

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

**PODRIDÃO VERMELHA DO SISAL: CONTROLE COM  
*Trichoderma* spp., ESCALA DE NOTAS E ESTUDOS  
HISTOPATOLÓGICOS**

**LEONARDO DE OLIVEIRA BARBOSA**

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA  
FEVEREIRO - 2019**

# **PODRIDÃO VERMELHA DO SISAL: CONTROLE COM *Trichoderma* spp., ESCALA DE NOTAS E ESTUDOS HISTOPATOLÓGICOS**

**LEONARDO DE OLIVEIRA BARBOSA**

Licenciado em Ciências Agrárias

Universidade Federal da Paraíba, 2013

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Ciências Agrárias (Área de Concentração: Fitotecnia).

**Orientadora:** Profa. Dra. Ana Cristina Fermino Soares

**Coorientador:** Prof. Dr. Fabiano Machado Martins

**Coorientador:** Prof. Dr. Thiago Alves de Oliveira

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA**

**FEVEREIRO – 2019**

## FICHA CATALOGRÁFICA

B238p      Barbosa, Leonardo de Oliveira.  
Podridão vermelha do sisal: controle com *Trichoderma* spp., escala de notas e estudos histopatológicos / Leonardo de Oliveira Barbosa. – Cruz das Almas, BA, 2019.  
128f.; il.

Orientadora: Ana Cristina Femino Soares.  
Coorientador: Fabiano Machado Martins.

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

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

CDD: 633.577

Ficha elaborada pela Biblioteca Universitária de Cruz das Almas – UFRB.  
Responsável pela Elaboração – Antonio Marcos Sarmiento das Chagas (Bibliotecário – CRB5 / 1615).  
Os dados para catalogação foram enviados pelo usuário via formulário eletrônico.

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

**PODRIDÃO VERMELHA DO SISAL: CONTROLE COM  
*Trichoderma* spp., ESCALA DE NOTAS E ESTUDOS  
HISTOPATOLÓGICOS**

**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE TESE DE  
LEONARDO DE OLIVEIRA BARBOSA**

Realizada em 26 de fevereiro de 2019

Profa. Dra. Ana Cristina Fermino Soares  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB  
Examinador Interno (Presidente da banca e Orientadora)

Profa. Dra. Larisse de Freitas Silva  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB  
Examinador Externo

Dr. Carlos Alberto Tuão Gava  
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária- EMBRAPA  
Examinador Externo

Dr. Leandro de Souza Rocha  
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária- EMBRAPA  
Examinador Externo

Prof. Dr. Carlos Augusto Dórea Bragança  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB  
Examinador Interno

Aos meus avós Maria das Graças Silva de Oliveira (*in memorian*) e José Figueiredo de Oliveira pelo amor, carinho e dedicação que sempre tiveram comigo, e mesmo nos momentos mais difíceis, não mediram esforços para que pudesse realizar meus sonhos.

A minha filha Maria Clara Lima de Oliveira (*in memorian*) que apesar de ter partido muito cedo, você vai sempre ser o amor da minha vida e meu anjo da guarda.

A minha esposa Renata Lima pelo amor, ajuda, incentivo, conselho e companheirismo oferecidos em todas as horas.

**DEDICO**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pelo dom da vida, por ter me dado forças e principalmente conforto durante os momentos difíceis que passei até chegar aqui.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela bolsa no curso de doutorado e apoio financeiro com os recursos de apoio à pós-graduação (PROAP). À Financiadora de Estudos e Projetos - FINEP, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia - FAPESB, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pelo financiamento da infraestrutura de equipamentos dos Laboratórios de Microbiologia e das casas de vegetação. Ao CNPq, pelo financiamento do projeto Nexus-Integração Caatinga-Sisal (Processo n. 442516/2017-7).

À Universidade Federal do Recôncavo da Bahia-UFRB pela formação profissional qualificada e a realização dos trabalhos de pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias e a todo corpo docente por todo ensinamento proporcionado nas disciplinas, os quais foram essenciais durante as atividades acadêmicas e científicas e para a vida profissional e pessoal.

A minha orientadora Dr<sup>a</sup>. Ana Cristina Fermino Soares pela confiança e depositada em mim, amizade e contribuição de todas as formas possíveis para a realização do trabalho. Seus ensinamentos e conselhos foram essenciais para o sucesso desse trabalho e minha formação profissional e pessoal.

Ao Prof. Dr. Fabiano Machado Martins, pela co-orientação, confiança, amizade e principalmente pela disposição em ajudar e contribuir de todas as formas possíveis para a realização do trabalho.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Thiago Alves de Oliveira pela orientação, ao longo desta jornada.

A minha avó Maria das Graças que sempre me incentivou e apoiou nas minhas escolhas e mesmo em seu leito de morte nunca deixou de pensar na minha felicidade.

Ao meu avô José Figueredo que sempre foi exemplo de pessoa ao qual me espelho e levo comigo todos seus conselhos e ensinamento.

A minha mãe Maria do Socorro Silva de Oliveira pelo amor, carinho e apoio incondicional nas minhas escolhas pessoais e profissionais.

A todos os meus familiares que me apoiaram nas minhas escolhas. Sem eles não conseguira chegar onde estou.

A minha esposa Renata de Lima que sempre esteve comigo me apoiando e sendo minha base que tantas vezes me sustentou diante das dificuldades e tristezas. Tudo que posso descrever aqui é pouco para demonstrar o quanto você foi e é importante para mim, sem você eu não chegaria até aqui.

Ao Prof. Dr. José Luiz Bezerra, pela sua luz que sempre alegra nossas vidas, seus conselhos e ensinamento que sempre teve comigo, por seu profissionalismo sem igual. Pelo seu exemplo de humildade que nos inspira e que sem dúvida é algo que deve ser seguido por todos. Pelos momentos de descontração (cinema e café) e conversas. Muito obrigado por tudo. Sem dúvida é um grande exemplo de vida que levarei sempre comigo.

Às estudantes de iniciação científica Welica Zaiana, Beatriz Souza e Camila Passos, pela amizade e contribuição na realização dos experimentos. Sem a ajuda de vocês esse trabalho não teria se concretizado.

Aos servidores técnico-administrativos da UFRB pelo apoio, em especial, Zozilene, Carolina Yamamoto e Deyse.

A todos aqueles que contribuíram para a realização desse trabalho.

**A todos meu muito obrigado!**

## SUMÁRIO

	Página
RESUMO	
REFERENCIAL TEÓRICO .....	1
<b>ARTIGO 1</b>	
ESCALA DE NOTAS PARA QUANTIFICAÇÃO DA SEVERIDADE DA PODRIDÃO VERMELHA DO SISAL ( <i>Agave sisalana</i> Perrine) .....	29
<b>ARTIGO 2</b>	
HISTOPATOLOGIA DA PODRIDÃO VERMELHA EM <i>Agave sisalana</i> Perrine (Asparagaceae) .....	44
<b>ARTIGO 3</b>	
<i>Trichoderma</i> spp. NO CONTROLE DA PODRIDÃO VERMELHA DO SISAL: ESTUDOS HISTOLÓGICOS E MECANISMOS DE AÇÃO .....	71

## **PODRIDÃO VERMELHA DO SISAL: CONTROLE COM *Trichoderma* spp., ESCALA DE NOTAS E ESTUDOS HISTOPATOLÓGICOS**

**Autor:** Leonardo de Oliveira Barbosa

**Orientadora:** Dra. Ana Cristina Fermino Soares

**RESUMO:** A podridão vermelha causada pelo fungo *Aspergillus welwitschiae* é o principal problema fitossanitário da cultura do sisal (*Agave sisalana* Perrine). Estudos científicos sobre esta cultura em geral, e mais especificamente sobre a podridão vermelha, historicamente têm sido negligenciados. Este trabalho teve como objetivos: i) elaborar e validar uma escala de notas para quantificação da podridão vermelha no sisal, ii) estudar aspectos histológicos e histoquímicos dos tecidos internos do caule de plantas de sisal com sintomas da podridão vermelha e iii) selecionar isolados de *Trichoderma* spp. para o controle desta doença e estudar a nível tecidual a interação *Trichoderma* - *A. welwitschiae* – *A. sisalana*. A escala foi elaborada com seis níveis de severidade (0: 0%, 1: ≤ 5%, 2: 7-20%, 3: 22-45 %, 4: 50 - ≤ 78%, 5: > 78% da área afetada), sendo validada por 12 avaliadores (com e sem treinamento). A escala proposta é de fácil uso e fornece resultados acurados e precisos (90%). No estudo anatômico foi evidenciado que a podridão vermelha está presente em todo o parênquima fundamental. O patógeno foi encontrado nos elementos de vaso e em células do parênquima. As células infectadas pelo patógeno apresentam parede celular degradada e sem formato definido, evidenciando que o patógeno atua como um fungo necrotrófico. O *A. welwitschiae* também age como patógeno vascular, colonizando os vasos do xilema. Em resposta à infecção, a planta ativa alguns mecanismos de defesa tais como lignificação da parede celular, obliteração dos elementos de vaso e produção de compostos fenólicos. Os isolados de *Trichoderma* spp. inibiram a germinação de esporos, o crescimento micelial e a esporulação de *A. welwitschiae* e promoveram significativa redução da incidência (70-93%) e severidade (97%) da doença em mudas de sisal. Cortes transversais do caule de plantas tratadas com *Trichoderma* spp. e infectadas por *A. welwitschiae* demonstram que o patógeno e o avanço da doença foram contidos por camadas de células parenquimáticas lignificadas. Hifas, conidióforos e conídios de *Trichoderma* spp. foram encontrados nos tecidos caulinares.

**Palavras-chave:** *A. sisalana*, *A. welwitschiae*, Patometria, Histologia, Lignificação.

## **SISAL BOLE ROT DISEASE: CONTROL WITH *Trichoderma* spp., SCALE OF NOTES AND HISTOPATHOLOGICAL STUDIES**

**Author:** Leonardo de Oliveira Barbosa

**Advisor:** Dra. Ana Cristina Fermino Soares

**ABSTRACT:** The bole rot disease caused by the fungus *Aspergillus welwitschiae* is the main phytosanitary problem of sisal crop (*Agave sisalana* Perrine). Scientific studies on this crop in general, and more specifically on bole rot disease, have historically been neglected. This work aimed to: i) elaborate and validate a scale for quantification of sisal bole rot disease, ii) study histological and histochemical aspects of the internal tissues of the stem of sisal plants with symptoms of bole rot disease and iii) select isolates of *Trichoderma* spp. for control of sisal bole rot and to study at the tissue level the interaction *Trichoderma* - *A. welwitschiae* - *A. sisalana*. The scale was elaborated with six levels of severity (0: 0%, 1:  $\leq 5\%$ , 2: 7-20%, 3: 22-45%, 4: 50 -  $\leq 78\%$ , 5: 78% of the affected area), being validated by 12 evaluators (with and without training). The proposed scale is easy to use and provides accurate and accurate results (90%), however the evaluators should be trained for the assessments. In the anatomical study, the pathogen was found in the vessel elements and in parenchyma cells. Bole rot disease is present in all the fundamental parenchyma. The cells infected by the pathogen had degraded and unformed cell walls, which indicates that it acts as a necrotrophic fungus. In addition, *A. welwitschiae* also acts as a vascular wilt pathogen that colonizes the xylem vessels. In response to infection, the plant produces some defense mechanisms such as lignification of the cell walls, obliteration of vessel elements and production of phenolic compounds. The isolates of *Trichoderma* spp. inhibited spore germination, mycelium growth and sporulation of *A. welwitschiae* and promoted a significant reduction of the incidence (70-93%) and severity (97%) of the disease in sisal plants. Cross-sectional stem cuttings of plants treated with *Trichoderma* spp. and infected by *A. welwitschiae* demonstrate that the pathogen and disease progression were contained by layers of lignified parenchyma cells. In addition, hyphae, conidiophore and conidia of *Trichoderma* spp. were found in the stem tissues.

**Key words:** *A. sisalana*, *A. welwitschiae*, Pathometry, Histology, Lignification.

## REFERENCIAL TEÓRICO

### A cultura do sisal

O gênero *Agave* possui mais de 200 espécies e muitas delas fazem parte de paisagens naturais e antrópicas em muitas regiões áridas e semiáridas do mundo, mas são particularmente proeminentes no México (GÁRCIA-MENDOZA, 2002; GARCIA-MOYA et al., 2011; COLEMAN-DERR et al., 2016). As plantas desse gênero apresentam o metabolismo do ácido das Crassuláceas (CAM) para a fixação de CO<sub>2</sub>, com fechamento dos estômatos durante o dia e abertura à noite quando as taxas de evapotranspiração são baixas (ABRAHAM et al., 2016). Em razão disso, as espécies de *Agave* podem ser cultivadas com sucesso nas condições climáticas de regiões áridas e semiáridas.

A *Agave sisalana* Perrine (família *Asparagaceae*) popularmente conhecida como sisal é uma monocotiledônea herbácea de folhas rígidas, com comprimento variando de 120 a 160 cm e largura de 10 a 15 cm (SILVA e BELTRÃO, 1999; SILVA et al., 2008). Como são destituídas de pecíolo, a inserção das folhas no caule ocorre em forma de espiral, ascendente, formando rosetas. O caule do sisal tem a função de sustentação e fixação das folhas, além de servir como órgão de armazenamento de nutrientes (SILVA et al., 2008). A reprodução dessa planta é predominantemente assexuada (MOREIRA et al., 1999). Os bulbilhos produzidos nos pendões e os rebentos gerados nos rizomas são as formas mais comuns de propagação do sisal, sendo o plantio dos rebentos, a principal forma de propagação desta cultura no Brasil (SILVA e BELTRÃO 1999; SILVA et al., 2008; ABREU, 2010).

Assim como outras espécies de *Agave*, o sisal é cultivado em regiões áridas e semiáridas de países como Brasil, Tanzânia, Angola, Quênia, México e na China (FAOSTAT, 2019), sendo explorado principalmente para a comercialização da fibra obtida das folhas (BROWN, 2002; DEBNATH et al., 2010; TEWARI et al., 2014). O desfibramento das folhas de sisal é o processo pelo qual se elimina a polpa que envolve as fibras e é realizado em máquina com lâminas de ferro, denominada de moto de agave ou máquina paraibana (SILVA e BELTRÃO, 1999; SILVA et al., 2008). A fibra do sisal é considerada como dura e

corresponde a aproximadamente 70% da produção comercial de todas as fibras vegetais, exceto algodão (SILVA et al., 2008; MARTIN et al., 2009). Essas fibras são usadas principalmente pela indústria têxtil na fabricação de cordas, cordéis, fios e tapetes (BASU et al., 2012), mas também são utilizadas na confecção de artesanato (ALVES et al., 2005) e como matéria-prima para a indústria de papel e celulose (GUTIÉRREZ et al., 2008).

O Brasil destaca-se no cenário internacional como maior produtor de fibra de sisal, com produção de 79,629 toneladas em 2017, correspondendo a 40% de toda a produção mundial (FAOSTAT, 2019). Estima-se que 70% da produção brasileira é destinada ao mercado externo sendo exportada para países como Estados Unidos (SANTOS e SILVA, 2017; CONAB, 2017). De acordo com os dados da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), as exportações brasileiras da fibra e seus produtos (fios, cabos, cordas, cordéis e tapetes) em 2016 foi de 61,7 mil toneladas e geraram uma receita de US\$ 101 milhões de dólares (CONAB, 2017).

No Brasil, o cultivo do sisal se concentra principalmente em área de pequenos agricultores familiares na região semiárida dos Estados da Paraíba, Ceará, Rio Grande do Norte e Bahia, sendo esse último o maior produtor nacional, com 95,3% de toda a produção (IBGE, 2017). Na Bahia, a cadeia produtiva do sisal teve influência na política e na área social com impacto suficiente para diferenciar, especialmente, uma ampla porção do semiárido baiano, a qual ficou conhecida como Região Sisaleira da Bahia ou Território do Sisal (SANTOS e SILVA, 2017). Entre os 27 municípios da Região Sisaleira destacam-se: Valente (municípios com o maior número de batedeiras (processamento pré-industrial das fibras) e com a fábrica de tapetes e carpetes, Conceição do Coité (com batedeiras, indústrias de fios e comércio diversificado) e Serrinha (município que sedia os órgãos públicos e comércio, tornando-se um centro de ligação dos demais municípios) (SANTOS e SILVA, 2017). A cadeia produtiva do sisal gera emprego e renda para aproximadamente 600 mil trabalhadores, que estão envolvidos em atividades que vão desde a manutenção das lavouras, colheita, desfibramento e beneficiamento da fibra e termina com a industrialização e confecção de artesanato (SILVA e BELTRÃO, 1999; SILVA et al., 2008). Apesar da sua importância socioeconômica, a cultura do sisal no Brasil

é explorada com baixo índice de modernização, capitalização e tecnologia, o que tem contribuído nos últimos anos para um acentuado declínio tanto na área plantada como na produção (SILVA e BELTRÃO, 1999; SILVA et al., 2008). De acordo com dados da FAO, a área plantada e a produção de sisal caíram em mais de 50% entre 2016-2017; a área plantada passou de 199,104 para 79,629 hectares e a produção caiu de 180,948 para 79,629 toneladas (FAOSTAT, 2019). Fatores como a falta de máquinas modernas para a colheita e beneficiamento da fibra, os longos períodos de estiagem da região e a podridão vermelha do sisal também contribuem para esse declínio (SILVA e BELTRÃO, 1999; COUTINHO et al., 2006; SILVA et al., 2008).

### **Podridão vermelha do sisal**

Apesar da planta de sisal possuir características morfológicas como cutícula espessa em ambas as faces da lâmina foliar e células altamente lignificadas no córtex interno da raiz (NETO e MARTINS, 2012) que conferem uma barreira natural à penetração de microrganismos patogênicos, isso não impede que a planta seja afetada por doenças parasitárias capazes de causar sérios prejuízos (MEDINA, 1954).

No Brasil, apenas duas doenças são relatadas afetando a cultura do sisal. A primeira é a antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum agaves* Cav., que afeta as folhas do sisal e como consequência a fibra extraída dessas folhas é menos resistente e seu valor comercial é depreciado (MEDINA, 1954). Apesar disso, essa doença não consiste propriamente em um problema de importância econômica. A segunda é a podridão vermelha e consiste no principal problema fitossanitário da cultura no Brasil (COUTINHO et al., 2006; SILVA et al., 2008; ABREU, 2010; DUARTE et al., 2018). Essa doença afeta o caule do sisal e além de causar a morte da planta, as folhas do sisal infectado tornam-se impróprias para o desfibramento (COUTINHO et al., 2006; SILVA et al., 2008; DUARTE et al., 2018). Embora a podridão vermelha cause a morte da planta de sisal, esta quando infectada pode sobreviver durante mais de um ano em virtude da lenta colonização dos tecidos pelo agente causal (COUTINHO et al., 2006; SILVA et al., 2008).

A podridão vermelha do sisal tem afetado os plantios de sisal nas principais áreas produtoras dos estados da Bahia, Paraíba e Rio Grande do Norte, de forma isolada, desde 1970 e atingiu níveis críticos a partir de 1998 (ALVES et al., 2005; COUTINHO et al., 2006; SILVA et al., 2008). A incidência da podridão vermelha varia bastante entre as regiões, sendo que em algumas, não ultrapassa os 5% enquanto outras, pode chegar a 40% (ALVES et al., 2005; ABREU, 2010). Na Bahia, um estudo epidemiológico realizado por Abreu, (2010) indicou 100% de prevalência da podridão vermelha na região sisaleira, ou seja, a doença estava presente em todos os municípios produtores de sisal estudados.

