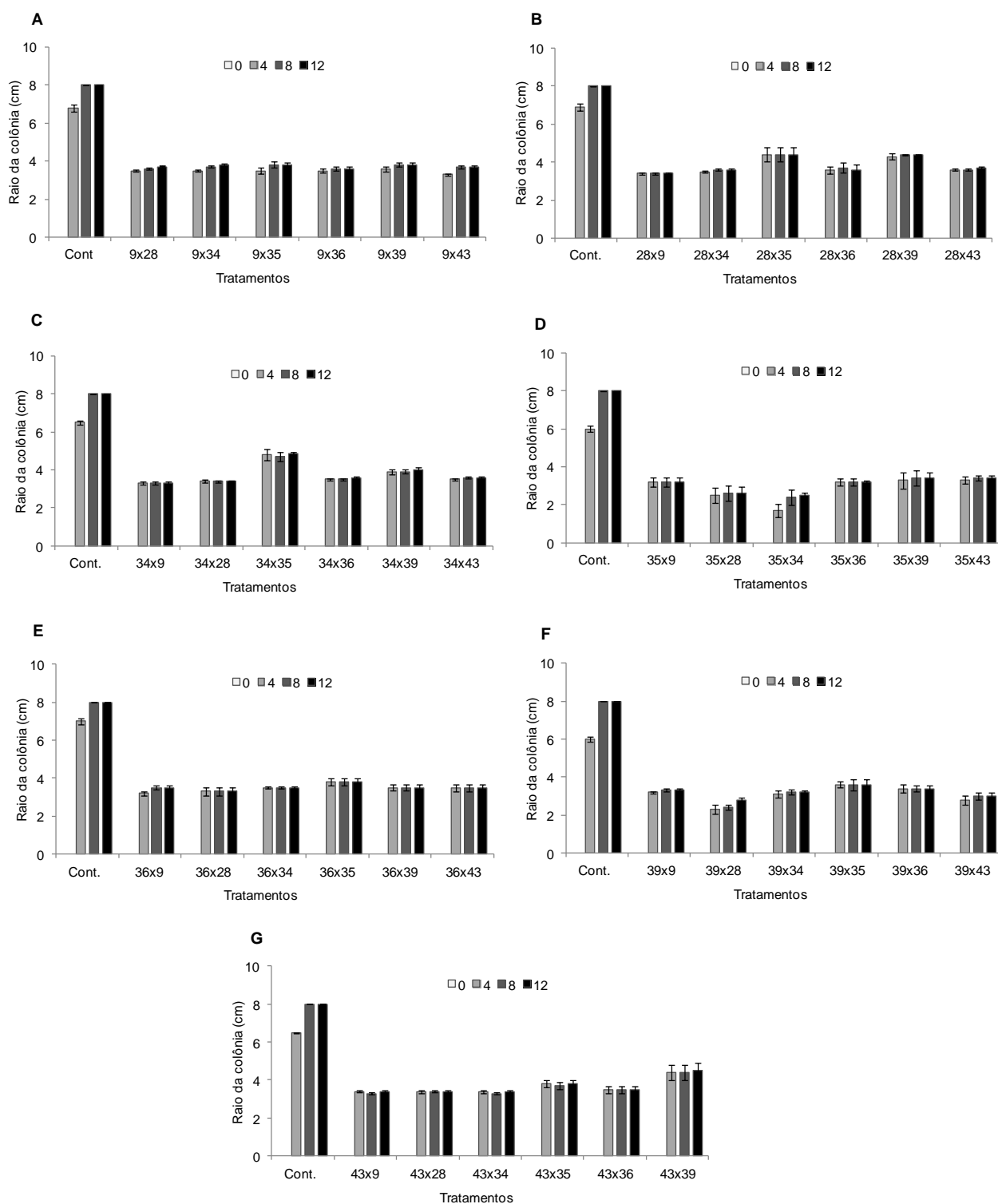
selecionados em trabalhos anteriores para o controle da podridão vermelha do sisal. O controle positivo foi constituído de mudas não inoculadas, com adição de água nos ferimentos do caule. O experimento foi inteiramente casualizado com sete tratamentos (T1: C+ (controle positivo contendo apenas água); T2: C4 (combinação dos formulados dos isolados TCS34 e TCS76); T3: (formulado do isolado TCS09); T4: C2 (combinação dos formulados dos isolados TCS09 e TCS76); T5: (formulado do isolado TCS35); T6: (formulado do isolado TCS76) e T7: (formulado do isolado TCS34), com três repetições.

Para avaliação da colonização, três plantas de cada tratamento foram coletadas a cada sete dias, por um período de três semanas consecutivas. No laboratório, as plantas foram lavadas em água corrente, fez-se a separação do caule e folhas e pedaços desses órgãos foram desinfestados com hipoclorito de sódio diluído a 1% (2 minutos), álcool diluído a 70% (2 minutos) e lavados três vezes com água destilada esterilizada. Os pedaços de tecido desinfestados foram transferidos, com auxílio de uma pinça esterilizada, para placas de Petri com meio TSM (meio BDA acrescido de: 0,2 g de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 0,9 g de  $KH_2PO_4$ ; 0,15 g KCl; 1 g de  $NH_4NO_3$ ; 3 g de dextrose; 0,15 g de Rosa de Bengala; 3 mL de Triton X100 e 2 mL de Carbendazim (solução estoque 0,05mL/L)) com 1 mL . L<sup>-1</sup> de tormicina. O ensaio foi incubado em câmara de crescimento tipo B.O.D a 28 °C por cinco dias. Após a incubação, visualizou-se a presença ou não do crescimento de *Trichoderma* nos tecidos.

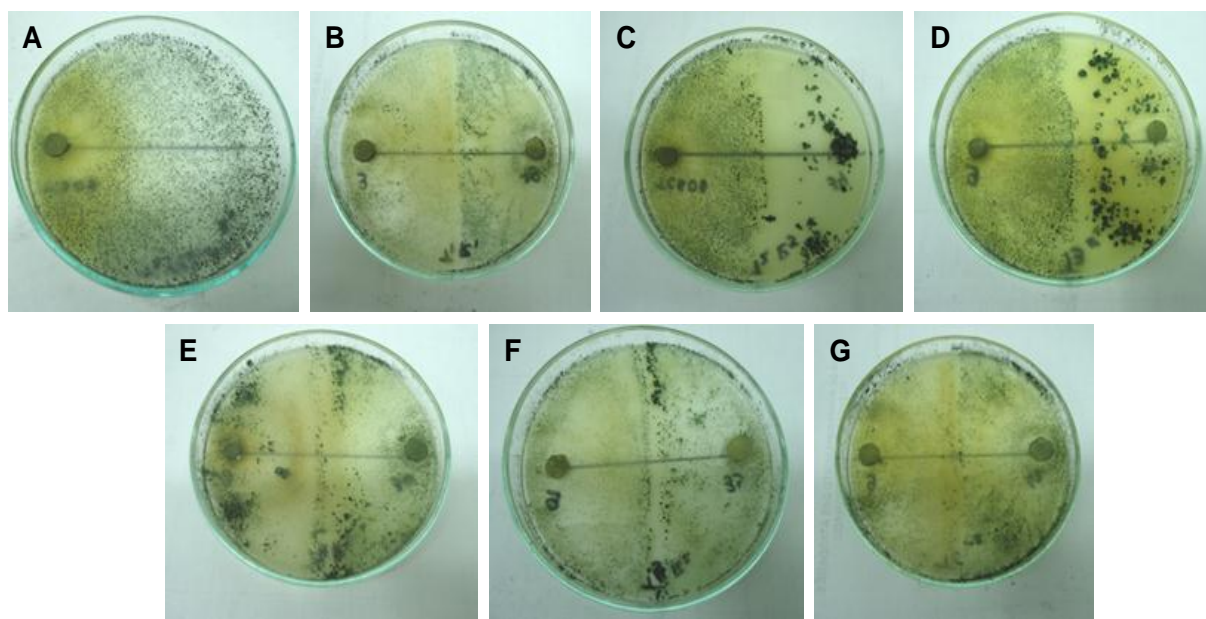
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os isolados de *Trichoderma* cresceram bem no meio BDA diluído para 20%. O teste de antagonismo entre os isolados de *Trichoderma* indicou que, quando pareados em meio de cultura sólido, os isolados apresentam crescimento micelial reduzido, em comparação com os respectivos controles (Figura 1). O estudo de antagonismo entre os isolados faz-se necessário para os trabalhos com a combinação de diferentes isolados de micro-organismos, com potencial para o controle de doenças de plantas.