No campo, as plantas infectadas apresentam como sintomas externos, o amarelecimento e murcha das folhas e os sintomas internos no caule são caracterizados pelo escurecimento interno dos tecidos, apresentando descoloração variando de rosa pálido/avermelhado a marrom (COUTINHO et al., 2006; DUARTE et al., 2018). No estágio mais avançado da doença, o caule apodrece e se desprende facilmente do solo, levando à morte e tombamento da planta (COUTINHO et al., 2006; DUARTE et al., 2018).

Vários agentes foram apontados como causadores dessa doença, entre eles o *A. niger* (WALLACE e DIECKMAHNS, 1952; KIMARO et al., 1994; COUTINHO et al., 2006). Santos et al. (2014) também descreveram o *A. niger* como agente causal e indicaram que outras espécies como *A. brasiliensis* e *A. tubingensis* também causando sintomas de podridão vermelha, mas estas apenas em estudos de casa de vegetação com plantas inoculadas. Duarte et al. (2018) identificaram por meio de técnicas moleculares, em estudo envolvendo vários isolados de *Aspergillus* obtidos de diferentes plantios, municípios produtores, plantas de sisal, partes da planta de sisal e do solo próximo as raízes de sisal, que o *A. welwitschiae* é o agente etiológico da podridão vermelha do sisal no Brasil. Estes autores destacaram que o *A. welwitschiae* e *A. niger* ambos são fungos de esporos negros, pertencentes à seção Nigri, formando o clado *A. welwitschiae/A. niger* e são de difícil diferenciação, exigindo técnicas moleculares com sequenciamento de genes específicos, a exemplo do gene da calmodulina (CaM).

O patógeno pode infectar o sisal nos diferentes estádios fenológicos, desde mudas até plantas no final do ciclo produtivo (ABREU, 2010). Apesar disso, para

que ocorra infecção da planta é necessário a presença de lesões de origem mecânica ou fisiológica, o que sugere que os ferimentos ocasionados pelo corte das folhas para desfibramento e os causados pelos tratos culturais (capinas e retiradas de mudas) são importantes vias de penetração para os patógenos (COUTINHO et al., 2006; SILVA et al., 2008; DUARTE et al., 2018). Entretanto, Silva, (2012) demonstrou que o corte das folhas durante a colheita não é a forma de infecção desta doença.

### *Aspergillus welwitschiae*

O gênero *Aspergillus* é dividido em seções, com a Seção Nigri englobando as espécies que formam colônias com coloração negra, devido à cor dos conídios que varia de marrom-escuro a preta e os conidióforos podem ser uni ou bisseriados (KLICH, 2002). Várias espécies dessa seção são usadas na indústria de fermentação para produção de ácidos orgânicos e enzimas (VARGA et al., 2000; ABARCA et al., 2004). Outras espécies são produtoras de metabólitos tóxicos como ocratoxina A “OTA” (ASTORECA et al., 2007) e aflotoxina (ARRUS et al., 2005) por exemplo.

O *Aspergillus welwitschiae* é um fungo filamentosos pertencente ao filo Ascomycota. Por muito tempo, esta espécie foi considerada desconhecida e rara dentre as espécies de *Aspergillus* com conídios negros, sendo isolado pela primeira vez de uma planta muito peculiar (*Welwitschia mirabilis*) do deserto, com uma distribuição geográfica restrita (uma região contígua de Angola à Namíbia no sudoeste da África) (WHITAKER et al., 2008; DUARTE et al., 2018). Além disso, as espécies de *A. welwitschiae* e *A. niger* não podem ser separadas apenas com base em dados morfológicos, sendo necessária a abordagem molecular, com o sequenciamento de genes específicos, para a sua distinção com confiabilidade (HONG et al., 2013; PERRONE et al., 2011; VARGA et al., 2011). Após o estudo de Hong et al. (2013), com a descrição sobre a diferenciação de *A. welwitschiae* e *A. niger* por técnicas moleculares, vários isolados desta espécie foram relatados em substratos distintos e em regiões geográficas distintas (DUARTE et al., 2018).

*A. welwitschiae* ocorre naturalmente nas estruturas reprodutivas de *W. mirabilis*, incluindo cones e sementes (COOPER-DRIVER et al., 2000; PEKAREK

et al., 2006; WHITAKER et al., 2008). Esse fungo é um habitante comum do solo (WHITAKER et al., 2008; DUARTE et al., 2018), e seus esporos também são encontrados no ar, nas regiões áridas e semiáridas onde *W. mirabilis* ocorre (WHITAKER et al., 2008). Além de ter sido diretamente associado ao seu hospedeiro original e numa distribuição geográfica específica, isolados de *A. welwitschiae* também foram relatados em grãos de café no Brasil (VON HERTWIG et al., 2018), amêndoas na Itália (SUSCA et al., 2016), castanha no Brasil (MASSI et al., 2016), sementes de mostarda no Paquistão (HANIF et al., 2016), dentre outros.

Um estudo recém publicado sobre os efeitos de fatores como temperatura (15, 25 e 35°C) e atividade de água (0.90; 0.95 e 0.98–0.99  $a_w$ ) no crescimento de *A. welwitschiae* indicou que essa espécie apresenta maior crescimento na temperatura e atividade de água de 35°C e 0,99  $a_w$ , respectivamente (ABARCA et al., 2019).

O *A. welwitschiae* é considerado um parasita fraco em função de ser dependente de lesões e/ou condições ambientais adversas ao hospedeiro, para iniciar o processo de infecção (SILVA et al., 2008; DUARTE et al., 2018). De acordo Duarte et al. (2018), nas mudas de sisal lesionadas e inoculadas com suspensão  $1 \times 10^6$  conídios.ml<sup>-1</sup> de esporos de *A. welwitschiae*, os primeiros sintomas são observados dentro de 8 a 10 dias após a inoculação. A base das folhas apresenta clorose e murcha, e algumas folhas começaram a apresentar o sintoma de apodrecimento úmido. Em 12 a 15 dias, esses sintomas progredem para formar necrose do caule, mas sem a morte da planta. Após 15 dias, as mudas começam a morrer, os caules são totalmente necrosados e as folhas destacam-se facilmente. Em 30 dias, a maioria das mudas morrem, embora algumas consigam sobreviver por mais tempo.

### **Controle biológico de doença de plantas**

Ainda não existem produtos registrados para o controle da podridão vermelha do sisal no Brasil (AGROFIT, 2019). Além disso, não existem cultivares conhecidas como resistentes a essa doença. Embora o *Agave* Híbrido 11648 seja apontado como menos susceptível à podridão vermelha que o *A. sisalana* (SILVA

et al., 2008), as plantas híbridas também são afetadas pela podridão vermelha (YIDONG e WENBIAO, 1992). Dessa forma, têm sido recomendadas, para conter a disseminação da podridão vermelha, várias medidas que se baseiam no controle cultural, como a retirada e queima de plantas doentes, utilização de mudas de boa qualidade fitossanitária para plantio e replantio das áreas produtoras de sisal e utilização do resíduo do desfibramento compostado como adubação para evitar estresses nutricionais à planta (SILVA et al., 2008; BATISTA et al., 2010). Mesmo com tais recomendações, o que se tem observado nas áreas produtoras é um número crescente de plantas infectadas, em todos os estágios de desenvolvimento (ABREU, 2010). Isso deve-se primeiramente ao não cumprimento das recomendações, ao manejo inadequado das áreas de produção de sisal e a falta de produtos e alternativas para o controle dessa doença.

O controle biológico de doenças de plantas é definido como um método que promove a redução do inóculo ou das atividades determinantes da doença provocada por um patógeno, por meio de um ou mais organismos que não seja o homem (COOK e BAKER, 1983; COOK, 1993; PAL e GARDENER, 2006). O biocontrole é considerado ambientalmente seguro e, em alguns casos, é a única opção disponível para proteger as plantas contra patógenos (COOK 1993). O controle químico não é recomendado para patógenos que sobrevivem no solo e também se encontram no ar, não sendo, portanto, uma alternativa de controle para a podridão vermelha do sisal. Em contrapartida, o controle biológico pode representar uma opção de controle da podridão vermelha.

A supressão de doenças por agentes de controle biológico (ACBs) envolve uma série de interações entre a planta, o patógeno, o antagonista, a comunidade microbiana na planta e ao seu redor e o ambiente (HANDELSMAN e STABB, 1996). A aplicação de microrganismos antagonistas na maior parte dos casos de controle de doenças, ocorre de forma preventiva (antes da infecção do patógeno), entretanto também existe a possibilidade de aplicação curativa dos microrganismos antagonistas (após a ocorrência da doença) (VERHAAR et al., 1997; HEYDARI e PESSARAKLI, 2010).

Os ACBs podem aplicar um ou mais mecanismos de ação no controle de doenças, dentre os quais incluem: antibiose, competição, micoparasitismo e indução de defesa do hospedeiro (BETTIOL, 1991; GERBORE et al., 2014;

WAGHUNDE et al., 2016). Os antagonistas podem produzir antibióticos e outros metabolitos (voláteis e não voláteis) que podem inibir, interferir na fisiologia ou causar a morte do patógeno (PAL e GARDENER, 2006; ZEILINGER et al., 2016).

A competição é referente à interação entre dois ou mais organismos, disputando recursos tais como espaço, nutrientes, água e luz (NAHER et al., 2014; WAGHUNDE et al., 2016). O micoparasitismo é a habilidade do antagonista de parasitar o fungo fitopatogênico. Esse processo complexo consiste no reconhecimento do patógeno pelo antagonista, crescimento em direção as hifas do patógeno, secreção de enzimas extracelulares, penetração das hifas e lise do hospedeiro (VINALE et al., 2008; WAGHUNDE et al., 2016; ELAMATHI et al., 2018). A indução de resistência ocorre quando os ACB conseguem induzir ou condicionar as defesas do hospedeiro (neste caso a planta) através de sinais bioquímicos que aumentam a resistência contra a infecção ou colonização pelo patógeno (PAL e GARDENER, 2006).

De acordo com Pal e Gardener, (2006) os microrganismos que mais contribuem para o controle de doenças são, provavelmente, aqueles que poderiam ser classificados como saprófitas competitivos, simbioses facultativos de plantas e hiperparasitos facultativos, pois estes podem sobreviver em matéria orgânica em decomposição e podem colonizar e expressar atividades de biocontrole enquanto crescem no hospedeiro.

Diversos microrganismos têm sido relatados como potenciais agentes de controle de doenças de plantas. Dentre eles, os fungos do gênero *Trichoderma* são amplamente estudados (WAGHUNDE et al., 2016; EL-DEBAIKY et al., 2017; ELAMATHI et al., 2018; EL-SHARKAWY et al., 2018). 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, além de estímulo a mecanismos de defesa da planta (BENÍTEZ et al., 2004; HARMAN et al., 2004; SHORESH et al., 2010).

## O gênero *Trichoderma*

De acordo com o banco de dados virtual do Index Fungorum, o *Trichoderma* é classificado no reino Fungi, filo Ascomycota, Subfilo Pezizomycotina, classe Sordariomycetes, ordem Hypocreales, família Hypocreaceae e gênero *Trichoderma*. Atualmente o gênero *Trichoderma* possui mais de 400 espécies, a maioria descrita durante as duas últimas décadas, baseada principalmente em análises filogenéticas de dados de sequências de DNA (INDEX FUNGORUM, 2019).

As espécies de *Trichoderma* spp. são geralmente habitantes saprófitas do solo, mas também podem ocorrer como simbioses em raízes de plantas (HARMAN et al., 2004; MUKHERJEE et al., 2012) e como endolíticos em diferentes partes das plantas (BAILEY et al., 2009; CHAVERRI et al., 2011; NUANKAEW et al., 2018).

Os isolados de *Trichoderma* spp. podem agir por um ou mais mecanismo de biocontrole (micoparasitismo, antibiose e competição) contra fitopatógenos (ELAMATHI et al., 2018; HARMAN et al., 2004; ROATTI et al., 2013), além de promover indução de resistência e o aumento no crescimento de plantas (HARMAN et al., 2004; MUKHERJEE et al., 2012; CONTRERAS-CORNEJO et al., 2014). As espécies do gênero *Trichoderma* são os ACBs mais investigados contra fitopatógenos e estima-se que mais de 60 % dos biofungicidas registrados mundialmente são à base de *Trichoderma* (VERMA et al., 2007). Isolados de *Trichoderma* spp. têm demonstrado ação antagônica contra fungos fitopatogênicos como, *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum capsici*, *Colletotrichum truncatum*, *Gloesercospora sorghi* (SHARMA et al., 2017), *Sclerotinia sclerotiorum* (ZHANG et al., 2016), *Guignardia citricarpa* (LIMA et al., 2017), *Aspergillus niger* (GAJERA e VAKHARIA, 2010), *Rhizoctonia solani* (MOUSUMI DAS et al., 2019), dentre outros.

Estudos com os isolados de *Trichoderma* spp. no controle biológico da podridão do sisal foram realizados anteriormente por Sá, (2009; 2013). No primeiro estudo, o autor isolou e identificou espécies de *Trichoderma* antagonistas ao *A. niger* (reportado anteriormente como agente causal da doença). No

segundo, Sá, (2013) testou (*in vivo*) a eficiência de controle de 55 isolados de *Trichoderma* em dois municípios (Conceição de Coité e Ourolândia-BA) e relatou que as plantas tratadas com os isolados de *T. viride* (TCS09), *T. virens* (TCS28, TCS39, TCS43) e *T. harzianum* (TCS35) promoveram redução média de 75% da incidência da doença em estudos conduzidos no município de Conceição do Coité, enquanto no município de Ourolândia, os isolados de *T. harzianum* (TCS76, TCS45, TCS30, TCS06, TCS42, TCS10), *T. longibrachiatum* (TCS15), *T. erinaceum* (TCS19, TCS73, TCS75) e *T. viride* (TCS14) destacaram-se na diminuição da incidência da podridão vermelha em aproximadamente 50%. Apesar dos resultados promissores, os mecanismos de ação dos isolados, bem como a interação entre *Trichoderma-Aspergillus-Agave* não foram investigados.

Apesar de existirem relatos de estudos com o controle biológico da podridão vermelha do sisal, ainda não existe um método padronizado para quantificar a severidade da doença, o que dificulta a condução de trabalhos com o controle desta doença e também dificulta a comparação dos resultados relatados por diferentes autores, em diferentes locais e entre os métodos de controle utilizados. Além disso, ainda não se tem conhecimento científico sobre a infecção e a colonização do caule de sisal por *A. welwitschiae* e nem da interação deste patógeno com *Trichoderma* spp. *in vitro* e nos tecidos da planta de sisal.

### **Quantificação de doenças em plantas**

A quantificação de doenças em plantas, denominada de fitopatometria, é de grande importância no estudo e análise das epidemias. Seu principal objetivo é fornecer dados quantitativos sobre a ocorrência e o progresso das doenças. A quantificação é de fundamental importância também para a avaliação de diferentes medidas de controle, níveis de resistência e a eficiência de produtos químicos e biológicos (VALE et al., 2004).

De acordo com Naue et al. (2010) as doenças de plantas podem ser avaliadas por métodos diretos, nos quais a estimativa da quantidade de doença é feita diretamente pela observação dos sintomas, ou por métodos indiretos, mediante estimativas da quantidade de doença pela população do patógeno.

Entre os métodos diretos de avaliação de doenças encontram-se as estimativas da incidência e da severidade.

A incidência é um parâmetro de fácil e rápida quantificação, sendo expressa em número de unidades de plantas com sintomas e/ou sinais e, este é dado calculado com base no número total de unidades avaliadas (ramos, folhas, raízes ou a planta por inteiro). A severidade por sua vez é uma medida que exige mais trabalho e conhecimento sobre a doença sendo estudada, mas é o parâmetro que melhor expressa a quantidade de tecido lesionado pela ação do patógeno (VALE et al., 2004).

A severidade de doenças em plantas é estimada visualmente e, portanto, é propensa à subjetividade, o que pode induzir a erros durante a avaliação de sintomas por diferentes avaliadores (MAZARO et al., 2006). Para reduzir possíveis erros, é necessário a definição de procedimentos padronizados para as estimativas da severidade de doenças em plantas (LENZ et al., 2010). Métodos padronizados de medição de doenças de plantas são essenciais para estudos de epidemiologia e para a comparação da eficácia de diferentes medidas de controle (RIOS et al., 2013).

Os principais métodos utilizados para a quantificação de doenças em plantas envolvem o uso de: escalas descritivas, escalas diagramáticas, número e diâmetro das lesões, relação de incidência-severidade, análise de imagem e sensoriamento remoto (VALE et al., 2004). Independentemente do método de avaliação utilizado, a experiência e o conhecimento técnico são insubstituíveis, embora as escalas e diagramas possam auxiliar os avaliadores com pouca ou nenhuma experiência (VALE et al., 2004). Uma maneira de aumentar a acurácia e a precisão das avaliações é a realização do treinamento dos avaliadores antes de se iniciar a quantificação da doença. Bardsley e Ngugi, (2012) por exemplo, relataram que a severidade da mancha bacteriana em folhas de pêsego e nectarina pode ser quantificada por avaliadores com diferentes níveis de experiência sem perder a precisão, se receberem treinamento adequado ou uma descrição detalhada dos sintomas da doença antes de iniciar a avaliação da doença.

Escalas descritivas utilizam chaves com um determinado número de graus para quantificar doenças em plantas. Cada grau da escala deve ser

apropriadamente descrito ou definido. Essas escalas são as mais utilizadas, principalmente para avaliar resistência de plantas a doenças (VALE et al., 2004). Escalas diagramáticas são ilustrações de uma série de plantas ou partes da planta (folhas, caule, raiz e fruto) com sintomas em diferentes níveis de severidade (BERGAMIN FILHO e AMORIM, 1996; ALVES et al., 2015). A utilização de escalas diagramáticas pode reduzir a subjetividade das estimativas de severidade entre os avaliadores, melhorando a acurácia e a precisão das avaliações (MARTINS et al., 2004).

O método selecionado deve fornecer resultados acurados, precisos e reprodutíveis. A acurácia representa o grau de proximidade entre a severidade estimada e a severidade real. A precisão refere-se à repetibilidade dos valores associados à amostra, com a menor variação possível entre si, e a reprodutibilidade refere-se à ausência de variação em estimativas quando a mesma amostra é avaliada por outro avaliador (NUTTER Jr e SCHULTZ, 1995; VALE et al., 2004).

Atualmente, as escalas diagramáticas têm-se constituído na principal ferramenta de avaliação da severidade para muitas doenças (MARTINS et al., 2004; ALVES et al., 2015). Uma escala diagramática, para ser considerada eficiente, precisa possuir algumas características como: ser fácil de usar, ser aplicável em diversas condições, gerar resultados reprodutíveis e possuir intervalos que representem todos os estágios de desenvolvimento da doença (BERGER, 1980; MACIEL et al., 2013). Na construção de uma escala diagramática, as representações dos sintomas da doença devem ser o mais próximo possível do observado nas plantas.

Para que uma escala seja considerada um método padronizado para a quantificação de doenças de plantas, ela deve ser validada (MARTINS et al., 2004). Esta validação é realizada com o objetivo de definir se a escala está pronta para ser utilizada por pesquisadores e agricultores para quantificar a doença em condições de campo e casa de vegetação (LENZ et al., 2010). Ao longo dos anos, várias escalas foram desenvolvidas e validadas para doenças em várias culturas, como a ferrugem branca do crisântemo (BARBOSA et al., 2006), mancha branca de milho (CAPUCHO et al., 2010), ferrugem do café (CAPUCHO et al., 2011), cercosporiose da alface (GOMES et al., 2004), queima das folhas do inhame

(MICHEREFF et al., 2000), mancha preta em frutos cítricos (SPÓSITO et al., 2004), entomosporiose em folhas de pereira (NUNES e ALVES, 2012), mancha branca do milho (SACHS et al., 2011) e ferrugem da folha do trigo (ALVES et al., 2015). Algumas escalas têm sido utilizadas por muitos anos enquanto que outras escalas são menos empregadas por serem imprecisas (VALE et al., 2004).

Na medida que surgem novas epidemias de importância econômica na agricultura, novas escalas são elaboradas para a quantificação de doenças em plantas. Para a podridão vermelha do sisal não existe um método padronizado para quantificar a severidade desta doença nas plantas. Além disso, como a severidade é estimada visualmente, está sujeita a erros nas avaliações. Portanto, faz-se necessário a elaboração e validação de uma escala que possa ser utilizada para quantificar essa doença em condições de campo e em experimentos em condições controladas.

### **Interação planta-patógeno**

As interações entre a planta e o patógeno envolvem uma comunicação bidirecional. O patógeno reconhece e promove alterações bioquímicas na planta hospedeira para criar um ambiente adequado para o seu desenvolvimento. A planta por sua vez reconhece o patógeno e ativa mecanismos de defesa contra o agente patogênico. Tanto a planta como o patógeno desenvolveram um conjunto de estratégias durante o processo evolutivo que permite esta comunicação (BODY et al., 2013).

As plantas desenvolveram mecanismos sensoriais para detectar o ataque de patógenos e desencadear caminhos de sinalização que induzem respostas rápidas de defesa (HÉMATY et al., 2009). Estes mecanismos incluem não apenas a detecção direta de elicitores derivados de patógenos, mas também a detecção indireta do impacto dos patógenos na planta hospedeira (HÉMATY et al., 2009).

Os fungos estão entre os organismos patogênicos mais aprimorados morfológicamente para o exercício da patogenicidade. Inúmeros componentes estruturais foram evolutivamente desenvolvidos com o objetivo de invadir e explorar o tecido das plantas hospedeiras para a obtenção de água e nutrientes necessários para o seu desenvolvimento (LEITE e STANGARLIN, 2008).

Segundo Leite e Stangarlin, (2008) o sucesso de fungos patogênicos depende de vários fatores, como a capacidade do fungo invasor de crescer na presença de compostos tóxicos depositados na superfície da planta; de penetrar sem provocar a formação de barreiras intransponíveis pela hospedeira (através da ativação de genes de defesa) e de permanecer em contato com o tecido da planta, explorando de maneira prolongada, coordenada e proveitosa.

A resistência do hospedeiro ao patógeno pode ser definida, sob o aspecto fisiológico, como a capacidade da planta em atrasar ou evitar a entrada e/ou a subsequente atividade do patógeno em seus tecidos (GOODMAN et al., 1986 citado por SCHWAN-ESTRADA et al., 2008). Os mecanismos de defesa da planta ao ataque de agentes patogênicos podem ser pré e pós-formados e são divididos em estruturais e bioquímicos (STANGARLIN et al., 2011). Os estruturais constituem-se nas barreiras físicas à penetração e à colonização do patógeno, enquanto os bioquímicos englobam substâncias capazes de inibir o desenvolvimento do patógeno ou gerar condições adversas para a sua sobrevivência nos tecidos do hospedeiro (MATIELLO et al., 1997; AGRIOS, 2005; SCHWAN-ESTRADA et al., 2008; STANGARLIN et al., 2011).

Os mecanismos pré-formados são barreiras e/ou substâncias já existentes na planta antes do contato com o patógeno. Estes podem ser mecanismos estruturais como: ceras, cutículas, tricomas, adaptações em estômatos e fibras/vasos condutores, e mecanismos bioquímicos como: fenóis, alcalóides, lactonas insaturadas, inibidores protéicos e enzimas hidrolíticas (AGRIOS, 2005; SCHWAN-ESTRADA et al., 2008).

Nos mecanismos pós-formados/induzidos, tem-se estruturas sendo formadas, substâncias ausentes passando a ser produzidas e os compostos pré-existent aumentando as concentrações, após a infecção pelo patógeno. Esses mecanismos envolvem a formação de papila, halo, lignificação, camada de cortiça, tiloses e deposição de goma, todos considerados como mecanismos estruturais. Da mesma forma, nos mecanismos bioquímicos pós-formados temos como exemplo as fitoalexinas, espécies reativas de oxigênio e proteínas relacionadas à patogênese (AGRIOS, 2005; SCHWAN-ESTRADA et al., 2008).

Segundo Agrios, (2005) as combinações de respostas estruturais e reações bioquímicas de defesa das plantas variam em relação às diferentes

interações patógeno-hospedeiro. Além disso, mesmo para o mesmo hospedeiro e patógeno, as combinações variam com a idade da planta, o tipo de órgão e tecido atacado, a condição nutricional da planta e as condições climáticas.

Os mecanismos de interação planta-patógenos, são importantes para compreender melhor os patossistemas. Ortiz et al. (2014), por exemplo, descreveram a caracterização histopatológica de diferentes tecidos de maracujá roxo (*Passiflora edulis* Sims) afetados pelos fungos *Fusarium oxysporum* e *F. solani*. Estes autores constataram diferenças no mecanismo de colonização dos patógenos. Enquanto o *F. solani* penetra e se concentra principalmente na área do colo da planta, o *F. oxysporum* entra pelas raízes e move-se através do sistema vascular para colonizar a planta. Apesar disso, ambos produzem efeitos semelhantes sobre a planta: colonização dos vasos do xilema por hifas e microconídios, hipertrofia e hiperplasia do câmbio, xilema e floema; destruição de fibras do xilema e amiloplastos em células parenquimatosas, com a produção de géis pela planta.) Em um estudo histológico comparando cultivares de tomate resistente e susceptível a *Pseudomonas solanacearum*, Grimault et al. (1994) constataram que nas cultivares resistentes as tiloses obliteraram os vasos colonizados limitando a propagação bacteriana, enquanto que nas cultivares susceptíveis não foram observadas tiloses nos vasos colonizados e a propagação bacteriana não foi limitada. Mussury et al. (2012) estudando a anatomia foliar de plantas de soja saudáveis e infectadas por *Phakopsora pachyrhizi* H. Sydow & Sydow constataram que nas folhas infectadas, a epiderme e parênquima lacunoso estavam destruídos e existia uma proliferação de tricomas e espessamento da cutícula, principalmente na face abaxial. Além disso, também observaram a presença de compostos fenólicos nas células da epiderme quando rompida, em função do crescimento micelial.

Não há informações disponíveis sobre a interação *A. welwitschiae* - *A. sisalana* na literatura científica. Dessa forma, faz-se necessário a realização de estudos anatômicos e histoquímicos dos tecidos de sisal (sadio e doente) para a melhor compreensão dos aspectos inerentes a este patossistema. A caracterização histopatológica dos tecidos (sadio e doente) da planta em estudo pode gerar informações precisas sobre a ação do patógeno nos tecidos vegetais,

sua colonização e as alterações a nível celular que a infecção produz ou induz na planta.

Este trabalho é apresentado em três artigos científicos: i) a elaboração e validação de uma escala para quantificação da severidade da podridão vermelha; ii) a caracterização anatômica e histoquímica de *A. sisalana* com e sem sintomas da podridão vermelha no caule e iii) o controle da podridão vermelha do sisal com isolados de *Trichoderma* e a interação antagonista-patógeno em experimentos *in vitro* e na planta de sisal.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABARCA, M. L. et al. Impact of some environmental factors on growth and ochratoxin A production by *Aspergillus niger* and *Aspergillus welwitschiae*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 291, p. 10–16, 2019.

ABARCA, M. L. et al. Taxonomy and significance of black *Aspergilli*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 86, n. 1, p. 33-49, 2004.

ABRAHAM, P. E. et al. Transcript, protein, and metabolite temporal dynamics in the CAM plant *Agave*. **Nature Plants**, v. 2, n. 12, p. 178, 2016.

ABREU, K. C. L. DE M. Epidemiologia da podridão vermelha do sisal no Estado da Bahia. 2010. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. 2010.

AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**: 5.ed. Academic Press, 2005.

AGROFIT - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - Coordenação-Geral de Agrotóxicos e Afins/DFIA/DAS. Disponível em: [http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons). Acesso em 18 de janeiro de 2019.

ALVES, G. C. S. et al. Escala diagramática para quantificação da ferrugem da folha do trigo. **Multi-Science Journal**, v. 1, n. 1, p. 128-133, 2015.

ALVES, M. O.; SANTIAGO, E. G.; LIMA, A. R. M. **Diagnóstico sócioeconômico do setor sisaleiro do Nordeste brasileiro**. Fortaleza: Bando do Nordeste do Brasil, 2005. 90 p. il.; color. (Série Documentos do ETENE, 4).

ARRUS, K. et al. Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in Brazil nuts. **Journal of Stored Products Research**, v. 41, n.5, p. 513–527, 2005.

ASTORECA, A. et al. Water activity and temperature effects on growth of *Aspergillus niger*, *A. awamori* and *A. carbonarius* isolated from different substrates in Argentina. **International Journal of Food Microbiology**, v. 119, n. 3, p. 314–318, 2007.

BAILEY, B. A.; STREM, M. D.; WOOD, D. *Trichoderma* species form endophytic associations within *Theobroma cacao* trichomes. **Mycological Research**, v. 113, n.12, p. 1365–1376, 2009.

BARBOSA, M. A. G.; MICHEREFF, S. J.; & MORA-AGUILERA, G. Elaboração e validação de escala diagramática para avaliação da severidade da ferrugem branca do crisântemo. **Summa Phytopathologica**, v. 32, n. 1, p. 57-62, 2006.

BARDSLEY, S. J.; NGUGI, H. K. Reliability and accuracy of visual methods to quantify severity of foliar bacterial spot symptoms on peach and nectarine. **Plant Pathology**, v. 62, n. 2, p. 460-474, 2012.

BASU, G. et al. Potentiality for value-added technical use of Indian sisal. **Industrial Crops and Products**, v. 36, n.1, p. 33–40, 2012.

BATISTA, D. da C. et al. Manejo da Podridão Vermelha do Tronco do Sisal. **Circular Técnica 92**. Petrolina, dezembro de 2010.

BENÍTEZ, T. et al. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 249-260, 2004.

BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L. Doenças de plantas tropicais: Epidemiologia e controle econômico, 1st ed. Ceres, São Paulo, 1996.

BERGER, R. D. **Medindo a intensidade da doença**. In: Teng, PS; Krupa, SV (Ed.). Crop loss assessment which constrain production and crop improvement in agriculture and forestry. St. Paul: University of Minnesota, 1980.

BETTIOL, W. **Componentes do Controle Biológico de Doenças de Plantas**. In: BETTIOL, W. (Ed.) Controle Biológico de Doenças de Plantas. Jaguariúna. Embrapa – CNPMA, 1991.

BOYD, L. A. et al. Plant-pathogen interactions: disease resistance in modern agriculture. **Trends in Genetics**, v. 29, n. 4, p. 233-40, 2013.

BROWN, K. **Agave sisalana Perrine**. Wildlands weeks, p. 18-21, 2002.

CAPUCHO, A. S. et al. Influence of leaf position that correspond to whole plant severity and diagrammatic scale for white spot of corn. **Crop Protection**, v. 29, n. 9, p. 1015–1020, 2010.

CAPUCHO, A. S. et al. Development and validation of a standard area diagram set to estimate severity of leaf rust in *Coffea arabica* and *C. canephora*. **Plant Pathology**, v. 60, p. 1144–1150, 2011.

CHAVERRI, P.; GAZIS, R. O.; SAMUELS, G. J. *Trichoderma amazonicum*, a new endophytic species on *Hevea brasiliensis* and *H. guianensis* from the Amazon basin. **Mycologia**, v. 103, n.1, p. 139–151, 2011.

COLEMAN-DERR, D. et al. Plant compartment and biogeography affect microbiome composition in cultivated and native *Agave* species. **New Phytologist**, v. 209, n.2, p. 798–811, 2016.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (2017). Conjuntura mensal. Fibras- Setembro/2017.

CONTRERAS-CORNEJO, H. A. et al. Enhanced Plant Immunity Using *Trichoderma*. **Biotechnology and Biology of Trichoderma**, p. 495–504, 2014.

COOK, R. J. Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v. 31, p. 53-80, 1993.

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

COOPER-DRIVER, G. A. C.; WAGNER, C.; KOLBERG, H. Patterns of *Aspergillus niger* var. *phoenicis* (Corda) Al-Musallam infection in Namibian populations of *Welwitschia mirabilis* Hook.f. **Journal of Arid Environments**, v. 46, n. 2, p. 181–198, 2000.

COUTINHO, W. M. et al. Bole rot of sisal caused by *Aspergillus niger* in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, p. 605-605, 2006.

DEBNATH, M. et al. Biotechnological intervention of *Agave sisalana*: A unique fiber yielding plant with medicinal property. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, n. 3, p.177-187, 2010.

DUARTE, E.A.A. et al. Putting the Mess in Order: *Aspergillus welwitschiae* (and Not *A. niger*) Is the Etiological Agent of Sisal Bole Rot Disease in Brazil. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1-21, 2018.

ELAMATHI, E. et al. Expression analysis on mycoparasitism related genes during antagonism of *Trichoderma* with *Colletotrichum falcatum* causing red rot in sugarcane. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, v. 27, n.3, p. 351–361, 2018.

EL-DEBAIKY, S. A. Antagonistic studies and hyphal interactions of the new antagonist *Aspergillus piperis* against some phytopathogenic fungi in vitro in comparison with *Trichoderma harzianum*. **Microbial Pathogenesis**, v. 113, p.135–143, 2017.

EL-SHARKAWY, H. H. A.; RASHAD, Y. M.; IBRAHIM, S. A. Biocontrol of stem rust disease of wheat using arbuscular mycorrhizal fungi and *Trichoderma* spp. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 103, p. 84–91, 2018.

FAOSTAT (2019) Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOSTAT. Disponível em: <http://faostat.fao.org/>. Acesso em 29 de Janeiro de 2019.

GAJERA, H. P.; VAKHARIA, D. N. Molecular and biochemical characterization of *Trichoderma* isolates inhibiting a phytopathogenic fungi *Aspergillus niger* Van Tieghem. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 74, n. 3-4, p. 274–282, 2010.

GARCÍA-MENDOZA, A. J. Distribution of the genus *Agave* (Agavaceae) and its endemic species in Mexico. **Cactus and Succulent Journal**, v. 74, p. 177–187, 2002.

GARCIA-MOYA, E.; ROMERO-MANZANARES, A.; NOBEL, P. S. Highlights for *Agave* Productivity. **Global Change Biology Bioenergy**, v. 3, n. 1, p. 4–14, 2011.

GERBORE, J. et al. Biological control of plant pathogens: advantages and limitations seen through the case study of *Pythium oligandrum*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, n. 7, p. 4847–4860, 2014.

GOMES, A. M. A.; MICHEREFF, S. J.; MARIANO, R. L. R. Elaboração e validação de escala diagramática para cercosporiose da alface. **Summa Phytopathologica**, v. 30, n. 1, p. 38–42, 2004.

GOODMAN, R. N.; KIRÁLY, Z.; WOOD, K. R. **The biochemistry and physiology of plant disease**. University of Missouri Press, p. 433, 1986.

GRIMAUULT, V. et al. Comparative histology of resistant and susceptible tomato cultivars infected by *Pseudomonas solanacearum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 44, n.2 p. 105-123, 1994.

GUTIÉRREZ, A.; RODRÍGUEZ, A.; DEL RÍO, J. C. Chemical composition of lipophilic extractives from sisal (*Agave sisalana*) fibers. **Industrial Crops and Products**, v. 28, n. 1, p. 81–87, 2008.

HARMAN, G.E. et al. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Review Microbiology**, v. 2, p.43–56, 2004.

HANDELSMAN, J.; STABB, E. V. Biocontrol of Soilborne Plant Pathogens. **The Plant Cell**, v. 8, n. 10, p. 1855-1869, 1996

HANIF, K.; AKHTAR, N.; HAFEEZ, R. First report of *Aspergillus welwitschiae* as a postharvest pathogen of Brassica campestris seeds in Pakistan. **Journal of Plant Pathology**, v. 98, n.1, p. 171- 185, 2016.

HÉMATY, K.; CHERK, C.; SOMERVILLE, S. Host–pathogen warfare at the plant cell wall. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 12, n. 4, p. 406-413, 2009.

HEYDARI, A.; PESSARAKLI, M. A review on biological control of fungal plant pathogens using microbial antagonists. **Journal of Biological Sciences**, v. 10, n. 4, p. 273-290, 2010.

HONG, S. B.; LEE, M. A.; KIM, D. H. *Aspergillus luchuensis*, in industrially important black *Aspergillus* in East Asia. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, 2013.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola, janeiro de 2017. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/>. Acesso em 02 de Abril de 2017.

INDEX FUNGORUM 2019. Disponível em: <http://www.indexfungorum.org/names/Names.asp?pg=2>. Avaliado em 30 de Janeiro de 2019.

KIMARO, D.; MSANYA, B. M.; TAKAMURA, Y. Review of sisal production and research in Tanzania. **African Studies Monography**, v. 15, n. 4, 227-242, 1994.

KLICH M. A. Identification of Common *Aspergillus* species. Netherlands: **Centraalbureau voor Schimmelauteurs**, 2002.

LEITE, B.; STANGARLIN, J. R. **Fisiologia e bioquímica de doenças fúngicas**. In: PASCHOLATI, S. F; LEITE, B; STANGERLIN, J. R; CIA, P (Ed.). Interação planta-patógeno: Fisiologia, Bioquímica e Biologia Molecular. Piracicaba: FEALQ, v. 13, p. 115-150, 2008.

LENZ, A. et al. Escala diagramática para a avaliação de severidade de mancha-parda em arroz. **Ciência Rural**, v. 40, n. 4, p. 752–758, 2010.

LIMA, F. B. DE A. et al. *Trichoderma harzianum* T1A constitutively secretes proteins involved in the biological control of *Guignardia citricarpa*. **Biological Control**, v. 106, p. 99–109, 2017.

MACIEL, J. L. N. et al. Diagrammatic scale for assessment of blast on wheat spikes. **Summa Phytopathologica**, v. 39, n. 3, p. 162-166, 2013.

MARTIN, A. R. et al. Caracterização química e estrutural de fibra de sisal da variedade *Agave sisalana*. **Polímeros**, v. 19, n. 1, p. 40-46, 2009.

MARTINS, M. C. et al. Escala diagramática para a quantificação do complexo de doenças foliares de final de ciclo em soja. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n. 2, p.179-184, 2004.

MASSI, F. P. et al. Prospecting for the incidence of genes involved in ochratoxin and fumonisin biosynthesis in Brazilian strains of *Aspergillus niger* and *Aspergillus welwitschiae*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 221, p.19–28, 2016.

MATIELLO, R. R.; BARBIERI, R. L.; CARVALHO, F. I. F. Plant resistance to fungal diseases. **Ciência Rural**, v. 27, n. 1, p. 161-168, 1997.

MAZARO, S. M. et al. Diagramatic scale to evaluate the mycosphaerella blight severity in strawberry. **Ciência Rural**, v. 36, n. 2, p. 648-652, 2006.

MEDINA, J.C. (1954) **O sisal**. São Paulo: Secretaria da Agricultura do Estado de São Paulo.

MICHEREFF, S. J.; MAFFIA, L. A.; NORONHA, M. A. Escala diagramática para avaliação da severidade da queima das folhas do inhame. **Fitopatologia Brasileira**, v. 25, n. 4, p. 612-619, 2000.

MOREIRA, J. A. N.; BELTRÃO, N. E. de M.; SILVA, O. R. R. F. da. Botânica e morfologia do sisal. In: SILVA, O. R. R. F. da; BELTRÃO, N. E. de M. **O Agronegócio do sisal no Brasil**. Brasília, D. F.: Embrapa – SPI; Campina Grande: Embrapa – CNPA, 1999.