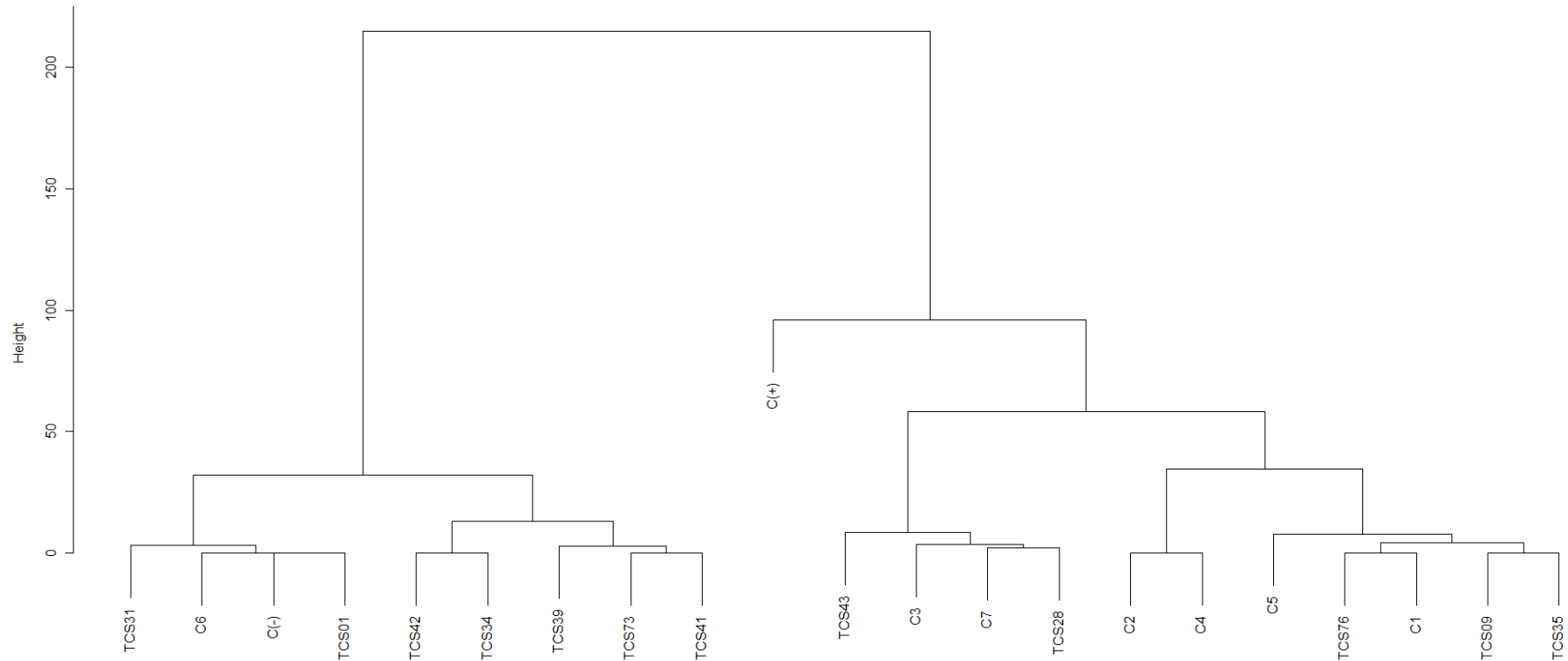


**Figura 1.** Raio da colônia de isolados de *Trichoderma* pareados em placas de Petri com meio de cultivo BDA 20%. (A) *T. viride*-TCS09, (B) *T. virens*-TCS28, (C) *T. harzianum*-TCS34, (D) *T. harzianum*-TCS35, (E) *T. harzianum*-TCS36, (F) *T. virens*-TCS39 e (G) *T. virens*-TCS43. Avaliações realizadas em 0, 4, 8 e 12 dias. Barras representam o erro padrão da média



**Figura 2.** Pareamento com isolado de *Trichoderma* TCS09 (A) Controle, (B) TCS09 X TCS28, (C) TCS09 X TCS 34 (D) TCS09 X TCS 35 (E) TCS09 X TCS 36, (F) TCS09 X TCS39 e (G) TCS09 X TCS 43.

As formulações desenvolvidas pela Empresa Sementes Farropilha e as combinações das formulações dos melhores isolados de *Trichoderma* foram avaliadas para o controle da podridão vermelha em mudas de sisal, nas condições climáticas da região sisaleira de Ouro-lândia e de Cruz das Almas, na Bahia. Os trabalhos realizados com 12 formulações e 7 combinações de isolados de *Trichoderma*, nas condições de semiárido do município de Ouro-lândia, demonstraram que os formulados com os isolados de *Trichoderma* utilizados de forma isolada ou combinada promoveram a redução significativa da severidade da podridão vermelha em mudas de sisal (Figura 3), pois cinco isolados de *Trichoderma* (*T. virens* - TCS43 e TCS28; *T. harzianum* - TCS76 e TCS35 e *T. viride* - TCS09), além de todas combinações, exceto a C6 (*T. virens* - TCS43 + *T. harzianum* - TCS76). Estes isolados e as combinações foram agrupados pela análise de *clusters* próximo ao controle positivo não inoculado, indicando o seu potencial para o controle desta doença.