MOUSUMI DAS, M.; HARIDAS, M.; SABU, A. Biological control of black pepper and ginger pathogens, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* and *Phytophthora*

*capsici*, using *Trichoderma* spp. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 17, p. 177–183, 2019.

MUKHERJEE, M. et al. *Trichoderma*–Plant–Pathogen Interactions: Advances in Genetics of Biological Control. **Indian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 4, p. 522–529, 2012.

MUSSURY, R. M. et al. Anatomia foliar de soja infectada por *Phakopsora pachyrhizi* H. Sydow & Sydow e tratadas com extratos vegetais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 1, p. 18-25, 2012.

NAHER, L. et al. *Trichoderma* spp.: a biocontrol agent for sustainable management of plant diseases. **Pakistan Journal of Botany**, v. 46, n. 4, p. 1489-1493, 2014.

NAUE, C. R. et al. Sensoriamento remoto como ferramenta aos estudos de doenças de plantas agrícolas: uma revisão. **Revista Brasileira de Geografia Física**, v.03, p.190-195, 2010.

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

NUANKAEW, K. et al. *Trichoderma polyalthiae* sp. nov., an endophytic fungus from *Polyalthia debilis*. **Phytotaxa**, v. 371, n. 5, p. 273, 2018.

NUNES, C. C; ALVES, S. A. M. Elaboração e validação de escala diagramática para quantificação da severidade de entomosporiose em folhas de pereira. **Summa Phytopathologica**, v. 38, n. 3, p. 239-244, 2012.

NUTTER Jr, F. W.; SCHULTZ, P. M. Improving the accuracy and precision of disease assessments: selection of methods and use of computer-aided training programs. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 17, p. 174-184, 1995.

ORTIZ, E. et al. Histopathological features of infections caused by *Fusarium oxysporum* and *F. solani* in purple passionfruit plants (*Passiflora edulis* Sims). **Summa Phytopathologica**, v. 40, n. 2, p. 134-140, 2014.

PAL, K. K.; GARDENER, B. MCS. Biological Control of Plant Pathogens. **The Plant Health Instructor**, p. 1-25, 2006.

PEKAREK, E.; JACOBSON, K.; DONOVAN, A. High levels of genetic variation exist in *Aspergillus niger* populations infecting *Welwitschia mirabilis* Hook. **Journal of Heredity**, v. 97, n. 3, p. 270-278, 2006.

PERRONE, G. et al. *Aspergillus niger* contains the cryptic phylogenetic species *A. awamori*. **Fungal Biology**, v. 115, n. 11, p. 1138–1150, 2011.

RIOS, J. A. et al. Development and validation of a standard area diagram set to assess blast severity on wheat leaves. **European Journal of Plant Pathology**, v. 163, n. 3, p. 603-611, 2013.

ROATTI, B. et al. Abiotic stresses affect *Trichoderma harzianum* T39-induced resistance to downy mildew in grapevine. **Phytopathology**, v. 103, n.12, p.1227–1234, 2013.

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

SÁ, J, O. de. Controle biológico da podridão vermelha do sisal (*Agave sisalana* Perrine) com *Trichoderma* spp. e Actinobactérias. 2013. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2013.

SACHS, P. J. D. et al. Escala diagramática para avaliação da severidade da mancha branca em milho. **Summa Phytopathologica**, v. 37, n. 4, p. 202-204, 2011.

SANTOS, E. M. C.; SILVA, O. A. da. Sisal na Bahia-Brasil. **Mercator**, v. 16, 2017.

SANTOS, P. O. et al. Additional species of *Aspergillus* causing bole rot disease in *Agave sisalana*. **Tropical Plant Pathology**, v. 39, n. 4, p. 331-334, 2014.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F; STANGARLIN, J. R; PASCHOLATI, S. F. **Mecanismos bioquímicos de defesa vegetal**. In: PASCHOLATI, S.F; LEITE, B; STANGARLIN, J.R; CIA, P. (Ed.). Interação Planta Patógeno – fisiologia, Bioquímica e Biologia Molecular. Piracicaba: FEALQ, v. 13, 2008.

SHARMA, V. et al. Elucidation of biocontrol mechanisms of *Trichoderma harzianum* against different plant fungal pathogens: Universal yet host specific response. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 95, p. 72–79, 2017.

SHORESH, M.; HARMAN, G. E.; MASTOURI, F. Induced Systemic Resistance and Plant Responses to Fungal Biocontrol Agents. **Annual Review of Phytopathology**, v. 48, p. 21–43, 2010.

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

SILVA, O. R. R. F. et al. Cultivo do Sisal no Nordeste Brasileiro. **Circular Técnica n. 123**, Embrapa, Campina Grande, PB, julho, 2008.

SILVA, O. R. R.; BELTRÃO, N. E. M. **O agronegócio do sisal no Brasil**. Embrapa-CNPA. Campina Grande, Brasil, 1999.

SPÓSITO, M. B. et al. Elaboração e validação de escala diagramática para avaliação da severidade da mancha preta em frutos cítricos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n.1, p. 081-085, 2004.

STANGARLIN, J. R. et al. A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 10, n. 1, p. 18-46, 2011.

SUSCA, A. et al. Variation in fumonisin and ochratoxin production associated with differences in biosynthetic gene content in *Aspergillus niger* and *A. welwitschiae* isolates from multiple crop and geographic origins. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1412, 2016.

TEWARI, D.; TRIPATHI, Y. C.; ANJUM, N. *Agave sisalana*: a plant with high chemical diversity and medicinal importance. **World Journal of Pharmaceutical Research**, v. 3 n. 8, p. 238-249, 2014.

VALE, F. X. R.; JESUS JUNIOR, W. C.; ZAMBOLIM, L. **Epidemiologia Aplicada ao Manejo de Doenças de Plantas**. Belo Horizonte: Perfil Editora, 2004.

VARGA J. et al. Genotypic and phenotypic variability among black *Aspergilli*. In: Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification. **Harwood Academic Publishers**, p. 397–411, 2000.

VARGA, J. et al. New and revisited species in *Aspergillus* section *Nigri*. **Studies in Mycology**, v. 69, n. 1, p.1–17. 2011.

VERHAAR, M. A. et al. Preventative and Curative Applications of *Verticillium lecanii* for Biological Control of Cucumber Powdery Mildew. **Biocontrol Science and Technology**, v. 7, n. 4, p. 543-551, 1997.

VERMA, M. et al. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control. **Biochemical Engineering Journal**, v. 37, n. 1, p. 1–20, 2007.

VINALE, F. et al. *Trichoderma*–plant–pathogen interactions. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, n. 1, p. 1–10, 2008.

VON HERTWIG, A. M. et al. Real-time PCR-based method for rapid detection of *Aspergillus niger* and *Aspergillus welwitschiae* isolated from coffee. **Journal of Microbiological Methods**, v. 148, p. 87–92, 2018.

WAGHUNDE, R. R.; SHELAKI, R. M.; SABALPARA, A. N. *Trichoderma*: A significant fungus for agriculture and environment. **African Journal of Agricultural Research**, v. 11, n. 22, p. 1952-1965, 2016.

WALLACE, G. B.; DIECKMAHNS, E. C. Bole rot in sisal. **The East African Agricultural Journal**. v. 18, n. 1, p. 24–29, 1952.

WHITAKER, C.; PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P. Infection of the cones and seeds of *Welwitschia mirabilis* by *Aspergillus niger* var. *phoenicis* in the Namib-Naukluft Park. **South African Journal Botany**, v. 74, n. 1, p. 41–50, 2008.

YIDONG, Z. F. L.; WENBIAO, H. B. F. Q. L. Biology of pathogen of bole rot on agave h.11648. **Chinese Journal of Tropical Crops**, v. 01, 1992.

ZEILINGER, S. et al. Secondary metabolism in *Trichoderma* e Chemistry meets genomics. **Fungal biology reviews**, v. 30, p. 74-90, 2016.

ZHANG, F. et al. Biocontrol potential of *Trichoderma harzianum* isolate T-aloe against *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 100, p. 64-74, 2016.

## ARTIGO 1

### ESCALA DE NOTAS PARA QUANTIFICAÇÃO DA SEVERIDADE DA PODRIDÃO VERMELHA DO SISAL (*Agave sisalana* Perrine)<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup>Artigo ajustado nas normas do Comitê Editorial do periódico científico Journal of Agricultural Science.

**Escala de notas para quantificação da severidade da podridão vermelha do sisal**  
(*Agave sisalana* Perrine)

Leonardo de O. Barbosa<sup>1</sup>, Thiago A. S. de Oliveira<sup>2</sup>, Elizabeth A. A. Duarte<sup>1</sup>, Renata de Lima<sup>1</sup>, Ana C. F. Soares<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Bahia, Brazil

<sup>2</sup>Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, Bahia, Brazil

Correspondence: Ana Cristina Fermino Soares, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Avenida Rui Barbosa, 710, 44380-000, Cruz das Almas, Bahia, Brazil. E-mail: [acsoares@ufrb.edu.br](mailto:acsoares@ufrb.edu.br)

**Resumo:** A podridão vermelha do sisal é uma doença causada por *Aspergillus welwitschiae* que causa o amarelecimento e murcha das folhas, apodrecimento do caule e a morte da planta de sisal. Este é o principal problema fitossanitário da cultura do sisal na região nordeste do Brasil. Não existe um método padronizado para quantificar a severidade desta doença. O objetivo deste trabalho foi elaborar e validar uma escala para quantificação da podridão vermelha em plantas de sisal inoculadas com *A. welwitschiae*. As imagens de plantas de sisal com diferentes níveis de doença foram analisadas com o software Assess<sup>®</sup> 2.0 para determinação da área lesionada, e em seguida foi elaborada uma escala com seis níveis de severidade da doença (0: 0%, 1:  $\leq 5\%$ , 2: 7-20%, 3: 22-45 %; 4: 50 -  $\leq 78\%$ ; 5:  $> 78\%$  da área lesionada), com a descrição detalhada dos sintomas internos da podridão vermelha nos diferentes graus de severidade. A escala foi validada por 12 avaliadores sem treinamento (ST) e com treinamento (CT). Houve diferença na acurácia e precisão entre os avaliadores e na avaliação ST e CT. Com base no coeficiente linear (*a*), os avaliadores superestimaram a doença nos dois momentos, apresentando valores médios de 5,18 e 1,97 para ST e CT, respectivamente. O coeficiente angular (*b*) indicou desvios sistêmicos nas estimativas apenas para avaliadores ST (1,20). Apenas 50% dos avaliadores ST apresentaram precisão acima de 74%. O treinamento proporcionou um aumento na precisão de todos os avaliadores, obtendo valores próximos ou acima de 90%. Conclui-se que a escala proposta é adequada para quantificar a severidade da podridão vermelha em plantas de sisal e os avaliadores devem ser treinados para aumentar a acurácia e a precisão das avaliações.

**Palavras-chave:** *Aspergillus welwitschiae*, patometria, bole rot disease.

**Scale of notes for quantification of the severity of sisal bole rot disease (*Agave sisalana* Perrine)**

Leonardo de O. Barbosa<sup>1</sup>, Thiago A. S. de Oliveira<sup>2</sup>, Elizabeth A. A. Duarte<sup>1</sup>, Renata de Lima<sup>1</sup>, Ana C. F. Soares<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Federal University of the Recôncavo of Bahia, Bahia, Brazil

<sup>2</sup>State University of Feira de Santana, Feira de Santana, Bahia, Brazil

Correspondence: Ana Cristina Fermino Soares, Federal University of the Recôncavo of Bahia, Avenue Rui Barbosa, 710, 44380-000, Cruz das Almas, Bahia, Brazil. E-mail: [acsoares@ufrb.edu.br](mailto:acsoares@ufrb.edu.br)

**ABSTRACT:** Sisal bole rot is a disease caused by *Aspergillus welwitschiae* with symptoms of leaf yellowing and wilting, stem rottness and death of the sisal plant. This is the main phytosanitary problem of sisal crop in Brazil. There is no standardized method for quantifying the severity of this disease. The objective of this work was to elaborate and validate a scale for quantification of bole rot disease in sisal plants inoculated with *A. welwitschiae*. The images of sisal plants with different disease levels were analyzed with Assess® 2.0 software to determine the lesion area, and then a scale was elaborated with six levels of disease severity (0: 0%, 1: ≤ 5%, 2: 7-20%, 3: 22-45%, 4: 50 - ≤ 78%, 5: > 78% of the injured area), with a detailed description of the internal symptoms of bole rot disease in different degrees of severity. The scale was validated by 12 evaluators without training (ST) and with training (CT). There was a difference in accuracy and precision among the evaluators and in the ST and CT evaluation. Based on the linear coefficient (a), the evaluators overestimated the disease in both moments, presenting mean values of 5.18 and 1.97 for ST and CT, respectively. The angular coefficient (b) indicated systemic deviations in the estimates only for ST evaluators (1.20). Only 50% of the ST evaluators presented accuracy above 74%. The training provided an increase in the accuracy of all evaluators, getting values close to or above 90%. It is concluded that the proposed scale is adequate to quantify the severity of bole rot disease in sisal plants and the evaluators should be trained to increase the accuracy and precision of the assessments.

**Key words:** *Aspergillus welwitschiae*, pathometry, red rot disease.

## 1. Introdução

O sisal (*Agave sisalana* Perrine) é uma planta monocotiledônea, perene, nativa de regiões áridas e semiáridas do México (Coleman-Derr et al., 2016). Por possuir o metabolismo ácido das crassuláceas (MAC), com a abertura dos estômatos no período noturno, para a fixação de CO<sub>2</sub>, evitando as perdas de água nos períodos mais quentes do dia, esta planta é adaptada a ambientes semiáridos e áridos de países como Brasil, Tanzânia e Quênia, onde é cultivada para a extração de fibras das folhas (Abraham et al., 2016; Coleman-Derr et al., 2016; FAOSTAT, 2019).

O Brasil destaca-se no cenário internacional como o maior produtor de fibra de sisal, com produção de 79,629 toneladas em 2017, correspondendo a 40% de toda a produção mundial (FAOSTAT, 2019). Na forma bruta, beneficiada ou industrializada, a fibra do sisal representa importante fonte de divisas, e estima-se que 70% da produção brasileira é exportada. De acordo com dados da Companhia Nacional de Abastecimento- CONAB, as exportações brasileiras da fibra e seus produtos (fios, cabos, cordas, cordéis e tapetes) foram de 61,7 mil toneladas, atingindo US\$ 101 milhões de dólares em exportações em 2016 (CONAB, 2017).

O cultivo do sisal no Brasil ocorre nos estados da Bahia, Paraíba, Rio Grande do Norte e Ceará, em regiões com alta irregularidade de chuvas e índices pluviométricos que variam entre 243 a 900mm, além de temperaturas elevadas, com médias diurnas de 25 a 27°C e umidade de 61 a 74% (IBGE, 2017). Nessas condições, o sisal é uma das poucas culturas exploradas por pequenos e médios produtores, principalmente por agricultores familiares, com geração de renda que garante a sobrevivência de centenas de famílias. A cadeia produtiva do sisal envolvendo as atividades de manutenção das lavouras, colheita, desfibramento, beneficiamento e industrialização da fibra gera empregos e tem sido a principal fonte de renda de muitas famílias (Silva et al., 2008).

Embora o sisal seja considerada uma planta rustica (Neto e Martins, 2012), a cultura é afetada por uma podridão vermelha no caule, causada pelo fungo *Aspergillus welwitschiae* (Duarte et al., 2018), anteriormente relatada como sendo causada por *A. niger* (Coutinho et al., 2006; Abreu, 2010). Esta doença é o principal problema fitossanitário desta cultura (Abreu, 2010) e se disseminou em todas as regiões produtoras de sisal do Brasil, com incidências variando em média de 5 a 40% (Coutinho et al., 2006; Abreu, 2010).

Os sintomas característicos da podridão vermelha no sisal são: o amarelecimento e murcha das folhas e os tecidos internos do caule apresentam coloração variando de vermelho intenso a marrom e, com o progresso da doença e a podridão do caule, ocorre a morte e o tombamento da planta (Coutinho et al., 2006; Abreu, 2010; Duarte et al., 2018). Além disso, as folhas das plantas infectadas são impróprias para extração das fibras (Silva et al., 2008).

A quantificação de doenças de plantas é necessária para os estudos e análises de epidemias de doenças e para a avaliação de diferentes estratégias de controle (Madden et al., 2007). No entanto, a quantificação deve ser acurada e precisa para fornecer estimativas confiáveis e reproduzíveis (Santos e Spósito, 2018). Assim como ocorre em outras doenças de plantas, a quantificação da severidade da podridão vermelha pode ser estimada visualmente e, portanto, é propensa à subjetividade e erros durante a avaliação (Mazaro et al., 2006). Nesse contexto, algumas estratégias podem ser adotadas para minimizar a subjetividade e melhorar a precisão das estimativas, como o uso de escala de notas e treinamento de avaliadores (Nutter et al., 1993).

As escalas de notas, também conhecidas como chaves descritivas, são escalas arbitrárias com certo número de graus ou notas para quantificar doenças (Madden et al., 2007; Amorim e Bergamim Filho, 2011). Na literatura podemos encontrar diversas escalas de notas desenvolvidas para avaliações de doenças específicas em culturas de importância

econômica, pois representam uma metodologia uniforme de coleta de dados e fornecem resultados precisos (Latunde-Dada, 1990; Cordeiro et al., 1993; Friedmann et al., 1998).

Para ser utilizada como um método padronizado de quantificação de uma determinada doença em uma cultura, a escala de notas precisa ser validada (Martins et al., 2004). Geralmente, a validação é realizada com base na estimativa da quantidade de doença feita mediante a observação e registro dos sintomas, com e sem o uso da escala elaborada, e também com o uso da escala por avaliadores treinados ou não (Araujo et al., 2018; Santos e Spósito, 2018; Bardsley & Ngugi, 2012). Esta validação é necessária para comprovar se a escala é adequada ou se necessita de ajustes para que possa ser usada na mensuração da doença (Lenz et al., 2010).

Apesar da podridão vermelha já ter sido relatada no Brasil desde 1951 (Medina, 1954), até o presente momento, não se tem métodos padronizados para quantificação da severidade dessa doença, e isso tem sido um fator limitante nas pesquisas nesse patossistema, principalmente nos estudos relacionados com medidas de controle. Dessa forma, este trabalho foi conduzido com o objetivo de elaborar e validar uma escala de notas para quantificar a severidade da podridão vermelha em mudas de sisal infectadas por *A. welwitschiae*.

## 2. Material e Métodos

O experimento foi realizado em casa de vegetação do Centro de Ciências Agrárias Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, campus de Cruz das Almas, Bahia.

As mudas de sisal foram produzidas a partir de bulbilhos coletados de plantas adultas em área de plantio de sisal no município de Valente-Ba. Os bulbilhos foram plantados em sacos de plástico perfurados no fundo e com 2 kg de solo. Seis meses após o plantio foram selecionadas duzentas e cinquenta mudas com altura média de 30 cm, caule com diâmetro médio de 25 mm e com 9 a 10 folhas para a serem inoculadas com diferentes isolados de *A. welwitschiae*.

Os isolados CCI, CCII, FS1 e A1P1 de *A. welwitschiae* utilizados para inoculação das mudas de sisal foram obtidos de plantas adultas de sisal com sintomas característicos da podridão vermelha e foram identificados com base na morfologia e biologia molecular conforme publicado por Duarte et al. (2018). Para inoculação com *A. welwitschiae*, os caules de todas as mudas foram perfurados com três microfuros utilizando uma agulha hipodérmica e foram transferidos 50 µL de suspensão de esporos de *A. welwitschiae* ( $1 \times 10^6$  conídios mL<sup>-1</sup>) nas áreas perfuradas, com uma micropipeta de 100 µL. O tratamento controle consistiu em mudas lesionadas sem inoculação de *A. welwitschiae*. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 50 repetições (cada muda foi considerada uma repetição).