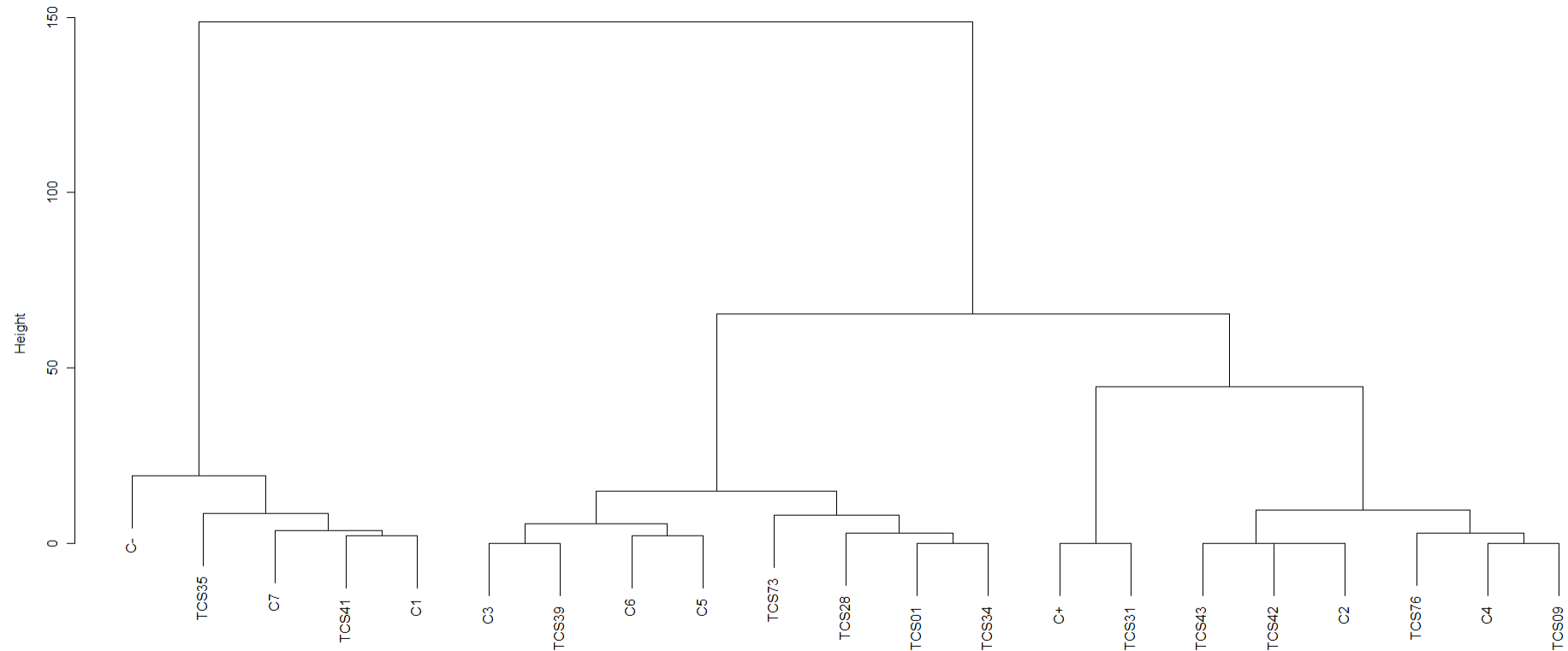
**Figura 3.** Representação gráfica da análise de *Clusters* em função do índice de severidade da podridão vermelha do sisal em mudas inoculadas com isolados de *Trichoderma* formulados pela empresa Sementes Farroupilha, aplicados na planta de forma combinada e isolada e, após 24 horas, inoculadas com *A. niger*, no município de Ourolândia-BA. CT(-) corresponde ao controle negativo (mudas inoculadas apenas com *A. niger*), CT(+) corresponde a mudas não inoculadas. C1 (TCS01+TCS76); C2 (TCS09+TCS76); C3 (TCS28+TCS76); C4 (TCS34+TCS76); C5 (TCS35+TCS76); C6 (TCS43+TCS76); C7 (TCS09+TCS35+TCS76). Os dados foram analisados com base em distância Euclidiana, utilizando o método de agrupamento de Ward.

Entretanto, observou-se uma incidência de 46,67% no tratamento com a combinação C4, que correspondem aos isolados de *T. harzianum* TCS34 e TCS76, que possuem à menor incidência entre todos os tratamentos no município de Ourolândia (Tabela 2).

**Tabela 2.** Incidência da podridão vermelha do sisal em mudas inoculadas com *A. niger* e diferentes isolados de *Trichoderma* formulados, aplicados isoladamente e combinados, em experimentos realizados nos municípios de Cruz das Almas e Ourolândia-BA.

| Isolados / Combinações | Ourolândia (%) | Cruz das Almas (%) |
|------------------------|----------------|--------------------|
| TCS01                  | 86,67          | 40,00              |
| TCS09                  | 66,67          | 33,33              |
| TCS28                  | 73,33          | 33,33              |
| TCS31                  | 86,67          | 13,33              |
| TCS34                  | 100,00         | 60,00              |
| TCS35                  | 60,00          | 80,00              |
| TCS39                  | 100,00         | 40,00              |
| TCS41                  | 100,00         | 100,00             |
| TCS42                  | 100,00         | 100,00             |
| TCS43                  | 86,67          | 33,33              |
| TCS73                  | 93,33          | 53,33              |
| TCS76                  | 60,00          | 33,33              |
| C1(TCS01+TCS76)        | 66,67          | 66,67              |
| C2(TCS09+TCS76)        | 60,00          | 33,33              |
| C3(TCS28+TCS76)        | 80,00          | 40,00              |
| C4(TCS34+TCS76)        | 46,67          | 20,00              |
| C5(TCS35+TCS76)        | 66,67          | 33,33              |
| C6(TCS43+TCS76)        | 86,67          | 46,67              |
| C7(TCS09+TCS35+TCS76)  | 73,33          | 66,67              |
| Controle negativo      | 86,67          | 93,33              |
| Controle positivo      | 6,67           | 13,33              |

No experimento conduzido no município de Cruz das Almas (Figura 4), foram obtidas melhores respostas na redução da severidade da podridão vermelha do sisal, para os tratamentos contendo os isolados *T. harzianum* -TCS31, TCS42 e TCS76; *T. virens* - TCS43 e *T. viride* - TCS09, aplicados isoladamente e as combinações C2 (*T. viride* - TCS09 + *T. harzianum* - TCS76) e C4 (*T. harzianum* - TCS34 + *T. harzianum* - TCS76). Dentre esses tratamentos, a combinação C4 promoveu uma menor incidência da doença, observando-se apenas 20% de plantas sintomáticas (Tabela 2).



**Figura 4.** Representação gráfica da análise de *Clusters* em função do índice de severidade da podridão vermelha do sisal em mudas inoculadas com isolados de *Trichoderma* formulados pela empresa Sementes Farroupilha, aplicados na planta de forma combinada e isolada e, após 24 horas, inoculadas com *A. niger*, no município de Cruz das Almas-BA. CT(-) corresponde ao controle negativo (mudas inoculadas apenas com *A. niger*), CT(+) corresponde a mudas não inoculadas. C1 (TCS01+TCS76); C2 (TCS09+TCS76); C3 (TCS28+TCS76); C4 (TCS34+TCS76); C5 (TCS35+TCS76); C6 (TCS43+TCS76); C7 (TCS09+TCS35+TCS76). Os dados foram analisados com base em distância Euclidiana, utilizando o método de agrupamento de Ward.

Dentre as formulações dos isolados de *Trichoderma*, as com *T. viride* -TCS09, *T. virens* - TCS43 e *T. harzianum* - TCS76 foram as que apresentaram os melhores resultados na redução da severidade da doença, para os dois ambientes estudados, além das combinações C2 (*T. viride* - TCS09 + *T. harzianum* - TCS76) e C4 (*T. harzianum* - TCS34 + *T. harzianum* - TCS76).