Após a inoculação, as plantas foram observadas diariamente durante o período de 30 dias. Durante esse período, as que apresentaram lesões em diferentes estádios foram selecionadas e cortadas longitudinalmente, na região lesionada do caule, e os sintomas foram descritos e fotografados com uma câmera digital Nikon® P7100, em fundo preto. O software Assess® 2.0 foi utilizado para a determinação da porcentagem de área lesionada de cada caule das plantas amostradas. Com base na lei de Weber-Fechner de precisão visual (Horsfall & Cowling, 1978) e nos níveis máximo e mínimo de severidade da doença observados nas mudas inoculadas foi elaborada uma escala de notas.

Para validar a escala de notas, 40 imagens de caules com diferentes níveis de severidade da podridão vermelha foram apresentadas para doze avaliadores sem qualquer experiência. Os avaliadores utilizaram a escala proposta (Figura 1), para estimarem a porcentagem de área lesionada (0 - 100%). Após essa primeira avaliação (sem treinamento- ST), os mesmos avaliadores foram submetidos a um treinamento, no qual 30 imagens de caule de sisal com

porcentagem de área lesionada estimada pelo software Assess<sup>®</sup> foram organizadas e apresentadas na forma de slides (Andrade et al., 2005; Santos et al., 2017). Após o treinamento (com treinamento- CT), uma nova série das mesmas imagens da primeira avaliação foi aleatoriamente apresentada aos avaliadores para estimarem novamente a severidade da doença com a escala proposta (Figura 1) e com as instruções indicadas na primeira estimativa.

A acurácia e a precisão de cada avaliador foram determinados por análise de regressão linear (Santos et al., 2017), sendo a severidade real a variável independente e a severidade estimada visualmente a variável dependente. A acurácia das estimativas do avaliador foi determinada pelo coeficiente linear ( $a$ ) e o coeficiente angular da reta ( $b$ ) e a precisão das estimativas foi obtida com o coeficiente de determinação ( $R^2$ ). Um teste t ( $p < 0,05$ ) foi aplicado ao coeficiente linear ( $a$ ) e angular ( $b$ ) obtidos por todos os avaliadores, para verificar se esses valores foram significativamente diferentes de zero e um, respectivamente (Santos et al., 2017). As análises foram feitas com o software R, v. 3.4.4 (R Development Core Team, 2018).

### 3. Resultados

A escala proposta para a podridão vermelha do sisal tem seis níveis de severidade (0: 0%, 1:  $\leq 5\%$ , 2: 7-20%, 3: 22 - 45%, 4: 50 -  $\leq 78\%$ , 5:  $> 78\%$  de área lesionada) com valor mínimo (planta assintomática) e máximo (planta morta) e mais quatro níveis intermediários de severidade da doença encontrados em plantas inoculadas com *A. welwitschiae* (Figura 1). Além disso, a escala apresenta uma descrição detalhada dos sintomas internos da podridão vermelha em plantas com diferentes graus de severidade, para ser utilizada por avaliadores na estimativa da severidade da doença (Figura 1).

Os avaliadores não sentiram dificuldades com a utilização da escala proposta para quantificar a podridão vermelha em plantas de sisal infectadas por *A. welwitschiae*, em condições de casa de vegetação. Os dados das estimativas de área lesionada de cada avaliador ST e CT foram utilizados na construção de gráficos lineares (Figura 2). Em geral, houve diferença nas estimativas dos avaliadores, quando utilizaram a escala ST e CT. As estimativas após o treinamento dos avaliadores foram mais próximas da severidade real e, em contrapartida, as estimativas sem o treinamento tenderam a se distanciar do valor real (Figura 2).

Houve diferença de acurácia entre os avaliadores e nas avaliações ST e CT (Tabela 2). Os valores do coeficiente linear ( $a$ ) de apenas três avaliadores ST não diferiram significativamente de zero ( $p < 0,05$ ), indicando que as estimativas da podridão vermelha foram superestimadas pela maioria dos avaliadores. Além disso, não houve subestimação da doença pelos avaliadores em todos os momentos de avaliação (ST e CT). Com o treinamento (CT), cinco avaliadores foram mais acurados na quantificação da podridão vermelha. O valor médio do coeficiente linear ( $a$ ) para os avaliadores foi de 5,18 nas avaliações ST e 1,97 nas avaliações CT (Tabela 2). Com relação aos valores do coeficiente angular ( $b$ ), houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) apenas para os avaliadores ST, indicando que houve desvios sistemáticos na estimativa da doença. O coeficiente angular ( $b$ ) dos avaliadores CT não diferiu significativamente de 1 ( $p < 0,05$ ), demonstrando que houve correção dos desvios com o treinamento. O valor médio do coeficiente angular ( $b$ ) ST foi de 1,20 e 0,95 para as avaliações CT (Tabela 2).

Com relação à precisão das estimativas, metade dos avaliadores ST apresentou uma precisão ( $R^2$ ) acima de 74%. Com o treinamento, todos os avaliadores obtiveram uma precisão acima de 85% (Tabela 2). O treinamento proporcionou um aumento variando de 7-38% na precisão das estimativas dos avaliadores. O valor médio da precisão aumentou em 20%, passando de 70% ST para 90% CT (Tabela 2). Além do treinamento proporcionar uma maior acurácia e precisão nas estimativas da severidade da podridão vermelha do

sisal, também pode ser observado uma menor variação dos dados de cada coeficiente ( $a$ ,  $b$ ,  $R^2$ ) em comparação com os valores ST (Figura 3).

#### 4. Discussão

A quantificação de doenças de plantas por métodos padronizados e validados é importante para estudos de epidemiologia e controle de doenças (Vale et al., 2004; Rios et al., 2013; Yadav et al., 2013). Além disso, o método padronizado permite a comparação de resultados obtidos em diferentes regiões, condições ambientais e por diferentes pessoas (Vale et al., 2004).

A podridão vermelha tem ameaçado a sustentabilidade da cultura do sisal por décadas e ainda não existe um método padronizado para a quantificação dessa doença, o que limita os estudos com esse patossistema, principalmente aqueles envolvendo métodos de controle em condições controladas e em campo.

Com base no valor do coeficiente linear ( $a$ ), os avaliadores da severidade dos sintomas da podridão vermelha, sem treinamento (ST), foram considerados imprecisos e tenderam a superestimar a severidade da podridão vermelha. Apesar do treinamento aumentar a acurácia das estimativas, ainda houve a tendência de superestimar a doença. A superestimação tem sido uma tendência observada na maioria dos estudos envolvendo a validação de escalas para a quantificação da severidade de doenças em diversas culturas (Capucho et al., 2010; Rios et al., 2013; Nicoli et al., 2015). De acordo com Vale et al. (2004) há uma tendência natural para os avaliadores de superestimar a doença, uma vez que se estima a doença e não o tecido saudável. Entretanto, a subestimação também tem sido observada em estudos sobre a quantificação de doenças (Michereff et al., 2000; Gomes et al., 2004; Teramoto et al., 2011; Santos et al., 2017). Neste estudo da escala de notas para a podridão vermelha em plantas de sisal, o treinamento dos avaliadores para o uso da escala permitiu distinguir o tecido lesionado de tecido saudável e a suas proporções (Vale et al., 2004; Yadav et al., 2013). Outra forma de aumentar a acurácia e a precisão nas estimativas de doenças é com a utilização de escalas coloridas. Tal experiência foi realizada por Buffara et al. (2014) que observaram que a escala colorida proporcionou estimativas com maior precisão e acurácia do que a escala preto e branco na quantificação da severidade do míldio da videira.

A precisão pode ser medida com o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) da análise de regressão, e deve ser próxima de 100% (Mazaro et al., 2006). Valores de coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 70% ou inferior são considerados baixos (Barbosa et al., 2006). Nesse estudo, metade dos avaliadores ST apresentaram uma baixa precisão nas estimativas, entretanto após serem treinados, o coeficiente de todos aumentou para próximo ou acima de 90%, o que é considerado alto para este tipo de avaliação (Nicoli et al., 2015). Valores semelhantes de  $R^2$  são relatados na literatura para a validação de escalas para quantificação da severidade de doenças em trigo (Maciel et al., 2013), eucalipto (Damasceno et al., 2014), algodão (Aquino et al., 2008), alface (Gomes et al., 2004), mamona (Sussel et al., 2009).

Os avaliadores foram mais precisos que acurados, o que vem sendo observado em outro estudos, a exemplo da validação de uma escala para quantificação da severidade da mancha foliar do eucalipto (Andrade et al., (2005), na quantificação da severidade da queima da folha de inhame (Michereff et al., 2000) e na estimativa da severidade da mancha branca do milho (Capucho et al., 2010). Contudo, avaliações realizadas com menor acurácia que a precisão não representam sérios problemas, uma vez que os desvios normalmente seguem o mesmo padrão (Gomes et al., 2004).

O treinamento dos avaliadores promoveu o aumento da acurácia e precisão nas avaliações da podridão vermelha, conforme relatado para outras doenças em diferentes culturas, a exemplo de Bardsley & Ngugi, (2012) com a severidade da mancha bacteriana em folhas

de pêsego e nectarina. Neste caso, os autores confirmaram que a avaliação da severidade da doença pode ser realizada com avaliadores com diferentes níveis de experiência sem perder a precisão, se estes receberem treinamento adequado ou uma descrição detalhada dos sintomas da doença antes de iniciar a avaliação da doença. Na validação da escala para mancha foliar do eucalipto causada por *Quambalaria eucalypti*, Andrade et al. (2005) reportaram que, quando submetidos a um treinamento prévio, os avaliadores inexperientes tornaram-se mais precisos, independentemente do uso da escala, embora com a sua utilização foi observado um aumento na precisão.

O desenvolvimento e validação dessa escala de nota para quantificação do principal problema da cultura do sisal é o primeiro e o mais importante passo para o desenvolvimento de um método de controle para a podridão vermelha. Além disso, essa escala também possibilitará a realização de futuros estudos relacionados a interação planta-patógeno, como a avaliação de resistência de planta (sisal e híbrido) e a agressividade de diferentes isolados de *A. welwitschiae*.

## 5. Conclusão

A escala desenvolvida permite quantificar a podridão vermelha do sisal e pode ser facilmente utilizada por avaliadores treinados para obtenção de dados acurados e altamente precisos, sendo recomendada para futuros estudos com métodos de controle sob condições de estufa e campo.

## 6. Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela bolsa de doutorado de Leonardo de Oliveira Barbosa e de Pós-doutorado (PNPD) de Thiago Alves de Oliveira e Elizabeth Amélia Alves Duarte, a Financiadora de Estudos e Projetos- FINEP e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia- FAPESB pela apoio a infraestrutura de pesquisa na UFRB, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pela bolsa de produtividade em pesquisa de Ana C.F. Soares (Processo nº 308771/2017-6) e apoio financeiro projeto NEXUS – integração caatinga-sisal (Processo nº 441625/2017-7).

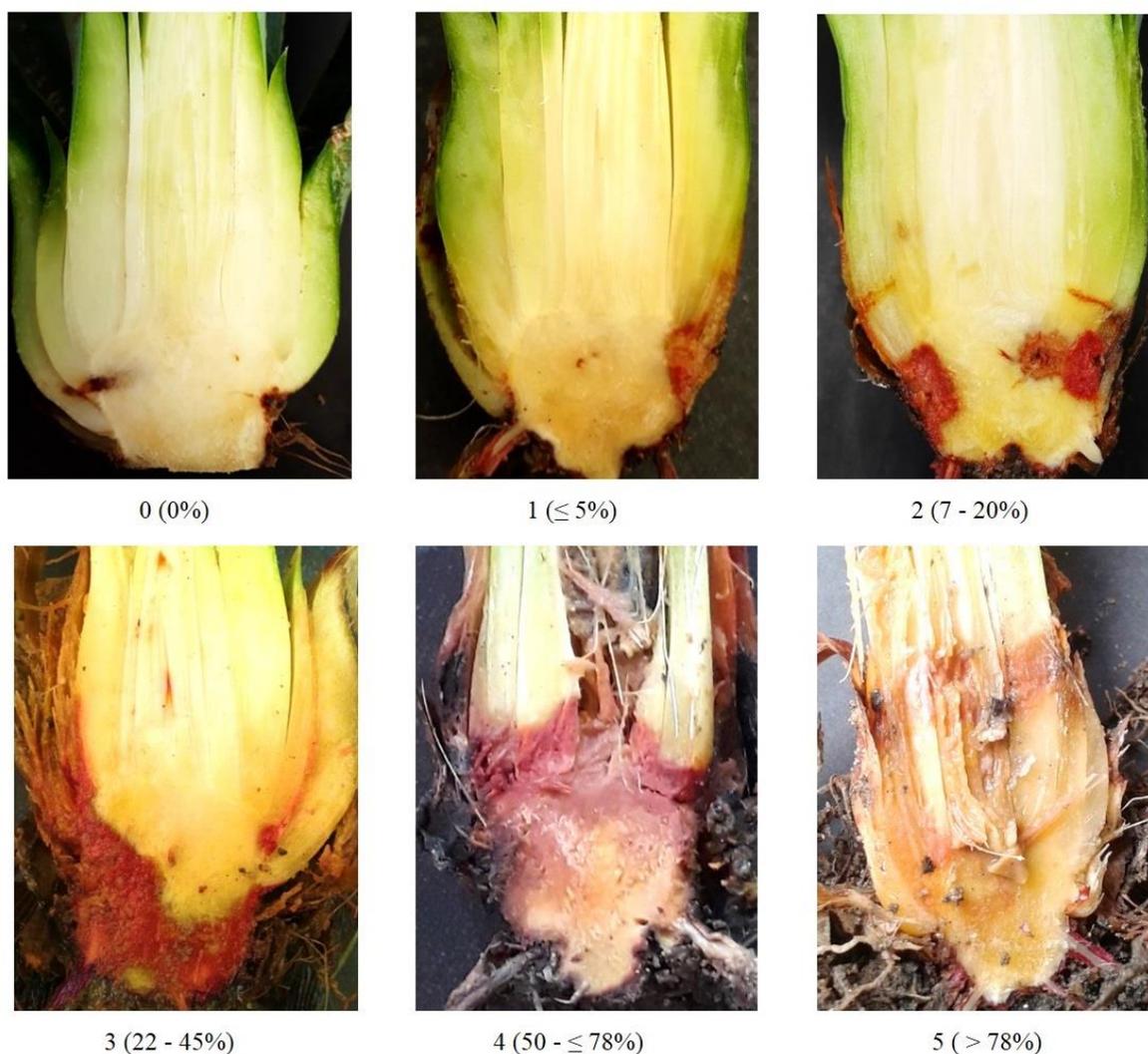
## 7. Referências bibliográficas

- Abraham, P. E., Yin, H., Borland, A. M., Weighill, D., Lim, S. D., De Paoli, H. C., ... Yang, X. (2016). Transcript, protein and metabolite temporal dynamics in the CAM plant *Agave*. *Nature Plants*, 2(12).
- Abreu, K. C. L. D. M. (2010). *Epidemiologia da podridão vermelha do sisal no Estado da Bahia*. dissertation/master's thesis. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, Brazil.
- Amorim, L. & Bergamim Filho, A. (2011). *Fenologia, patometria e quantificação de danos*. In: Amorim, L.; Rezende, J. A. M.; Bergamin Filho, A (Ed.). Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres. v. 1, pp. 593-633.
- Andrade, G. C. G., Alfenas, A. C., Mafia, R. G., Maffia, L. A., & Gonçalves, R. C. (2005). Escala diagramática para avaliação da severidade da mancha foliar do eucalipto causada por *Quambalaria eucalypti*. *Fitopatologia Brasileira*, 30(5), 504-509.

- Aquino, L. A., Berger, P. G., Rodrigues, F. Á., Zambolim, L., Hernandez, F. R., & Miranda, L. M. (2008). Elaboração e validação de escala diagramática para quantificação da mancha de ramularia do algodoeiro. *Summa Phytopathologica*, 34(4), 361-363.
- Araújo, E. R., Resende, R. S., Krezanoski, C. E., & Duarte, H. S. S. (2018). A standard area diagram set for severity assessment of botrytis leaf blight of onion. *European Journal of Plant Pathology*.
- Barbosa, M. A. G., Michereff, S. J., & Mora-Aguilera, G. (2006). Elaboração e validação de escala diagramática para avaliação da severidade da ferrugem branca do crisântemo. *Summa Phytopathologica*, 32(1), 57-62.
- Bardsley, S. J., & Ngugi, H. K. (2012). Reliability and accuracy of visual methods to quantify severity of foliar bacterial spot symptoms on peach and nectarine. *Plant Pathology*, 62(2), 460-474.
- Buffara, C. R. S., Angelotti, F., Vieira, R. A., Bogo, A., Tessmann, D. J., & Bem, B. P. de (2014). Elaboration and validation of a diagrammatic scale to assess downy mildew severity in grapevine. *Ciência Rural*, 44(8), 1384-1391.
- Capucho, A. S., Zambolim, L., Duarte, H. S. S., Parreira, D. F., Ferreira, P. A., ... Cota, L. V. (2010). Influence of leaf position that correspond to whole plant severity and diagrammatic scale for white spot of corn. *Crop Protection*, 29(9), 1015-1020.
- Coleman-Derr, D., Desgarenes, D., Fonseca-Garcia, C., Gross, S., Clingenpeel, S., Woyke, T ... Tringe, S. G. (2016). Plant compartment and biogeography affect microbiome composition in cultivated and native *Agave* species. *New Phytologist*, 209(2), 798-811.
- CONAB Companhia Nacional de Abastecimento. (2017). Conjuntura mensal. Fibras-Setembro/2017.
- Cordeiro, Z. J. M., Shepherd, K., Soares Filho, W. S., & Dantas, J. L. L (1993). Avaliação de resistência ao mal-do-Panamá em híbridos tetraploides de bananeira. *Fitopatologia Brasileira*, 18(4), 478-483.
- Coutinho, W. M., Suassuna, N. D., Luz, C. M., Suinaga, F. A., & Silva, O. R. R. F da (2006). Bole rot of sisal caused by *Aspergillus niger* in Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, 31(6), 605.
- Damasceno, V. F. F., Furtado, E. L., & Ferreira Filho, P. J. (2014). Comparação de dois métodos de elaboração e validação de escala diagramática para a quantificação da severidade da mancha de *Cylindrocladium* em eucalipto. *Summa Phytopathologica*, 40(3), 248-255.
- Duarte, E. A. A., Damasceno, C. L., de Oliveira, T. A. S., Barbosa, L. O., Martins, F. M., de Queiroz, S. J. R., ... Soares, A.C.F. (2018). Putting the Mess in Order: *Aspergillus welwitschiae* (and Not *A. niger*) Is the Etiological Agent of Sisal Bole Rot Disease in Brazil. *Frontier Microbiology*, 9(1227), 1-21.
- FAOSTAT. (2019). Food and agriculture organization of the United Nations: statistics division. Retrieved January 11, 2019, from: <http://faostat.fao.org/>
- Friedmann, M., Lapidot, M., Cohen, S., & Pilowsky, M. (1998). A novel source of resistance to tomato yellow leaf curl virus exhibiting a symptomless reaction to viral infection. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 123(6), 1004- 1007.