Apesar de diminuir a severidade e incidência da doença a um nível de 13,33%, nas condições do experimento realizado em Cruz das Almas, o *T. harzianum*, isolado TCS31, não foi eficiente nas condições de Orolândia, indicando que as condições ambientais interferem de forma significativa na resposta do agente de biocontrole.

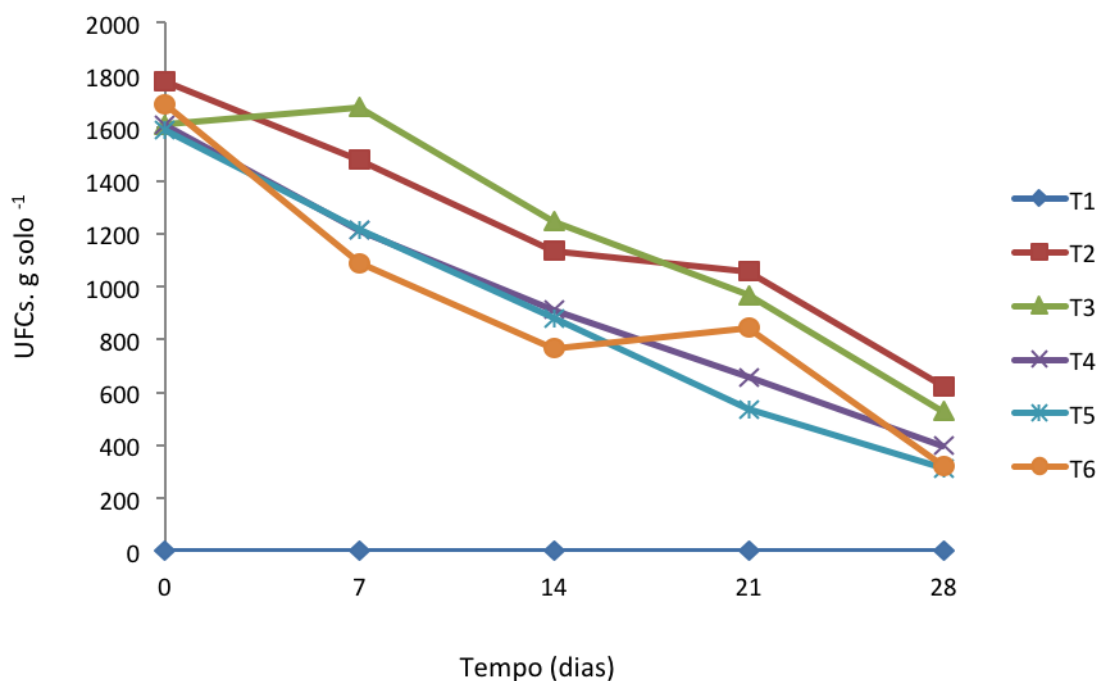
Segundo Guetsky et al. (2001), as maiores limitações do controle biológico de doenças de plantas são os fatores ambientais, que frequentemente resulta na não repetibilidade dos resultados em locais com condições ambientais diferenciadas.

Apesar das combinações C2 e C4 serem eficientes nas duas condições ambientais avaliadas, não podemos concluir que houve potencialização do efeito de biocontrole por estas combinações de isolados, pois a combinação C2 é composta por isolados que responderam de forma significativa nos dois ambientes, quando testados em separado, e a combinação C4 é composta pelo isolado *T. harzianum* - TCS76, que também reduziu significativamente a severidade e incidência da doença nos dois experimentos. Provavelmente, o efeito positivo das combinações ocorreu devido ao isolado TCS76 de *T. harzianum*, pois nos demais tratamentos com esse isolado houve uma tendência de diminuição da incidência da doença.

A combinação de agentes de biocontrole, especialmente quando estes exibem modos complementares de ação, tem revelado a correção de vários fatores negativos nos produtos biológicos, por envolver gêneros e espécies de micro-organismos com mecanismos diferentes de sobrevivência e ação (ELAD et al., 1994;. GUETSKY et al., 2001; SZCZECH; SHODA, 2004, SZCZECH; SHODA 2006; LI et al., 2005). Entretanto, no presente trabalho, a combinação de isolados não promoveu maior eficiência no controle da podridão vermelha do sisal.

Diversos trabalhos tem revelado o sucesso das espécies de *Trichoderma* no controle de várias doenças de plantas (YEDIDIA et al., 2001; SHARON et al., 2001; OKIGBO; IKEDIUGWU, 2000; ETEBARIAN et al., 2000; BURNS; BENSON, 2000), com as espécies *T. virens*, *T. viride* e *T. harzianum* sendo as mais descritas no controle biológico de doenças de plantas.

Quanto ao efeito supressivo de formulações de *Trichoderma* à *A. niger* no solo, houve uma queda na população tanto de *A. niger* quanto de *Trichoderma*, que se estabilizou com o tempo (Figuras 5 e 6).



**Figura 5.** Avaliação do comportamento de *A. niger* no solo tratado com diferentes combinações de formulados de *Trichoderma*. T1 (C(+), água destilada); T2 (C(-), apenas *A. niger*); T3 (TCS09+TCS34 e *A. niger*); T4 (TCS09+TCS76 e *A. niger*); T5 (TCS34+TCS76) e *A. niger*); T6 (TCS09+TCS 34+TCS76) e *A. niger*).

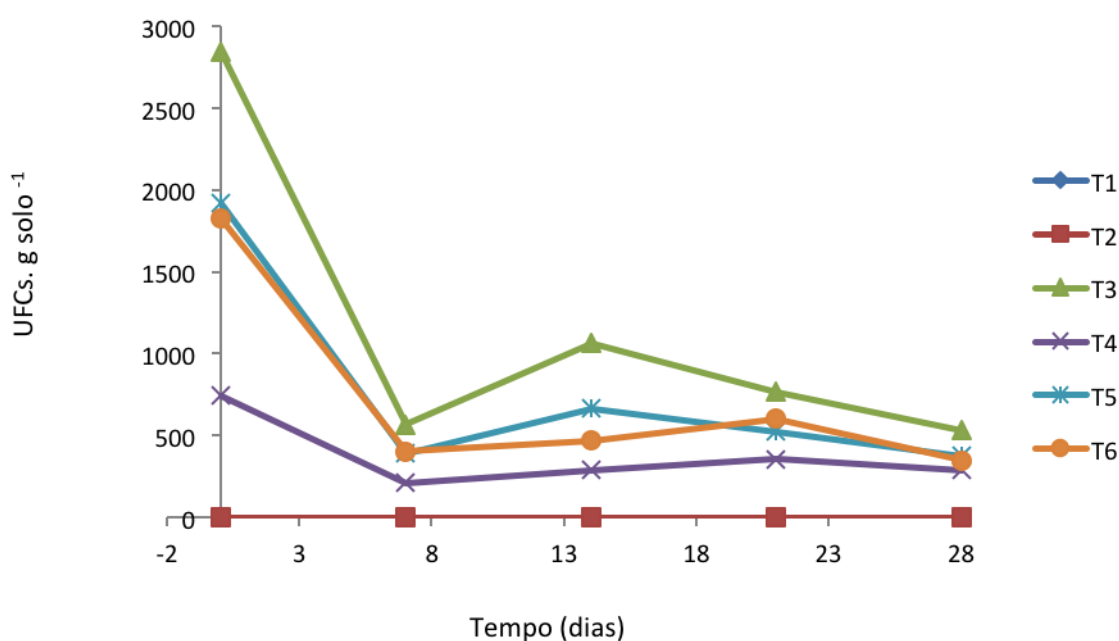
As áreas abaixo da curva indicam que não ocorreu diferença significativa entre os tratamentos, o que indica que não há inibição do crescimento do *A. niger* por *Trichoderma* no solo. Também houve um decréscimo da populacional do controle negativo, infestado apenas com *A. niger* (Tabela 3).

**Tabela 3.** Área abaixo da curva da supressão de *A. niger* por *Trichoderma*, aplicados em formulação de forma isolada e combinada em solo da região produtora de sisal do semiárido baiano.

| Tratamentos            | Área abaixo da curva |
|------------------------|----------------------|
| T1- Controle positivo  | 0 a                  |
| T2- Controle negativo  | $3,40 \times 10^4$ b |
| T3- TCS09+TCS34        | $3,47 \times 10^4$ b |
| T4- TCS09+TCS76        | $2,64 \times 10^4$ b |
| T5- TCS34+TCS76        | $2,50 \times 10^4$ b |
| T6- TCS09+TCS 34+TCS76 | $2,59 \times 10^4$ b |

Médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem entre si segundo o teste de comparação de médias de Tukey a 5% de probabilidade.

A avaliação da sobrevivência dos isolados de *Trichoderma* aplicados ao solo, de forma combinada (mistura de isolados), demonstrou que ao longo do tempo ocorre uma queda muito drástica da população de *Trichoderma* (Figura 6). Moreira e Siqueira (2002), afirmam que o fungo tende a diminuir sua população para garantir a sobrevivência, pois a população elevada do fungo no solo consome rapidamente os nutrientes necessários para a sua sobrevivência, havendo a necessidade de prevenir a explosão populacional no sentido de promover o equilíbrio microbiológico do solo.



**Figura 6.** Avaliação do comportamento de *Trichoderma* no solo tratado com diferentes combinações de *Trichoderma* formulados. T1 (C(+), água destilada); T2 (C(-), apenas *A. niger*); T3 (TCS09+TCS34 e *A. niger*); T4 (TCS09+TCS76 e *A. niger*); T5 (TCS34+TCS76) e *A. niger*); T6 (TCS09+TCS 34+TCS76) e *A. niger*).



Os agentes de controle biológico de patógenos habitantes do solo devem sobreviver competitivamente, atingindo um limiar populacional necessário ao biocontrole, onde uma pequena redução na população do patógeno pode ter um efeito considerável na eficácia do controle (RAAIJMAKERS et al., 1995).

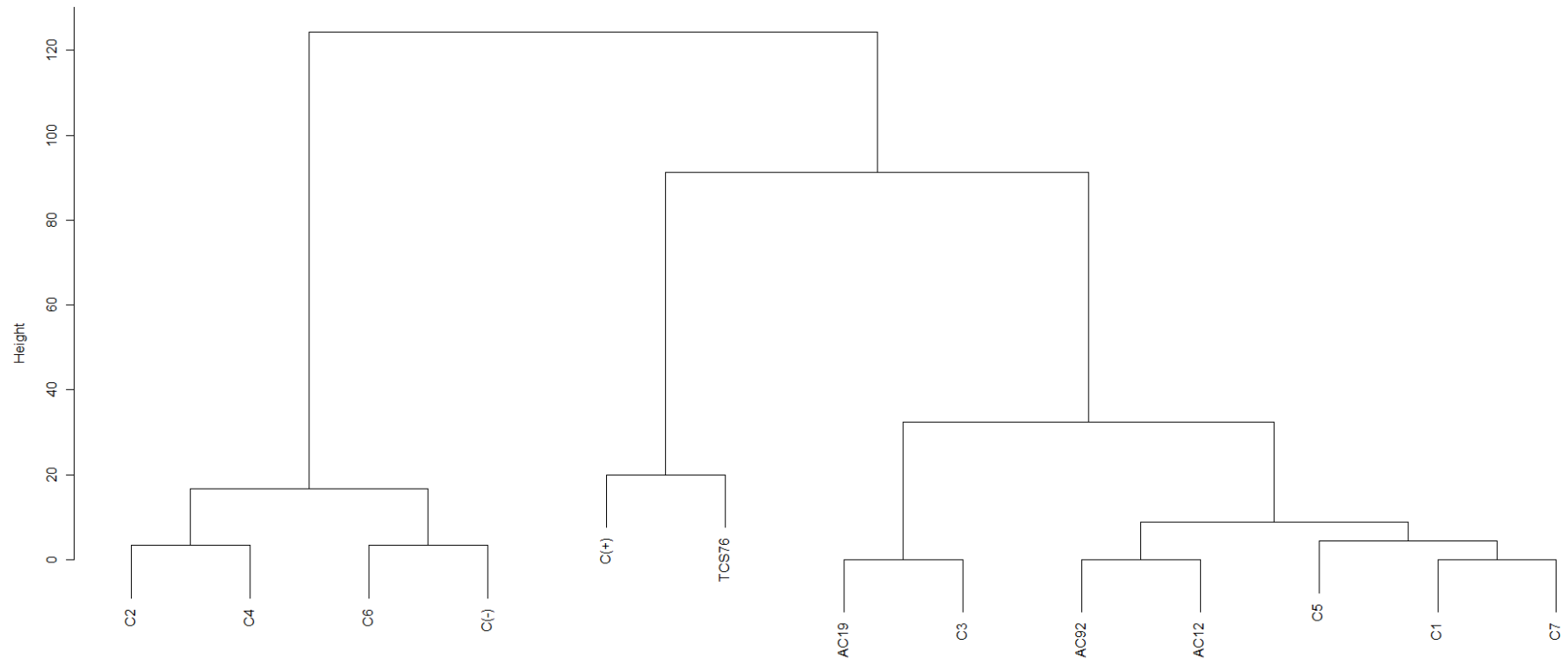
As áreas abaixo da curva de sobrevivência de *Trichoderma* no solo (Tabela 4) indicam a maior sobrevivência no tratamento T3 (*T. viride* - TCS09 + *T. harzianum* - TCS34). Isso implica na baixa competição desses isolados entre si, o que é positivo quando se deseja utilizar misturas de formulações de *Trichoderma* para o controle da podridão vermelha do sisal.

**Tabela 4.** Área abaixo da curva da sobrevivência de *Trichoderma*, aplicados em formulação de forma isolada e combinada em solo da região produtora de sisal do semiárido baiano.

| Tratamentos            | Área abaixo da curva      |
|------------------------|---------------------------|
| T1- Controle positivo  | 0 c                       |
| T2- Controle negativo  | 0 c                       |
| T3- TCS09+TCS34        | 2,86 x 10 <sup>4</sup> a  |
| T4- TCS09+TCS76        | 0,96 x 10 <sup>4</sup> bc |
| T5- TCS34+TCS76        | 1,90 x 10 <sup>4</sup> ab |
| T6- TCS09+TCS 34+TCS76 | 1,78 x 10 <sup>4</sup> ab |

Médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem entre si segundo o teste de comparação de médias de Tukey a 5% de probabilidade.