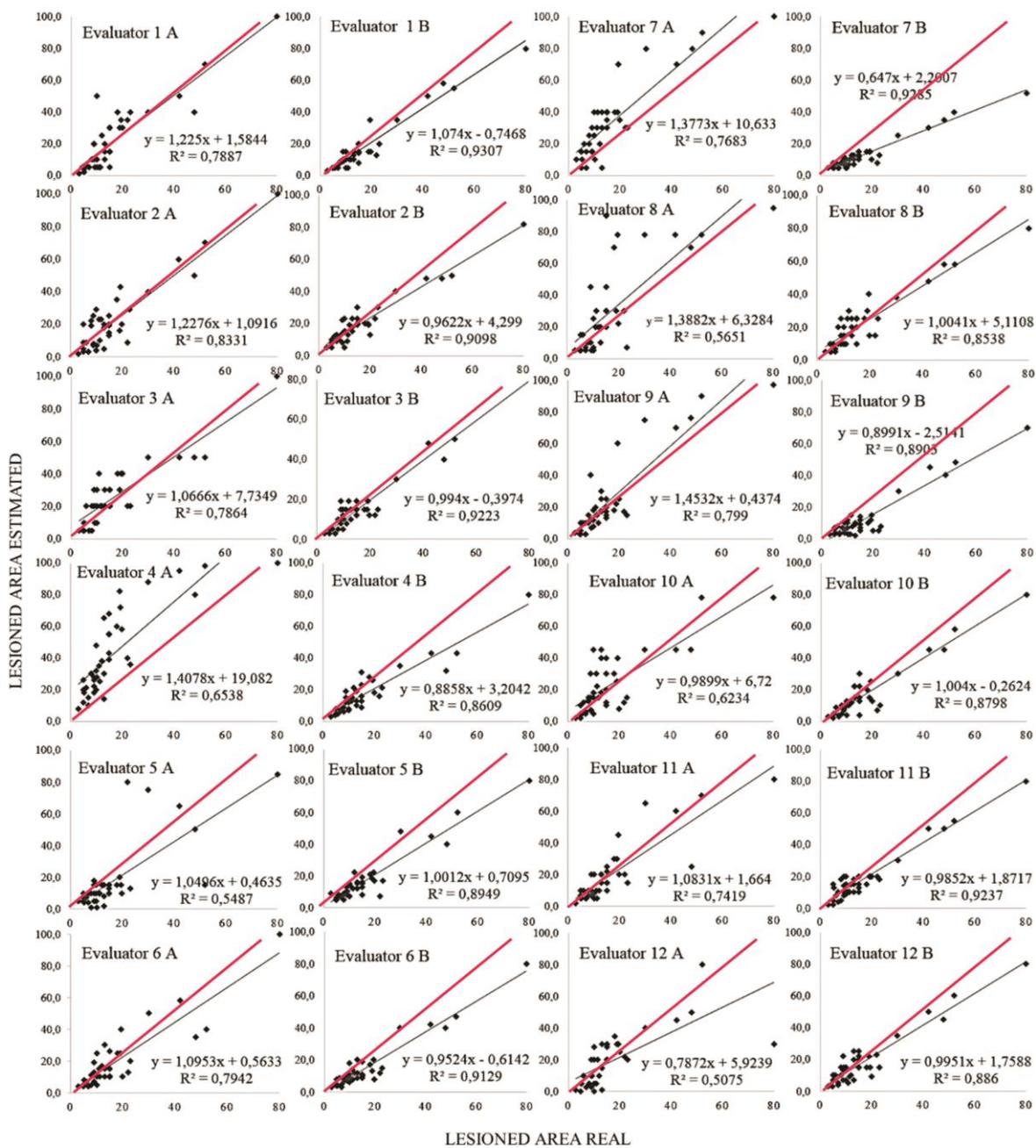
- Gomes, A. M. A., Michereff, S. J., & Mariano, R. L. R. (2004). Elaboração e validação de escala diagramática para cercosporiose da alface. *Summa Phytopathologica*, 30(1), 38–42.
- Horsfall, J. G., & Cowling, E. B. (1978). *Pathometry: the measurement of plant disease*. In: Horsfall, J. G., Cowling, E. B. (Ed.). *Plant disease: an advanced treatise – how disease develops in populations*. New York: Academic, Cap.2, p.119-136.
- IBGE (2017) Levantamento Sistemático da produção agrícola. Retrieved January 11, 2019, from: <https://ww2.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/default.shtm>
- Latunde-Dada, A. O. (1990). Assessment of anthracnose disease in some cultivars of cowpea (*Vigna unguiculata*) caused by *Colletotrichum lindemuthianum*. *Journal of Phytopathology*, 130(2), 147-156.
- Lenz, A., Balardin, R. S., Corte, G. D., Marques, L. N., & Debona, D. (2010). Escala diagramática para a avaliação de severidade de mancha-parda em arroz. *Ciência Rural*, 40(4), 752–758.
- Maciel, J. L. N., Danelli, A. L. D., Boretto, C., & Forcelini, C. A. (2013). Diagrammatic scale for assessment of blast on wheat spikes. *Summa Phytopathologica*, 39(3), 162-166.
- Madden, L. V., Hughes, G., & van den Bosch, F. (2007). *The study of plant disease epidemics*. APS Press, St. Paul
- Martins, M. C., Guerzoni, R. A., Câmara, G. M. S., Mattiazzi, P., Lourenço, S. A., & Amorim, L. (2004). Escala diagramática para a quantificação do complexo de doenças foliares de final de ciclo em soja. *Fitopatologia Brasileira*, 29(4), 179–184.
- Mazaro, S. M., Gouvea, A de., De Mio, L. L. M., Deschamps, C., Biasi, L. A., & Citadin, I. (2006). Diagrammatic scale to evaluate the mycosphaerella blight severity in strawberry. *Ciência Rural*, 36(2), 648-652.
- Medina, J. C. (1954). *O Sisal*. São Paulo: Secretaria da Agricultura, Diretoria de Publicidade Agrícola.
- Michereff, S. J., Maffia, L. A., & Noronha, M. A. (2000). Escala diagramática para avaliação da severidade da queima das folhas do inhame. *Fitopatologia Brasileira*, 25(4), 612-619.
- Neto, I. L da. C. & Martins, F. M. (2012). Anatomia dos órgãos vegetativos *Agave sisalana* Perrine ex Engelm (Agavaceae). *Revista Caatinga*, 25(2), 72-78.
- Nicoli, A., Costa, R. V da., Cota, L. V., Silva, D. D da., Zambolim, L., Lanza, F. E., ... Landau, E. C. (2015). Diagrammatic scale validation to quantify the severity of anthracnose stalk in corn. *Ciência Rural*, 45(10), 1720-1726.
- Nutter, F. W. Jr.; Gleason, M. L., Jenco, J. H., & Christinas, N. C. (1993). Assessing the accuracy, intra-rater repeatability, and inter-rater reliability of disease assessment systems. *Phytopathology*, 83(8), 806–812.
- R Development Core Team (2018). *R: A language and environment for statistical computing*. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.

- Rios, J. A., Debona, D., Duarte, H. S. S., & Rodrigues, F. A. (2013). Development and validation of a standard area diagram set to assess blast severity on wheat leaves. *European Journal of Plant Pathology*, 163(3), 603-611.
- Santos, P. H. D., Mussi-Dias, V., Freire, M. G. M., Carvalho, B. M., & Silveira, S. F. (2017). Diagrammatic scale of severity for postharvest black rot (*Ceratocystis paradoxa*) in coconut palm fruits. *Summa Phytopathologica*, 43(4), 269-275.
- Santos, R. F., & Spósito, M. B. (2018). Improving assessments of anthracnose severity on grapevine leaves through the development of a standard area diagram set. *Australasian Plant Pathology*, 47(4), 357-364.
- Silva, O. R. R. F., Coutinho, W. M., Cartaxo, W. V., Sofiatti, V., FILHO, J. L da S., Carvalho, O. S., & Costa, L. B da. (2008). *Cultivo do Sisal no Nordeste Brasileiro*. Circular Técnica n. 123.
- Sussel, A. A. B.; Pozza, E. A.; & Castro, H. A. (2009). Elaboração e validação de escala diagramática para avaliação da severidade do mofo cinzento em mamoneira. *Tropical Plant Pathology*, 34(3), 186-191.
- Teramoto, A., Aguiar, R. A., Garcia, R. Á., Martins, M. C., & Cunha, M. G. (2011). Escala diagramática para avaliação da severidade da mancha alvo em folhas de pepineiro. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 41(3), 439-445.
- Vale, F. X. R do., Jesus Junior, W. C de., Liberato, J. R., & Souza, C. A de (2004). *Quantificação de doenças e do crescimento do hospedeiro*. In: Vale FXR do, Jesus Junior WC de, Zambolim L. Epidemiologia aplicada ao manejo de doenças. Belo Horizonte: Editora Perfil. pp. 91-121.
- Yadav, N. V. S., Vos, S.M de., Bock, C. H., & Madeira, B. W. (2013). Development and validation of standard area diagrams to an id assessment of pecan scab symptoms on fruit. *Plant Pathology*, 62(2), 325-335.



Nota	Descrição dos sintomas
0	Caule com lesão mecânica
1	Lesões iniciais no tecido do caule próximo ao tecido basal da folha, com cor castanho claro a avermelhado $\leq 5\%$ da área da haste lesionada
2	Podridão inicial no tecido basal da folha, crescendo em direção ao tecido do caule, com lesões de cor marrom claro a avermelhado, com 7-20% de área lesionada
3	Podridão do caule com lesões castanho claro a avermelhado no tecido basal da folha e no tecido do caule interno, com 22-45% da área lesionada
4	Podridão do caule, com lesões internas de marrom claro a avermelhado, atingindo todo o tecido central do caule e tecido meristemático foliar, com 50 - $\leq 78\%$ da área lesionada
5	Morte da planta, com podridão completa do caule de cor castanho claro

**Figura 1.** Escala de notas para avaliação da severidade da podridão vermelha de mudas de sisal (*Agave sisalana*)

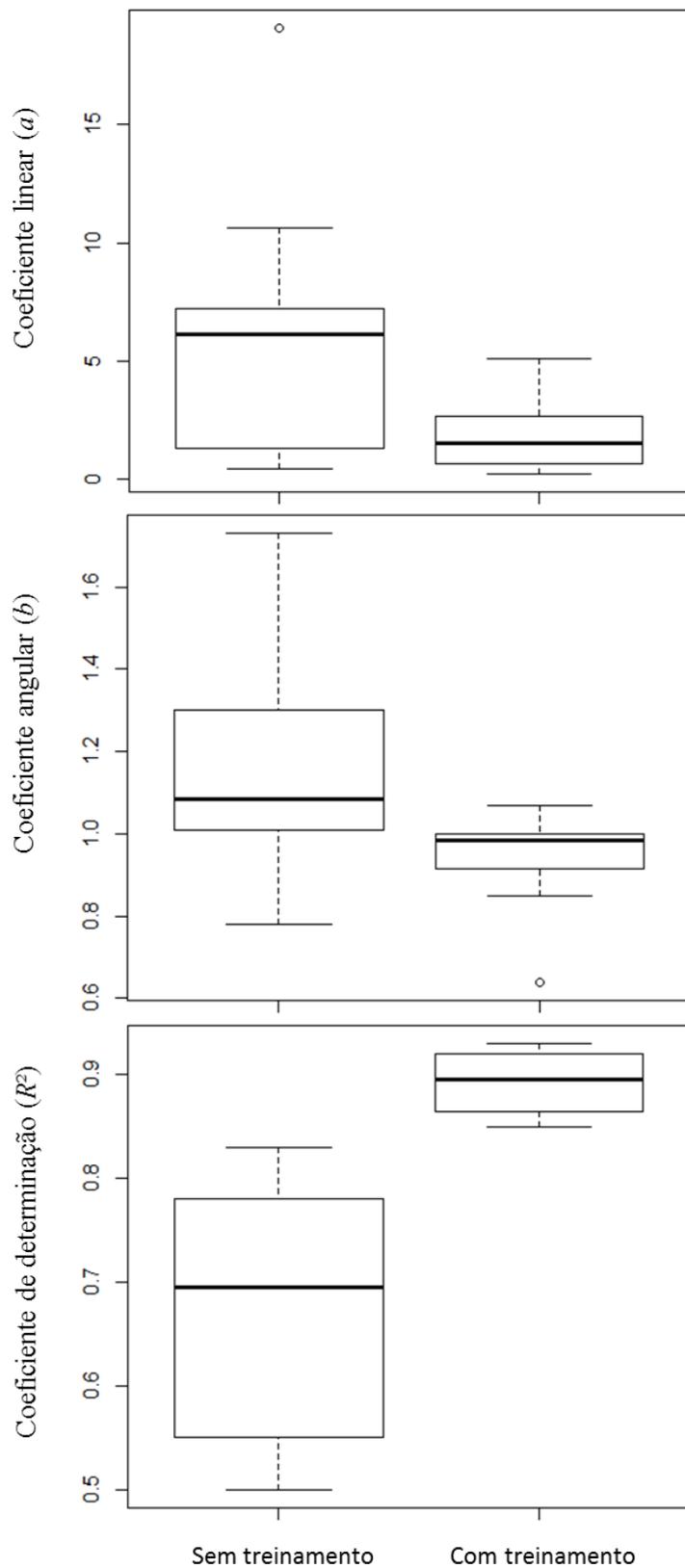


**Figura 2.** Estimativa da severidade da podridão vermelha do sisal por 12 avaliadores sem (A) e com (B) treinamento, e regressões lineares obtidas entre a severidade real e a estimada.

**Tabela 2.** Coeficiente linear ( $a$ ), coeficiente angular ( $b$ ), e coeficiente de determinação ( $R^2$ ) da linha de regressão para real (variável independente) versus severidade estimada (variável dependente) do sisal por 12 avaliadores sem e com treinamento.

Avaliador	Sem treinamento			Com treinamento		
	$a$	$b$	$R^2$	$a$	$b$	$R^2$
1	1,58	1,22	0,78	0,74	1,07	0,93
2	1,09	1,22	0,83	4,29	0,96	0,90
3	7,73	1,06	0,78	0,39	0,99	0,92
4	19,08	1,40	0,65	3,20	0,88	0,86
5	0,46	1,04	0,54	0,70	1,00	0,89
6	0,56	1,09	0,79	0,61	0,95	0,91
7	10,63	1,73	0,76	2,20	0,64	0,92
8	6,32	1,38	0,56	5,11	1,00	0,85
9	0,43	1,45	0,79	2,50	0,89	0,89
10	6,72	0,98	0,62	0,26	1,00	0,87
11	1,66	1,08	0,74	1,87	0,98	0,92
12	5,92	0,78	0,50	1,75	0,99	0,88
<b>Média</b>	5,18*	1,20*	0,70	1,97*	0,95	0,90

\* - situação em que a hipótese nula ( $a=0$  e  $b=1$ ) foi rejeitada pelo teste t ( $p<0,05$ ).



**Figura 3.** Estimativa da podridão vermelha do sisal, *Boxplot* dos valores do coeficiente linear (a), coeficiente angular (b) e coeficiente de determinação ( $R^2$ ) dos 12 avaliadores ST e CT.

## ARTIGO 2

### **HISTOPATOLOGIA DA PODRIDÃO VERMELHA EM *Agave sisalana* Perrine (Asparagaceae)<sup>1</sup>**

---

<sup>1</sup>Artigo ajustado nas normas do Comitê Editorial do periódico científico Plant Pathology.

## **Histopatologia da podridão vermelha em *Agave sisalana* Perrine (Asparagaceae)**

L. de O. Barbosa, F. M. Martins, A. C. F. Soares\*

Center of Agricultural, Environmental and Biological Sciences, Federal University of Reconcavo of Bahia, Cruz das Almas, Brazil.

\*Autor correspondente: Ana Cristina Fermino Soares, e-mail: [acsoares@ufrb.edu.br](mailto:acsoares@ufrb.edu.br)

**Resumo:** A podridão vermelha causada pelo fungo *Aspergillus welwitschiae* é o principal problema fitossanitário da cultura do sisal (*Agave sisalana* Perrine) no Brasil. Estudos sobre a interação *A. sisalana* - *A. welwitschiae* são escassos, o que limita a definição de estratégias de controle dessa doença. Este trabalho teve como objetivo estudar os aspectos histopatológicos do caule de sisal sadio e infectado naturalmente em condição de campo. As plantas adultas sadias e infectadas foram coletadas em duas áreas produtoras de sisal no município de Conceição de Coité na Bahia, Brasil. Os fragmentos dos caules foram processados com técnicas usuais de anatomia vegetal e os testes histoquímicos foram realizados com amostras frescas e fixadas. As secções do caule sadio não apresentaram alterações histológicas. Nos cortes histológicos do caule infectado foi observado que as células parenquimáticas e os feixes vasculares colonizadas pelas hifas do *A. welwitschiae* apresentam parede celular degradada e sem formato definido, evidenciando que o patógeno atua como necrotrófico. As observações das secções infectadas também demonstram que o *A. welwitschiae* pode comportar-se como patógeno vascular, colonizando os vasos do xilema. Além das estruturas vegetativas, clamidósporos intercalares do *A. welwitschiae* também foram visualizados no tecido necrosado. Como resposta de defesa ao *A. welwitschiae*, a planta de sisal apresentou lignificação de células parenquimáticas, obliteração dos elementos de vaso com material amorfo composto por fenóis e polissacarídeos e início da produção de compostos fenólicos no tecido infectado. Estes mecanismos estruturais e bioquímicos pós-formados retardam a colonização do *A. welwitschiae* no caule do sisal, mas não impedem a podridão vermelha e morte da planta. As observações microscópicas do caule sadio e infectado forneceram informações significativas sobre a interação *A. sisalana* - *A. welwitschiae*, contribuindo para a compreensão do patossistema e futuros estudos para a definição de estratégias de controle.

**Palavras-chave:** *A. welwitschiae*, Histologia, Lignificação, Compostos fenólicos, Patógeno vascular.

### **Histopathology of bole rot disease in *Agave sisalana* Perrine (Asparagaceae)**

**ABSTRACT:** The bole rot disease caused by *Aspergillus welwitschiae* is the main phytosanitary problem of sisal crop in Brazil. Studies on the interaction *A. welwitschiae* - *Agave sisalana* are scarce, which limits the definition of strategies to control this disease. This work aimed to study the anatomical and histochemical characteristics of sisal healthy and naturally infected stem tissue from field sampled plants. Healthy and symptomatic adult plants were collected in two areas in the city of Conceição do Coité, in the state of Bahia, Brazil. The samples were processed using usual techniques of vegetal anatomy and histochemical tests were performed with fresh and fixed samples. In sections of the stem with symptoms of the disease it was observed that bole rot disease is present throughout the fundamental parenchyma. In infected stem tissue, the parenchyma cells show a degraded cell wall with no definite shape, demonstrating that *A. welwitschiae* is acting as a necrotrophic pathogen. Longitudinal sections showed the presence of *A. welwitschiae* hyphae in vessel elements, suggesting that the pathogen can also act as a vascular pathogen. Resistance structures (chlamydospores) of the pathogen were also visualized in histological sections. In response to infection by the pathogen, sisal plants presented resistance mechanisms such as cell wall lignification, obliteration of vessel elements and initial production of phenolic compounds. These mechanisms delay the colonization of the tissues by the pathogen, however, they do not prevent stem rot and plant death. The microscopic observations of *A. welwitschiae* colonization on *A. sisalana* tissues and the cellular response to infection provided significant information about the pathogenesis of *A. welwitschiae* infected sisal plant, contributing to the understanding of this patosystem and future studies for the definition of strategies.

**Key words:** Sisal, *A. welwitschiae*, Anatomy, Histochemistry, Plant-pathogen interaction, Defense mechanisms.

## Introdução

A *Agave sisalana* Perrine conhecida como sisal é uma monocotiledônea herbácea pertencente à família *Asparagaceae*. A planta é originária de regiões áridas e semiáridas do México e, atualmente está bem adaptada as condições edafoclimáticas de países como Brasil, Tanzânia e Quênia (Silva *et al.* 2008; Coleman-Derr *et al.* 2016; FAOSTAT, 2017), onde é cultivada para a extração e comercialização das fibras de suas folhas. A fibra do sisal constitui na principal fibra dura vegetal produzida no mundo e, é utilizada para a fabricação de fios, cordas, cordéis, tapetes e na construção civil (Silva *et al.* 2008).