O experimento conduzido em Cruz das Almas, no campus da UFRB, com o objetivo de avaliar combinações de actinobactérias e *Trichoderma* no controle da podridão vermelha do sisal, demonstrou que *T. harzianum*, isolado TCS76 promoveu a redução na severidade da doença (Figura 7). A maior redução na incidência da doença também ocorreu no tratamento com esse isolado de *Trichoderma* (*T. harzianum*-TCS76), inoculado isoladamente, com 50% das mudas apresentando sintomas de podridão vermelha do sisal (Tabela 5).



**Figura 7.** Representação gráfica da análise de *Clusters* em função do índice de severidade da podridão vermelha do sisal em mudas inoculadas com isolados de *Trichoderma* spp. formulados e actinobactérias, de forma isoladas ou combinadas e após 15 dias inoculadas com *A. niger* no município de Cruz das Almas. C(-) corresponde ao controle negativo (inoculado apenas com *A. niger*); C(+) corresponde a não inoculação; C1 (AC92 + AC12); C2 (AC92 + AC19); C3 (AC12 + AC19); C4 (AC12 + AC19 + AC92); C5 (TCS76 + AC92); C6 (TCS76 + AC12); C7 (TCS76 + AC19). Os dados foram analisados com base em distância Euclidiana, utilizando o método de agrupamento de Ward.

Apesar das actinobactérias terem uma boa capacidade de sobrevivência nos solos (ZVYAGINTSEV et al., 2001), estas geralmente apresentam desenvolvimento lento em relação aos fungos de gênero *Trichoderma* que são mais competitivos que as actinobactérias, principalmente por esses isolados de *Trichoderma* serem oriundos de áreas de cultivo de sisal da região semiárida.

**Tabela 5.** Incidência da podridão vermelha do sisal em mudas inoculadas com actinobactérias e *Trichoderma harzianum* (isolado TCS76) isoladamente ou combinados\*.

| Isolados / Combinações      | Incidência (%) |
|-----------------------------|----------------|
| AC12                        | 100            |
| AC19                        | 100            |
| AC92                        | 70             |
| <i>T. harzianum</i> (TCS76) | 50             |
| C1 (AC92+AC12)              | 70             |
| C2 (AC92+AC19)              | 80             |
| C3 (AC12+AC19)              | 70             |
| C4 (AC92+AC12+AC19)         | 100            |
| C5 (AC92+TCS76)             | 60             |
| C6 (AC12+TCS76)             | 100            |
| C7 (AC19+TCS76)             | 70             |
| Controle negativo           | 100            |
| Controle positivo           | 0              |

\*Experimento realizado em casa de vegetação em Cruz das Almas-BA. Controle negativo corresponde a inoculação apenas com *A. niger*. Controle Positivo corresponde a não inoculação.

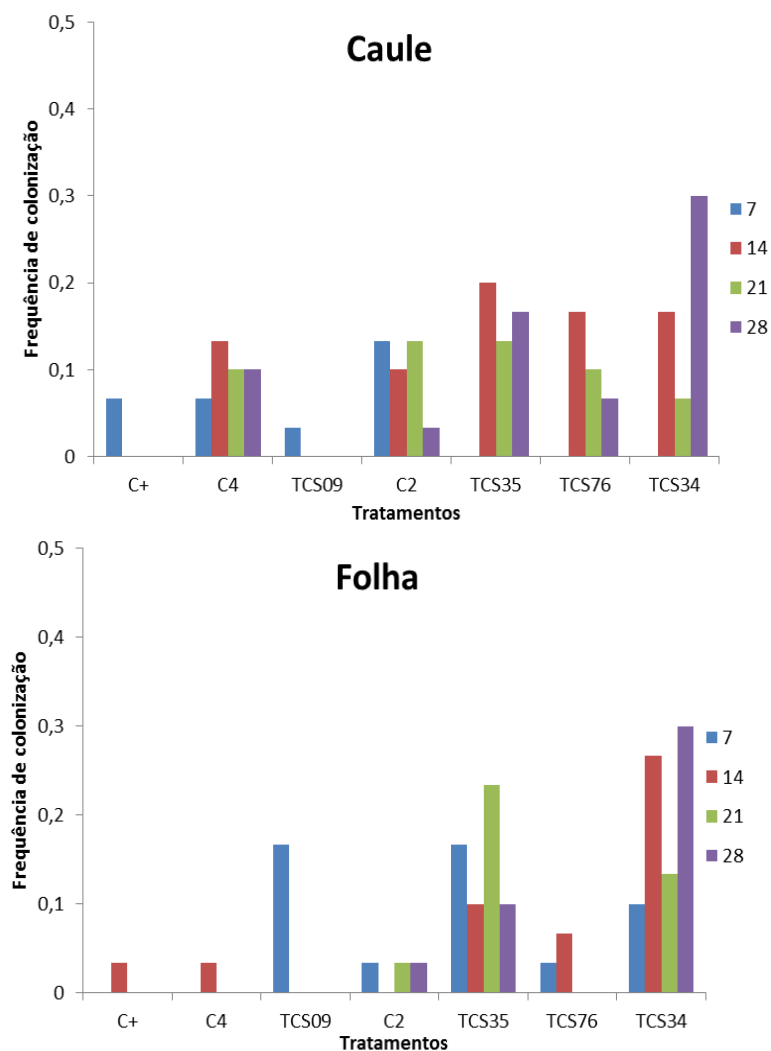
Devido à capacidade competitiva e a alta agressividade, os fungos do gênero *Trichoderma* estão entre os antagonistas mais estudados, pois são encontradas naturalmente em quase todos os tipos de solo e agem contra fitopatógenos por diferentes mecanismos (HARMAN et al., 2004; SHORESH et al., 2005; VITERBO et al., 2005; PERAZZOLLI et al., 2008; VINALE et al., 2008; BENITEZ et al, 2004), sendo as espécies *T. harzianum*, *T. virens* e *T. viride* as mais utilizadas como agentes de controle biológico de fitopatógenos (HERMOSA et al, 2000).

Os tratamentos com combinações não reduziram a severidade da doença nas condições de Cruz das Almas-BA. Apesar dos micro-organismos combinados não

apresentarem efeito significativo no controle da podridão vermelha do sisal, em geral, um controle eficaz de agentes patogênicos fúngicos de plantas requer estratégias integradas (XIAO et al. 2002).

Ezzyyani et al., (2007), estudaram o efeito do uso combinado de *Trichoderma harzianum* e *Streptomyces rochei* no controle da podridão radicular da pimenteira, causada por *Phytophthora capsici*, demonstrando que o uso combinado desses micro-organismos potencializou o controle.

Os testes com aplicação de *Trichoderma* na formulação elaborada pela empresa Sementes Farroupilha, com o objetivo de verificar a colonização endofítica das mudas de sisal por *Trichoderma*, realizados nas condições do município de Cruz das Almas-BA, demonstraram que todos os isolados apresentam o potencial de colonização endofítica tanto no caule como na folha, destacando-se o *T. harzianum* (isolado TCS34) (Figura 8 e 9). Entretanto, esse isolado quando aplicado de forma isolada, sem a combinação de isolados, não apresentou efeito na redução da severidade da doença (Figura 3 e 4).



**Figura 8.** Frequência da colonização por *Trichoderma* em fragmentos de caule e folha de mudas de sisal tratadas com formulações de diferentes isolados de *Trichoderma*. Os fragmentos do caule foram desinfestados e plaqueados em meio de cultivo TSM, sendo avaliados em 7, 14, 21 e 28 dias após inoculação.



**Figura 9.** Crescimento de *Trichoderma* em placas de petri com meio TSM, onde foram colocadas fragmentos de folha e caule desinfestadas, coletadas de mudas de sisal tratadas com formulados de *Trichoderma*.

Endófitos são descritos como micro-organismos que estabelecem uma relação de endosimbiose com plantas, em que as plantas recebem benefícios ecológicos da presença dos simbioss, tais como a capacidade para aumentar a tolerância ao estresse ou a promoção do crescimento de plantas (HASEGAWA et al. 2006). Essa capacidade de sobreviver na planta pode conferir uma proteção das mudas de sisal a infecção por *Aspergillus*, favorecendo a formação de mudas livres de doenças, caso os isolados de antagonistas tenham algum efeito positivo no biocontrole da doença.

## CONCLUSÕES

O uso combinado de *Trichoderma* e actinobactérias não potencializou o controle biológico da podridão vermelha do sisal.

As condições edafoclimáticas influenciam no controle biológico da podridão vermelha do sisal por *Trichoderma* e actinobactérias.

Os isolados TCS76 de *Trichoderma harzianum*, TCS43 de *T. virens* e TCS09 de *T. viride* tem potencial para o controle da podridão vermelha do sisal, nas condições edafoclimáticas de Orolândia e Cruz das Almas-BA.

Os isolados de *Trichoderma* não controlam *A. niger* quando aplicados no solo.

*Trichoderma* tem capacidade de colonização endofítica no sisal.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, K. C. L. M. **Epidemiologia da podridão vermelha do sisal no estado da Bahia**. Tese (Doutorado em Ciências agrárias na Universidade Federal da Bahia). Cruz das Almas – BA, 106 p, 2010.

BARAKATE, M.; OUHDOUCH, Y.; OUFDOU, K.; BEAULIEU, C. Characterization of rhizospheric soil streptomycetes from Moroccan habitats and their antimicrobial activities. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.17, p.49–54, 2002.

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

BENIZRI, E.; BAUDOIN, E.; GUCKERT, A. Root colonization by inoculated plant growth-promoting rhizobacteria. **Biocontrol Science and Technology**, v.11, p.557–574, 2001.

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

BOUKAEW, S.; CHUENCHIT, S.; PETCHARAT, V. Evaluation of *Streptomyces* spp. for biological control of Sclerotium root and stem rot and Ralstonia wilt of chili pepper. **BioControl**, v.56, p.365-374, 2011.

BURNS, J. R.; BENSON, D. M. Biocontrol of damping-off of *Catharanthus roseus* caused by *Pythium ultimum* with *Trichoderma virens* and binucleate Rhizoctonia fungi. **Plant Disease**, v.84, n.6, p.644-648, 2000.

CAMPANHOLA, C.; BETTIOL, W. **Métodos alternativos de controle fitossanitário**. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, 2003. 279p.

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

ELAD, Y.; KOHL, J.; FOKKEMA, N. J. Control of infection and sporulation of *Botrytis cinerea* on bean and tomato by saprophytic bacteria and fungi. **European Journal of Plant Pathology**, v.100, p.315-336, 1994.

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

EZZIYYANI, M.; REQUENA, M. E.; EGEA-GILABERT, C.; CANDELA, M. E. Biological control of phytophthora root rot of pepper using *Trichoderma harzianum* and *Streptomyces rochei* in combination. **Phytopathology**, v.155, p.342-349, 2007.

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

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

HASEGAWA, S.; MEGURO, A.; SHIMIZU, M.; NISHIMURA, T.; KUNOH, H. Endophytic actinomycetes and their interactions with plants. **Actinomycetol**, v.20, p.72-81, 2006.

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

IBGE **Lavoura permanente** 2010. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/estadosat/temas.php?sigla=ba&tema=lavourapermanente2010>> Acesso em: 06 set 2011.

KATSIFAS, E. A.; GIANNOUTSOU, E. P.; KARAGOUNI, A. D. Diversity of streptomycetes among specific Greek terrestrial ecosystems. **Letters of Applied Microbiology**, v.29, p.48–51,1999.

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

MCKINNEY, H. H. 1923. Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. **Journal of Agricultural Research**, Washington, v. 26, p.195-218, 1923.

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

MICHEREFF, S. J. ; ANDRADE, D. E. G. T.; PERUCH, L. A. M. Inóculo de patógenos radiculares. In: MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E. G. T.; MENEZES, M. (Org.). **Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais**. 1ed. Recife: Imprensa Universitária da UFRPE, 2005, v. 1, p. 93-124.

MENEZES, M. (Eds.) **Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais**. Recife: Imprensa Universitária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2005.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. Lavras: Editora UFLA, 2002.

OKIGBO, R. N.; IKEDIUGWU, F. E. O. Studies on biological control of postharvest rot in yams (*Dioscorea* spp.) using *Trichoderma viride*. **Journal of Phytopathology**, v.148, p.351-355, 2000.

OSKAY, M. Effects of some Environmental Conditions on Biomass and Antimicrobial Metabolite Production by *Streptomyces* sp., KGG32. **International Journal of Agriculture and Biology**, v.13, n.3, 2011.

PERAZZOLLI, M.; DAGOSTIN, S.; FERRARI, A.; ELAD, Y.; PERTOT, I. Induction of systemic resistance against *Plasmopara viticola* in grapevine by *Trichoderma harzianum* T39 and benzothiadizole. **Biological Control**, v.47, p.228-234, 2008.

RAAIJMAKERS, J. M.; LEEMAN, M.; VAN OORSCHOT, M. M. P.; VAN DER SLUIS I.; SCHIPPERS, B.; BAKKER, P. A. H. M. Dose–response relationships in biological control of fusarium wilt of radish by *Pseudomonas* spp. **Phytopathology**, v.85, p.1075-1081, 1995.

SÁ, J. O. de **Patogênese de *Aspergillus niger* e biocontrole da podridão vermelha do sisal por *Trichoderma* spp.** , Dissertação - Cruz das Almas, BA, 2009, 54 p.



SAJID, I.; SHAABAN, K. A.; HASNAIN, S. Identification, isolation and optimization of antifungal metabolites from the *streptomyces malachitofuscus* ctf9. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.42: p.592-604, 2011.

SCOTT E. B. *Aspergillus niger* genomics: Past, present and into the future. **Medical Mycology**, v.44, p.17-21, 2006.

SEPLAN- **Inclusão Social. Bahia que faz: Densificação da base econômica e geração de emprego e renda.** Relatório de Atividades. Governo do Estado da Bahia, Disponível em: <[http://www.seplan.ba.gov.br/sgc/arquivos/\\_152309\\_11\\_inclusao.pdf](http://www.seplan.ba.gov.br/sgc/arquivos/_152309_11_inclusao.pdf)>. Acesso em: 10/07/2011.