Desde 1961, o Brasil se destaca como o maior produtor de fibra de sisal no mundo e, em 2017 a sua produção atingiu 79,629 toneladas, correspondendo a 40 % de toda produção mundial (FAOSTAT, 2017). Embora a produção brasileira seja a maior entre os países produtores de sisal. De acordo com dados da Food and Agriculture Organization (FAOSTAT, 2017), a produção de fibra de sisal no Brasil diminuiu na última década, tendo uma redução em mais de 50% na produção de 2017 em comparação com o ano 2016. Fatores como longos períodos de estiagem e problemas fitossanitários são apontados como causadores desse declínio ao longo dos anos (Coutinho *et al.* 2006; Silva *et al.* 2008).

O sisal é considerado uma planta rústica com poucos problemas com pragas e doenças capazes de gerar prejuízos econômicos (Medina, 1954; Silva *et al.* 2008). A planta possui características morfológicas como cutícula espessa em ambas as faces da lâmina foliar e células altamente lignificadas no córtex da raiz que a protege do ataque de pragas e microrganismos patogênicos (Neto & Martins, 2012). Apesar dessa proteção natural, uma podridão no caule causada pelo fungo *Aspergillus welwitschiae* tem sido o principal problema fitossanitário da cultura durante décadas (Medina, 1954; Coutinho *et al.* 2006; Duarte *et al.* 2018). Essa doença é chamada de podridão vermelha do sisal (Abreu, 2010), mas também é conhecida como podridão vermelha do tronco do sisal (Lima *et al.* 1998),

podridão do tronco do sisal (Coutinho *et al.* 2006) ou podridão parda do sisal (Barbosa *et al.* 2018), e no Brasil tem sido relatada em todos os estados produtores, com incidência na Bahia variando de 5-40 % (Abreu, 2010).

O *A. welwitschiae* pode infectar o sisal em qualquer estágio de desenvolvimento, desde mudas (rebentos) até plantas adultas, mas para que possa iniciar o processo de infecção, o patógeno necessita de algum tipo de injúria (mecânica ou fisiológica) nos indivíduos (Coutinho *et al.* 2006; Silva *et al.* 2008). Nos plantios de sisal, as plantas doentes são identificadas pelos sintomas externos como amarelecimento e murcha das folhas. O caule infectado apresenta alteração na sua coloração interna, adquirindo descoloração rosa/vermelhada nos tecidos com início da infecção, e nos tecidos mais necrosados, a coloração varia entre parda à marrom (Coutinho *et al.* 2006; Duarte *et al.* 2018). As folhas das plantas infectadas são impróprias para extração de fibras e com a colonização do patógeno, o caule apodrece totalmente, causando o tombamento e a morte do sisal.

Embora a podridão vermelha não seja uma doença recente na cultura do sisal, estudos científicos nesse patossistema tem sido historicamente negligenciado e até o presente momento, informações sobre a interação *A. welwitschiae* - *A. sisalana* são escassas na literatura científica, principalmente nas questões relacionadas com a colonização do patógeno e a resposta a nível celular da planta à infecção. A falta de tais informações tem limitado a definição de estratégias de controle dessa doença.

As observações citológicas da infecção muito frequentemente fornecem informações significativas para as investigações sobre a interação planta-patógeno (Kunoh, 2008; Gupta & Pandey, 2013). Entretanto é preciso selecionar o material vegetal adequado e realizar o correto processamento das amostras para evitar resultados errôneos (Yeung, 1999) e para que possa visualizar a colonização do patógeno nos tecidos e a resposta

celular vegetal a este processo (Kunoh, 2008; Gupta & Pandey, 2013). A colonização da planta pelos patógenos, normalmente, caracteriza-se pela desagregação celular e pela utilização de nutrientes para desempenhar suas atividades vegetativas e reprodutivas (Pascholati, 2011). Simultaneamente, o hospedeiro pode responder à presença do patógeno através da formação de mecanismos de defesa (Pascholati, 2011).

Os mecanismos de defesa da planta ao ataque de agentes patogênicos podem ser pré-formados e/ou induzidos e são divididos em estruturais e bioquímicos (Stangarlin *et al.* 2011; Miedes *et al.* 2014). Os estruturais constituem-se nas barreiras físicas à penetração e a colonização pelo patógeno, enquanto os bioquímicos englobam a produção de substâncias capazes de inibir o desenvolvimento do patógeno ou gerar condições adversas para a sua sobrevivência nos tecidos do hospedeiro (Matiello *et al.* 1997; Agrios, 2005; Stangarlin *et al.* 2011; Miedes *et al.* 2014). A combinação das características estruturais e bioquímicas de defesa das plantas varia de acordo com o patógeno e o hospedeiro, bem como a idade da planta, o tipo de órgão e tecido atacado, a condição nutricional da planta e as condições climáticas (Agrios, 2005).

Nesse contexto, um estudo histológico de caules de sisal sadio e sintomático pode contribuir para a melhor compreensão dos aspectos inerentes a interação *A. welwitschiae* - *A. sisalana*. Este trabalho tem como objetivo estudar os aspectos histopatológicos do caule de sisal sadio e infectado naturalmente em condição de campo.

## **Material e métodos**

### **Seleção e coleta do material vegetal**

As plantas de sisal sadias e com sintomas morfológicos da podridão vermelha foram coletadas em duas propriedades na comunidade de Salgadalia, distrito de Conceição

do Coité, Bahia, Brasil (Propriedade 1: Latitude 11°25'57"S e Longitude 39°11'19"W e Propriedade 2: 11°40'21"S e Longitude: 39°19'26"W). Em cada área foram selecionadas três plantas adultas sintomáticas e uma planta sadia. Nove fragmentos de caule (3 cm de comprimento x 2 cm de largura) foram retirados de cada indivíduos para a realização do estudo histológico e para o isolamento do patógeno. Nos caules infectados, os fragmentos foram retirados da região limítrofe entre a área lesionada e a área sadia.

### **Isolamento, preservação e identificação do patógeno**

Os fragmentos do caule infectado foram lavados em água corrente para retirada de impurezas e foram desinfestados em álcool 70 % durante um minuto, seguido de hipoclorito de sódio (1%) durante um minuto e três lavagens seguidas com água destilada esterilizada. O excesso de água foi removido usando papel de filtro esterilizado (Whatman n°. 1). Posteriormente, esses fragmentos foram transferidos para placas de Petri de 9 cm contendo meio de cultivo Batata, Dextrose e Ágar (BDA). As placas foram vedadas e incubadas por 4 a 5 dias a 28°C no escuro. Após esse período, as colônias fúngicas crescidas ao redor dos fragmentos foram transferidas para novas placas de Petri contendo o mesmo meio e mantidas nas mesmas condições para obtenção da cultura pura.

A preservação dos isolados de *Aspergillus* ocorreu com a transferência de discos de micélio contendo conídios para água esterilizada em frascos de vidro com tampa de borracha e mantidos 7°C e para glicerol 30% em tubos criogênicos esterilizados para conservação em ultrafreezer a -80°C.

A identificação dos isolados de *Aspergillus* foi realizada com base na morfologia e biologia molecular, conforme descrito e publicado por Duarte *et al.* (2018).

### **Anatomia e histoquímica do caule de *A. sisalana***

As amostras do caule de sisal sadio e infectado foram fixadas em FNT (Formalina Neutra Tamponada:tampão fosfato, formalina, 9:1 v/v) por 48 horas (Lillie, 1965), submetidas a vácuo durante o processo de fixação e conservadas em álcool etílico 70%. O material foi desidratado em série etílica e inserido em 2-hidroxietilmeta-acrilato (historresina-Leica) segundo Meira & Martins (2003). Secções transversais e longitudinais com espessura variável (5 - 12 µm) foram obtidas em micrótomo rotativo (Leica RM2245).

Os cortes foram corados com azul de toluidina em pH 4,4 (O'Brien & McCully, 1981) e para a visualização das estruturas do patógeno foi realizada uma dupla coloração com azul de toluidina e fucsina básica (Junqueira, 1990). As lâminas foram montadas com resina sintética (Permount/Fisher).

Os testes histoquímicos foram realizados com amostras fixadas e frescas. O material fixado foi obtido conforme descrito anteriormente, entretanto sem passar pelo processo de coloração. As amostras frescas foram obtidas do material conservado no álcool 70%, as quais foram isoladas e seccionadas em criomicrotomo Leica CM1850. Os cortes foram submetidos aos seguintes testes histoquímicos: compostos fenólicos (Cloreto de Ferro III) (Johansen, 1940), lignina (Floroglucinol acidificado) (Johansen, 1940) e polissacarídeos (PAS - Ácido Periódico/Reagente de Schiff) (McManus, 1948). O controle para os testes seguiu o preconizado na metodologia.

A fotodocumentação foi realizada em microscópio (Olympus BX51) acoplado ao sistema fotográfico digital (Olympus A330). As escalas das figuras foram obtidas por meio da projeção de uma lâmina micrométrica fotografada/digitalizada nas mesmas condições ópticas das ilustrações.

## Resultados

Os isolados de *Aspergillus* obtidos dos fragmentos de caule de sisal com a podridão vermelha analisados no estudo histológico foram identificados morfológicamente como as espécies *A. welwitschiae*/*A. niger*. A análise molecular confirmou que os isolados pertencem a espécie de *A. welwitschiae* (Dados publicados por Duarte *et al.* 2018). Não houve crescimento de outros fungos ou bactérias nos fragmentos de caule infectado, confirmando que as observações das alterações anatômicas no tecido caulinar do sisal foram causadas pelo *A. welwitschiae*.

A comparação entre as amostras dos caules sadios e infectados, das duas áreas de estudo, evidenciou as mesmas características anatômicas e histoquímicas. Além disso, nos indivíduos infectados, o patógeno também apresentou o mesmo comportamento nos tecidos, não havendo diferença quanto as propriedades amostradas.

Em secção transversal, o caule do tipo prato onde estão inseridas as folhas em uma filotaxia espiralada é constituído por epiderme, córtex e cilindro vascular. No caule de *A. sisalana* não ocorre endoderme anatomicamente definida, por isso torna-se difícil a delimitação exata entre o córtex e o cilindro vascular. Todo o parênquima de preenchimento e os espaços entre os feixes vasculares são formados por numerosas camadas de células isodiamétricas (Figura 1a, b). Geralmente estas células são grandes e com parede celular delgada, e delimitam pequenos espaços intercelulares (Figura 1b).

O sistema vascular é do tipo atactostelo, com feixes vasculares distribuídos de forma aleatória no cilindro vascular (Figura 1a). Os feixes vasculares do caule são envolvidos por um anel externo de células esclerenquimáticas (Figura 1a, c). A posição ocupada pelo xilema e floema nos feixes vasculares é colateral com floema voltado para a

periferia e o xilema para a região central (Figura 1c). Os elementos de vaso possuem espessamento predominantemente do tipo escalariformes (Figura 1d).

No caule são encontrados idioblastos contendo cristais finos, pontiagudos e reunidos em feixes, denominados de ráfides (Figura 1e). Essas células encontram-se dispersas em todo o parênquima, desde o córtex até a região intervacular.

Na secção transversal do caule de sisal com a podridão vermelha, foi observado que a infecção estava presente em todo o parênquima fundamental, desde o córtex (Figura 2a) até o cilindro vascular (Figura 2b).

A coloração avermelhada presente no tecido infectado reagiu com o corante do azul de toluidina no processo de coloração adquirindo coloração esverdeada, diferente do tecido sadio que corou de azul a roxo (Figura 2a, b, c, d). Essa diferença de coloração possivelmente está relacionada com a presença de compostos químicos distintos nesses tecidos.

As células parenquimáticas do tecido infectado apresentam-se com a parede celular degradada e sem formato definido (Figura 2a, b). Nas células não degradadas, observa-se um aumento na espessura de suas paredes, possivelmente pela deposição de lignina (Figura 2b, c). Esse aumento da espessura é mais acentuado nas células que delimitam o tecido sadio do infectado (Figura 2c).

Os feixes vasculares colonizados ficam completamente destruídos com a degradação dos elementos de vaso do xilema e as células do floema perdem a sua forma e como resultado sua visualização nem sempre é possível (Figura 2d, e). Alguns elementos de vaso encontram-se obliterados por um material amorfo, corado fortemente pelo azul de toluidina adquirindo coloração roxa à verde (Figura 2d, e).

Os idioblastos contendo os cristais assim como as demais células do parênquima com a podridão vermelha também apresentam coloração esverdeada da parede celular que

diferem daquelas observadas nas células sadias (Figura 1e). Estas células apresentam certa resistência a colonização, não se degradando com facilidade como as demais células parenquimáticas e, em alguns casos, foram observadas apenas as células idioblástica em tecidos totalmente degradados (Figura 2f, g).

A dupla coloração com azul de toluidina e fucsina básica foi eficaz na coloração das estruturas do *A. welwitschiae*. As secções longitudinais (Figuras 2h, i, j, k, l, m, n) evidenciam a presença do *A. welwitschiae* nos elementos de vaso (Figura 2h) e em células do parênquima (Figuras 2j, k, l). Essas observações sugerem que o *A. welwitschiae* coloniza o caule de *A. sisalana* tanto pelas células parenquimáticas quanto pelos feixes vascular (Figuras 2 b e d). As hifas do *A. welwitschiae* podem ser encontradas em espaços intercelulares (Figura 2i) e no interior das células parenquimáticas (Figuras 2j, k e l). As células do parênquima podem ser significativamente colonizadas ou não pelo *A. welwitschiae* (Figuras 2j, k, l). Em algumas secções do tecido necrosado também foram encontradas estruturas de resistência do *A. welwitschiae* (Figuras 2m, n). Os clamidósporos apresentam células vegetativas de parede celular espessa e de forma arredondada sendo encontrados intercaladamente nas hifas (Figuras 2m, n).

A secção transversal do caule de *A. sisalana* sadio (controle), e sem a aplicação dos corantes, apresentou aspecto natural incolor (Figura 3a), enquanto que na secção do caule infectado todo o cilindro vascular na mesma condição apresenta uma pigmentação vermelha intensa (Figura 3b). A pigmentação vermelha está presente em células do parênquima, nos feixes vasculares (Figura 3c) e também idioblóstos (Figura 3d). Através de testes histoquímicos foi evidenciada a presença de compostos fenólicos nessas células (Figuras 3e, f, g). A reação para compostos fenólicos foi positiva apenas para o tecido infectado, sugerindo que os compostos fenólicos foram produzidos como resposta da planta à colonização do patógeno.

No teste histoquímico para detecção de lignina, nas plantas sadias as únicas células com reação positiva ao teste foram as células do xilema (Figura 3h). O teste histoquímico, quando aplicado nos caules infectados, a parede celular das células do parênquima não degradadas reagiram positivamente para a presença de lignina na sua composição, obtendo assim coloração rosa (Figuras 3i, j). Esse resultado revela que a deposição de lignina em células parenquimáticas ocorreu como resposta defesa da planta a colonização do *A. welwitschiae*. Houve destaque para as células que delimitam o tecido sadio do infectado que apresentaram parede celular mais espessa, possivelmente pela maior deposição lignina. Além disso, as células degradadas foram negativas ao teste, demonstrando que não existe lignina na sua composição, sugerindo que a lignina pode ter sido degradada pelo *A. welwitschiae* (Figura 3i).

Os tecidos dos caules sadios e infectados foram positivos ao teste para detecção de polissacarídeos com a reação de PAS (Figuras 3k, l, m, n), merecendo destaque para os indivíduos infectados que apresentaram à presença de polissacarídeos nos espaços intercelulares (Figuras 3k, l) e também na obliteração dos elementos de vaso (Figuras 3m, n). A presença de polissacarídeos no xilema foi observada apenas nos tecidos infectados, evidenciando que esse comportamento ocorre como resposta de defesa da planta às ações do *A. welwitschiae*.

## **Discussão**

A organização dos elementos estruturais e a distribuição dos feixes vasculares observados na secção transversal do caule de *A. sisalana* é comum de espécies monocotiledôneas e está de acordo com as características já reportadas por Neto & Martins (2012) no estudo anatômico da mesma espécie.

Assim como foi constatada a presença de cristais tipo ráfides por todo o parênquima de preenchimento, Neto & Martins (2012) também descreveram a presença por inclusão celular em todo o mesofilo de *A. sisalana*, com maior concentração entre as células do parênquima paliçádico. De acordo com Paiva & Machado (2005), os cristais podem ocorrer em todos os tecidos das plantas. O número, localização e os tipos de cristais varia entre famílias de plantas, sendo os ráfides o mais comum em monocotiledôneas (Prychid & Rudall, 1999). A ocorrência natural por inclusão celular pode estar associada tanto com o processo de eliminação de excesso de cálcio, como em algumas espécies podem atuar na proteção contra herbívoros (Franceschi & Nakata, 2005). Alguns estudos também demonstram que a presença, quantidade e tipos de cristais em tecidos vegetais pode ser influenciada pela infecção de fungos fitopatogênicos (Ceita *et al.* 2007; Uloth *et al.* 2015). Embora os idioblastos com ráfides estejam presentes nos tecidos de *A. sisalana*, a sua função na planta ainda não foi esclarecida, e principalmente a sua relação na interação planta-patógeno. As análises histológicas não revelaram diferenças para este elemento nos tecidos sadios e infectados, no entanto nas secções do tecido infectado é evidenciado que existe uma determinada resistência dos idioblastos a colonização do *A. welwitschiae*. Com base nos resultados encontrados, acredita-se que esta resistência esteja associada a própria estrutura das ráfides, que podem atuar como uma barreira física no processo de infecção.

A diferença de coloração adquirida pelos tecidos do caule com o azul de toluidina foi uma característica frequentemente observada em todas as secções analisadas. Dessa forma foi possível diferenciar com facilidade o tecido não degradado (azul-roxo) do infectado (verde). Essa diferenciação de coloração ocorre porque o azul de toluidina é um corante catiônico metacromático de grande versatilidade e dependendo da composição química da parede celular, pode conferir diferente coloração ao tecido (O'Brien *et al.* 1964;

Sridharan & Shankar, 2012). A coloração esverdeada do tecido colonizado ocorreu devido à presença de compostos fenólicos, também demonstrado pela reação positiva ao teste histoquímico. Bach & Santos (2007) também observaram reação semelhante na coloração da parede celular de *Frullania brasiliensis* Raddi com o mesmo corante, obtendo assim, cor verde na presença de fenóis.

Os resultados da histologia demonstram que a pigmentação vermelha nos tecidos infectados está relacionada à produção de fenóis. Embora os fenóis geralmente sejam apontados como mecanismo de defesa bioquímico pré-formado na literatura (Schwan-Estrada *et al.* 2008; Pascholati, 2011; Stangarlin *et al.* 2011), a análise histoquímica não detectou essas substâncias no tecido sadio de sisal, sugerindo que os compostos fenólicos estavam ausentes ou presentes em baixa concentração nas células, que reagiram negativamente ao teste. No entanto, esse resultado reforça a hipótese de que o sisal necessita de um precursor, que neste caso seria o *A. welwitschiae* para iniciar a produção ou aumentar a concentração dessas substâncias nos tecidos como resposta de defesa para conter a infecção. Além dos compostos fenólicos serem tóxicos ao patógeno ou criarem condições adversas para o crescimento do mesmo na planta (Agrios, 2005; Stangarlin *et al.* 2011), a via fenilpropanóide responsável pela sua biossíntese também é base para síntese de outros grupos de polifenóis e lignina também relacionados com a defesa da planta (Schwan-Estrada *et al.* 2008), indicando que outras vias do metabolismo secundário do sisal podem ser ativadas contra o *A. welwitschiae*.