SHANER, G.; FINNEY, R. E. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in knox wheat. **Phytopathology**, v.70, n.1, p.1183-1186, 1977.

SHARON, E.; BAR-EYAL, M.; CHET, I.; HERRARA-ESTRELLA, A.; KLEIFELD, O.; SPIEGEL, Y. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. **Biological Control**, v.91, n.7, p.687-693, 2001.

SHORESH, M.; YEDIDIA, I.; CHET, I. Involvement of jasmonic acid/ethylene signaling pathway in the systemic resistance induced in cucumber by *Trichoderma asperellum* T203. **Phytopathology**, v.95, p.76-84, 2005.

SILVA, J. R. Q. **Agente etiológico da podridão vermelha do sisal: Densidade populacional, sobrevivência, caracterização genética e de agressividade.** 2012. 98 f. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2012a.

SILVA, M. H. S. da. **Aspectos bioecológicos de *Aspergillus niger*, fungo causador da podridão vermelha do sisal,** 2012. 86 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2012b.

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

SZCZECH, M.; SHODA, M. Biocontrol de Rhizoctonia damping-off of tomato by *Bacillus subtilis* combined with *Burkholderia cepacia*. **Journal of Plant Pathology**, v.152, p.549-556, 2004.

SZCZECH, M.; SHODA, M. The effect of mode of application of *Bacillus subtilis* RB14-C on its efficacy as a biocontrol agent against *Rhizoctonia solani*. **Journal of Phytopathology**, v.154, p.370-377, 2006.

VINALE, F.; SIVASITHAMPARAM, K.; GHISALBERT, E.L.; MARA, R.; BARBETTI, M.J.; LI, H.; WOO, S.L.; LORITO, M. A novel role for *Trichoderma* secondary

metabolites in the interactions with plants. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.72, p.80-86, 2008.

VITERBO, A.; HAREL, M.; HORWITZ, B.A.; CHET, I.; MUKHERJEE, P. K. Trichoderma mitogen-activated protein kinase signaling is involved in induction of plant systemic resistance. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, p.6241-6246, 2005.

XIAO, K.; KINKEL, L. L.; SAMAC, D. A. Biological control of Phytophthora root rots on alfalfa and soybean with Streptomyces. **Biological Control**, v.23, p.285-295, 2002.

YEDIDIA, I.; SRIVASTVA, A. K.; KAPULNIK, Y.; CHET, I. Effect of Trichoderma harzianum on microelement concentrations and growth of cucumber plants. **Plant and Soil**, v.235, p.235-242, 2001.

ZVYAGINTSEV, D. G.; ZENOVA, G. M.; **Ekologiya aktinomitsetov (Ecology of Actinomycetes)**, Moscow:GEOS, 2001.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar da maioria dos isolados de *Trichoderma* se mostrarem eficientes no controle de *A. niger*, quando avaliados em segmentos de caule da planta, em condições de laboratório, esses resultados não se repetem em campo, devido a vários fatores não controláveis que interferem na ação dos micro-organismos no controle da doença. Assim, fez-se necessária a avaliação de todos os isolados de *Trichoderma* no campo, sendo observados comportamentos diferentes desses isolados em cada ambiente estudado. Esse comportamento diferenciado nos ambientes é considerado normal, quando se trata de controle biológico de doenças de plantas, sendo uma das limitações mais importantes do biocontrole.

Os isolados de *Trichoderma* que tiveram efeito positivo na redução da doença em mudas de sisal, nos experimentos realizados em diferentes municípios, bem como outras combinações de isolados, devem ser mais investigados em outras condições, permitindo maior segurança na recomendação de um produto para o controle da doença no campo.

Os trabalhos de supressão de *A. niger* no solo por *Trichoderma* e actinobactérias não apresentaram resultados satisfatórios, nas condições em que os experimentos foram conduzidos, provavelmente devido ao patógeno ser mais competitivo no solo do que os isolados de *Trichoderma* e actinobactérias estudados até o momento, e a umidade do solo utilizada nos experimentos foi muito baixa, o que pode ter interferido na ação do micro-organismo agente de controle biológico.

As tentativas de provocar os sintomas de podridão vermelha na planta por meio da infestação do solo com diferentes concentrações de inóculo de *A. niger* não foram eficientes, portanto todos os experimentos realizados foram por meio de inoculação das mudas de sisal com ferimento, o que facilita a infecção por *A. niger* e dificulta os estudos de seleção de micro-organismos com potencial para o biocontrole da doença.

Apesar das actinobactérias se multiplicarem bem no resíduo de sisal e apresentarem efeito antagônico a *A. niger* nos trabalhos em laboratório, não foram eficientes no controle da podridão vermelha do sisal no campo, nas condições avaliadas. A formulação correta dessas actinobactérias, bem como outras formas de aplicação, precisam ser mais investigados, na busca de estratégias de redução do efeito ambiental no micro-organismo, potencializando a sua capacidade de controle da doença em diferentes condições ambientais.

Apesar da formulação de *Trichoderma* em resíduo de sisal com protetor solar não permitir a sobrevivência do agente de biocontrole, a proteção solar é uma alternativa que permite a proteção dos esporos a radiação solar por um período de duas horas, sendo positivo na aplicação de formulados ao final do dia, por permitir uma proteção durante o período de incidência solar, ou seja, antes do início do período noturno.

A produção de sisal vem ocorrendo ao longo de mais de três décadas sem qualquer manejo adequado da cultura, sem adubação, reposição de matéria orgânica, irrigação, entre outros manejos e vem sendo plantado como monocultura, sem espaçamento adequado e sem a retirada dos rebentões, formando tufo de plantas. Estas condições de plantio e o aumento da incidência da podridão vermelha, sem a adoção de medidas de controle, sugerem que este fungo, *A. niger*, considerado um fungo oportunista ou patógeno secundário, ataca o sisal devido as condições de elevado estresse por temperatura, deficiência hídrica e nutricional, devido aos baixos teores de matéria orgânica do solo e pode estar associado ao fenômeno de aquecimento global, ou seja, um patógeno emergente, devido as mudanças climáticas e as condições de monocultivo e manejo inadequado da cultura.

O biocontrole com isolados selecionados de *Trichoderma* é uma alternativa, mas esta deve ser associada a técnicas de manejo que favoreçam a reposição de matéria orgânica e melhoria da fertilidade do solo.

O uso combinado desses isolados de micro-organismos avaliados não foi eficiente no controle da podridão vermelha do sisal nas mudas inoculadas. Apenas a combinação de algumas formulações de isolados de *Trichoderma* diminuiu a população de *A. niger* no solo. Isso pode ter um efeito positivo a longo prazo, com a redução de plantas infectadas e potencial de inóculo do patógeno e, conseqüentemente, a redução na incidência da doença.

Mais estudos que identifiquem estratégias integradas de controle da doença são necessários, principalmente com fertilização, manejo correto da cultura e utilização de mudas saudáveis, pois uma única estratégia de controle da doença não é suficiente para eliminar a ameaça da podridão vermelha nos plantios de sisal do Nordeste.