A dupla coloração com o azul de toluidina e fucsina básica foi eficaz em diferenciar as estruturas de *A. welwitschiae* das células vegetais nas secções infectadas do sisal, assim como foi reportado por Duarte *et al.* (2018). Não foi observada a presença do patógeno nos cortes dos caules sadios, reforçando que as plantas assintomáticas amostradas realmente não se encontravam infectadas. A ausência do *A. welwitschiae* no tecido sadio fortalece a

tese que existe uma via de infecção do fungo no sistema vascular do sisal. A fase de pré-penetração ainda não foi bem esclarecida nesse patossistema, entretanto sabe-se que o patógeno é considerado um parasita fraco, pois não consegue penetrar tecidos não injuriados, necessitando de lesões para iniciar o processo de infecção (Coutinho *et al.* 2006; Duarte *et al.* 2018). Sendo assim, os ferimentos ocasionados pelas capinas e retiradas de mudas (rebentos) são apontadas como importantes vias de penetração para o fungo (Silva *et al.* 2008). Duarte *et al.* (2018) também sugerem com base em resultados histológicos e na sintomatologia da doença, que os danos nas bainhas foliares na porção inferior do caule próximo ao solo (onde o fungo é comumente encontrado) como o local mais provável da infecção do *A. welwitschiae* no hospedeiro.

Nas plantas de sisal sintomáticas em campo, além do *A. welwitschiae* está presente no tecido caulinar como demonstrado neste estudo, o mesmo também pode ser encontrado em tecidos de folhas e raízes (Duarte *et al.* 2018), indicando que o fungo realiza uma colonização sistêmica, distribuindo-se por toda a planta (Agrios, 2005). Esta suposição é fortalecida com a visualização de suas hifas nas células de condução do xilema e também nas células do cilindro vascular.

O presente estudo revela pela primeira vez que o fungo *A. welwitschiae* também pode comporta-se como patógeno vascular e que possivelmente, os sintomas morfológicos de amarelecimento e murcha das folhas observados nas plantas infectadas em condição de campo (Coutinho *et al.* 2006; Duarte *et al.* 2018) estão relacionados com a colonização e obliteração dos feixes vasculares.

O bloqueio dos vasos do xilema é um mecanismo estrutural de defesa utilizado pelas culturas da banana, tomate e pepino contra o *F. oxysporum* (Beckman *et al.* 1972; Vandermolen *et al.* 1987; Wang *et al.* 2015). Este é o primeiro relato da obliteração dos elementos de vaso em *A. sisalana* como mecanismo de resistência contra o *A.*

*welwitschiae*. Embora não seja possível afirmar qual material amorfo é responsável pela oclusão do xilema em *A. sisalana*, sabe-se que o bloqueio pode ocorrer pela formação de tiloses (Wang *et al.* 2015), gomas (Grimault *et al.* 1994; Araujo *et al.* 2014) ou géis (Clériveret *et al.* 2000; Araujo *et al.* 2014). Além disso, o resultado dos testes histoquímicos demonstra claramente que a estrutura oclusiva no sisal pode conter diferentes componentes (compostos fenólicos e polissacarídeos) para aumentar a eficiência do bloqueio. A cultura da manga apresenta resposta de defesa semelhante contra o fungo *Ceratocystis fimbriata*, obstruindo os vasos do xilema com material amorfo formado por compostos fenólicos e polissacarídeos (Araujo *et al.* 2014).

O teste histoquímico comprovou que a lignificação da parede celular é um mecanismo estrutural pós-formado empregado pela *A. sisalana* para conter e retardar a colonização do *A. welwitschiae*. Resposta de defesa semelhante também foi observado na cultura do algodão e pimenta, havendo um aumento na produção de lignina em seus caules após serem infectadas pelo patógeno *Verticillium dahliae* (Pomar *et al.* 2004; Xu *et al.* 2011). Além de atuar como barreira física no processo de colonização dos tecidos, as células lignificadas da *A. sisalana* podem agir na proteção da planta contra toxinas e enzimas secretadas pelo patógeno, bem como pode impedir a transferência de água e nutrientes das células hospedeiras para o mesmo (Smith *et al.* 2007). Este achado reconfirma ainda que outra via do metabolismo secundário da *A. sisalana* foi ativada em resposta ao *A. welwitschiae*.

Este estudo ilustra pela primeira vez a produção de estrutura de resistência (clamidósporos) por *A. welwitschiae*. A capacidade de produzir tal estrutura também foi mencionada na literatura para outras espécies do gênero *Aspergillus* como *A. parasiticus* (Abou-Gabal & Fagerland, 1981) e *A. flavus* (Singh & Singh, 2012). As funções biológicas atribuídas aos clamidósporos diferem entre as espécies de fungos. No caso das espécies de

*A. parasiticus* e *A. flavus* a produção dos clamidósporos está associada com a produção de aflatoxinas (Abou-Gabal & Fagerland, 1981; Singh & Singh, 2012), enquanto os clamidósporos das espécies de *Fusarium* são os principais meios de sobrevivência a longo prazo na ausência do hospedeiro e desempenham um papel importante como o principal inóculo que infecta plantas (Couteaudier & Alabouvette, 1990; De-Cal *et al.* 1997; Akhter *et al.* 2016). Como os clamidósporos foram observados apenas em tecido colonizado, provavelmente, a produção desta estrutura de resistência por *A. welwitschiae* tenha sido induzida pela presença dos compostos fenólicos na região infectada. Apesar disso, a função dos clamidósporos de *A. welwitschia* no tecido necrótico do sisal e os fatores que estimulam a sua produção é algo totalmente novo e que precisa ser melhor investigado.

Embora seja desconhecido o período de incubação da podridão vermelha do sisal em condição de campo, observa-se que as plantas sintomáticas podem sobreviver por algum período de tempo, em função da colonização do tecido pelo *A. welwitschiae* ocorrer de forma lenta (Bock, 1965; Silva *et al.* 2008). O presente estudo elucidada pela primeira vez que, este atraso no processo de colonização do caule deve-se, provavelmente, aos mecanismos de defesa da planta induzidos pelo patógeno. Apesar de identificar mecanismos estruturais e bioquímicos em todas as plantas de *A. sisalana* infectadas naturalmente em campo, os resultados obtidos não são suficientes para correlacionar a presença de tais mecanismos com a resistência da planta ao patógeno, principalmente pela ausência de informações referentes ao período de incubação. Sendo assim, faz-se necessário a realização de experimentos com plantas infectadas artificialmente para a melhor compreensão da resposta de defesa da *A. sisalana* ao *A. welwitschiae*. A partir dos resultados obtidos nesta pesquisa, a indução dos mecanismos de resistência do sisal também poderá ser um critério utilizado para selecionar potenciais agentes de controle biológico nos estudos relacionados com o controle da podridão vermelha.

Em virtude dos fatos mencionados, concluímos que as observações microscópicas do caule de sisal sadio e infectado forneceram informações significativas sobre a interação *A. sisalana*- *A. welwitschiae*, como a colonização e comportamento do patógeno no tecido caulinar infectado e a resposta de defesa da planta através de mecanismos estruturais e bioquímicos.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela bolsa de doutorado de Leonardo de Oliveira Barbosa, a Financiadora de Estudos e Projetos- FINEP e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia- FAPESB pela apoio a infraestrutura de pesquisa na UFRB, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pela bolsa de produtividade em pesquisa de Ana C.F. Soares (Processo nº 308771/2017-6) e apoio financeiro projeto NEXUS – integração caatinga-sisal (Processo nº 441625/2017-7).

### **Referências**

- Abreu KCLDM, 2010. Epidemiologia da podridão Vermelha do Sisal no Estado da Bahia. Cruz das Almas, Brasil: Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, tese de doutorado.
- Abou-Gabal M, Fagerland J, 1981. Ultrastructure of the Chlamyospore Growth Phase of *Aspergillus parasiticus* Associated with Higher Production of Aflatoxins. *Mycoses* **24**, 307-311.
- Agrios GN, 2005. Plant Pathology. — 5th ed., Academic Press.

Akhter A, Hage-Ahmed K, Soja G, Steinkellner S, 2016 Potential of Fusarium wilt-inducing chlamydospores, in vitro behaviour in root exudates and physiology of tomato in biochar and compost amended soil. *Plant Soil* **406**, 425-440.

Araujo L, Silva BWM, Cacique IS, Cruz MFA, Rodrigues FA, 2014. Histopathological aspects of mango resistance to the infection process of *Ceratocystis fimbriata*. *Plant Pathology*, **63**, 1282–1295.

Bach E, Santos RP, 2007. Histoquímica da parede celular dos filídios de *Frullania brasiliensis* Raddi (Marchantiophyta). *Revista Brasileira de Biociências* **5**, 75-77.

Barbosa LO, Lima, JS, Magalhães, VC *et al.*, 2018. Compatibility and combination of selected bacterial antagonists in the biocontrol of sisal bole rot disease. *BioControl* **63**, 595–605.

Beckman CH, Elgersma DM, MacHardy WE, 1972. The localization of fusarial infections in the vascular tissue of single-dominant-gene resistant tomatoes. *Phytopathology* **62**, 1256-1260.

Bock KR, 1965. Diseases of sisal. *World Crops* **17**, 64-67.

Ceita GO, Macêdo JNA, Santos TB *et al.*, 2007. Involvement of calcium oxalate degradation during programmed cell death in *Theobroma cacao* tissues triggered by the hemibiotrophic fungus *Moniliophthora perniciosa*. *Plant Science* **173**, 106–117.

Clériveret A, Déon V, Alami I, Lopez F, Geiger JP, Nicole M, 2000. Tyloses and gels associated with cellulose accumulation in vessels are responses of plane tree seedlings (*Platanus × acerifolia*) to the vascular fungus *Ceratocystis fimbriata* f. sp *platani*. *Trees* **15**, 25–31.

Coleman-Derr D, Desgarences D, Fonseca-Garcia C *et al.*, 2016. Plant compartment and biogeography affect microbiome composition in cultivated and native *Agave* species. *New Phytologist* **209**, 798–811.

Couteaudier Y, Alabouvette C, 1990. Survival and inoculum potential of conidia and chlamydospores of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini* in soil. *Canadian Journal of Microbiology* **36**, 551–556.

Coutinho WM, Suassuna ND, Luz CM, Suinaga FA, Silva ORRF, 2006. Bole rot of sisal caused by *Aspergillus niger* in Brazil. *Fitopatologia Brasileira* **31**, 605.

De-Ca A, Pascual S, Melgarejo P, 1997. Infectivity of chlamydospores vs microconidia of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* on tomato. *Journal of Phytopathology* **145**, 231–233.

Duarte EAA, Damasceno CL, Oliveira TAS *et al.*, 2018. Putting the Mess in Order: *Aspergillus welwitschiae* (and Not *A. niger*) Is the Etiological Agent of Sisal Bole Rot Disease in Brazil. *Frontier Microbiology* **9**, 1-21.

FAOSTAT, 2017. Food and agriculture organization of the United Nations: statistics division. Available online at: <http://faostat.fao.org/>. Accessed 11 January 2019.

Franceschi VR, Nakata PA, 2005. Calcium oxalate in plants: formation and function. *Annal. Review of Plant Biology* **56**, 41-71.

Grimault V, Gélie B, Lemattre M, Prior P, Schmit J, 1994. Comparative histology of resistant and susceptible tomato cultivars infected by *Pseudomonas solanacearum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **44**, 105-123.

Gupta VK, Pandey BK, 2013. Histopathological Technique for Detection of Fungal Infections in Plants. In: Gupta V, M Tuohy, Ayyachamy M, Turner K, O'Donovan A, eds. [Laboratory Protocols in Fungal Biology](#). Fungal Biology. Nova Iorque, NY, EUA: Springer, 197-200.

Johansen DA, 1940. Plant Microtechnique. New York: McGraw-Hill.

Junqueira CU, 1990. O uso de cortes finos de tecidos na medicina e biologia. *Meios & Métodos* **66**, 10-11.

Kunoh H, 2008. Aspectos celulares das interações planta-patógeno. In: Pascholati, S. F. et al. Interação planta-patógeno: fisiologia, bioquímica e molecular. Piracicaba, Brasil: FEALQ, 153-176.

Lillie RD, 1965. Histopathologic technic and practical histochemistry. New York: McGraw-Hill.

Lima EF, Moreira JAN, Batista FAS, Silva ORRF, Farias FJC, Araújo AE, 1998. Podridão vermelha do tronco do sisal (*Agave sisalana* Perr.) causada por *Botryodiplodia theobromae* Pat. *Revista de Oleaginosas e Fibrosas*, **2**, 109-112.

Matiello RR, Barbieri RL, Carvalho FIF, 1997. Plant resistance to fungal diseases. *Ciência Rural* **27**, 161-168.

McManus JFA, 1948. Histological and histochemical uses of periodic acid. *Stain Technology* **23**, 99-108.

Medina JC, 1954. O sisal. São Paulo: Secretaria da Agricultura do Estado de São Paulo.

Meira RMSA, Martins FM, 2003. Inclusão de material herborizado em metacrilato para estudos de anatomia vegetal. *Revista Árvore* **27**, 109-112.

Miedes E, Vanholme R, Boerjan W, Molina A, 2014. The role of the secondary cell wall in plant resistance to pathogens. *Frontiers in Plant Science* **5**, 1-13.

Neto ILC, Martins FM, 2012. Anatomia dos órgãos vegetativos *Agave sisalana* Perrine ex Engelm (Agavaceae). *Revista Caatinga* **25**, 72-78.

O'Brien TP, Feder N, McCully ME, 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* **59**, 368-373.

O'Brien TP, McCully ME, 1981. The study of plant structure principles and select methods. Melbourne: Termarcarphi Pty.

Paiva EAS, Machado SR, 2005. Role of intermediary cells in *Peltodon radicans* (Lamiaceae) in the transfer of calcium and formation of calcium oxalate crystals. *Brazilian Archives of Biology and Technology* **48**, 147-153.

Pascholati SF, 2011. Fisiologia do parasitismo: Como as plantas se defendem dos patógenos. In: Amorim L, Rezende JAM, Bergamin Filho A, eds. Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos. São Paulo, Brasil: Agronômica Ceres, 593-633.

Pomar F, Novo M, Bernal MA, Merino F, Barcelo AR, 2004. Changes in stem lignins (monomer composition and crosslinking) and peroxidase are related with the maintenance of leaf photosynthetic integrity during *Verticillium* wilt in *Capsicum annuum*. *New Phytologist* **163**, 111-123.

Prychid C, Rudall PJ, 1999. Calcium Oxalate Crystals in Monocotyledons: A Review of their Structure and Systematics. *Annals of Botany*, **84**, 725–739.

Schwan-Estrada KRF, Stangarlin JR, Pascholati SF, 2008. Mecanismos bioquímicos de defesa vegetal. In: Pascholati SF, Leite B, Stangarlin JR, CIA P, eds. Interação Planta Patógeno: Fisiologia, Bioquímica e Biologia Molecular. Piracicaba, Brasil: FEALQ, 227-243.

Silva ORRF, Coutinho WM, Cartaxo WV *et al.*, 2008. Cultivo do Sisal no Nordeste Brasileiro. *Circular Técnica* **123**, 1-24.

Singh I, Singh VP, 2012. Blastospore/Chlamydospore as a Potential Character in Identification of Aflatoxin Producing and Non Producing Isolates of *Aspergillus flavus*. *Vegetos* **25**, 361-366.

Smith AH, Gill WM, Pinkard EA, Mohammed CL, 2007. Anatomical and histochemical defence responses induced in juvenile leaves of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus nitens* by *Mycosphaerella* infection. *Forest Pathology* **37**, 361– 373.

Sridharan G, Shankar AA, 2012. Toluidine blue: A review of its chemistry and clinical utility. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology* **16**, 251-255.

Stangarlin JR, Kuhn OJ, Toledo MV, Portz RL, Schwan-Estrada KRF, Pascholati SF, 2011. A defesa vegetal contra fitopatógenos. *Scientia Agraria Paranaensis* **10**, 18-46.

Uloth MB, Clode PL, You MP, Barbetti MJ, 2015. Cristais de oxalato de cálcio: Componente Integral do *Sclerotinia sclerotiorum* / *Brassica carinata* Pathosystem. *PLoS ONE* **10**.

VanderMolen GE, Beckman CH, Rodehorst E, 1987. The ultrastructure of tylose formation in resistant banana following inoculation with *Fusarium oxysporum* f.sp . *cubense*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **31**, 185-200.

Xu L, Zhu L, Tu L *et al.*, 2011. Lignin metabolism has a central role in the resistance of cotton to the wilt fungus *Verticillium dahliae* as revealed by RNA-Seq-dependent transcriptional analysis and histochemistry. *Journal of Experimental Botany* **62**, 5607–5621.

Wang M, Sun Y, Sun G *et al.*, 2015. Water balance altered in cucumber plants infected with *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*. *Scientific Reports*, **5**, 1-7.

Yeung EC, 1999. The use of histology in the study of plant tissue culture systems—Some practical comments. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, **35**, 137–143.

## Legendas das figuras

**Figura 1.** *A. sisalana* Perrine - Secção transversal (A, B, C e E) e secção longitudinal (D) do caule. Visão geral do parênquima e distribuição dos feixes vasculares (A). Células do parênquima (B). Visão de um feixe vascular (C e D). Célula idioblástica contendo cristais (E). Abreviaturas: be= bainha esclerenquimática; cr= cristais; ph= floema; vb= feixe vascular; i= idioblasto; p= parênquima; x= xilema. Escalas: 150  $\mu$ m (A); 30  $\mu$ m (B) 60  $\mu$ m (C, D); 15  $\mu$ m (E).

**Figura 2.** *Agave sisalana* Perrine - Secção transversal (B, C, D e G) e secção longitudinal (A, E, F, H, I, J, K, L, M e N) do caule com a podridão vermelha. A- Córtex apresentando células doentes. B-Vista geral do cilindro vascular com células doentes (Barra), sadias (asterisco) e com aumento da parede celular (seta). C- Células apresentando aumento da parede celular (seta). D, E- visão de um feixe vascular com células doentes e vasos obliterados. F, G- Cristais em célula do parênquima. H- Hifas do patógeno nos elementos de vaso (seta). I- Hifa em espaços intercelulares (seta). J, K, L- Hifas nos espaços intracelulares (setas). M, N- Estruturas de resistência do patógeno (setas). Abreviaturas: co= Córtex; fl= floema; i= idioblasto; p= parênquima; x = xilema; vb= feixe vascular. Escalas: 150  $\mu$ m (B); 30  $\mu$ m (A, C, D, E); 15  $\mu$ m (F, G); 1  $\mu$ m (H, I, J, K, L, M, N).

**Figura 3.** Caracterização histoquímica de *A. sisalana* sadia e com a podridão vermelha. Secção transversal (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M) e secção longitudinal (N). Vista geral de um cilindro vascular de uma planta sadia e sem coloração (A). Vista geral do cilindro vascular de uma planta doente e sem coloração (B). Feixe vascular (C) e idioblasto (D) apresentando pigmentação avermelhada. Reação positiva para compostos fenólicos no parênquima (E), feixe vascular (F) e idioblasto (G). Reação positiva para lignina (H, I e J). No indivíduo sadio, a reação foi positiva apenas nas células do xilema (H). No indivíduo doente, todas as células sadias do parênquima reagiram positivamente para detecção de lignina (asterisco) (I e J), enquanto as células com a doença foram negativas ao teste (seta) (I). Reação positiva para polissacarídeos com PAS (K, L, M e N). Reação positiva em todas as células do parênquima com destaque para os espaços intercelular (seta) (K e L) e os elementos de vaso do xilema (seta) (M e N). Abreviaturas: fl= floema; i= idioblasto; p= parênquima; vascular x = xilema; vb= feixe. Escalas: 150  $\mu$ m (A, B); 60  $\mu$ m (E, I, K); 30  $\mu$ m (C, F, H, M, N); 15  $\mu$ m (D, G, J, L).

Figura 1

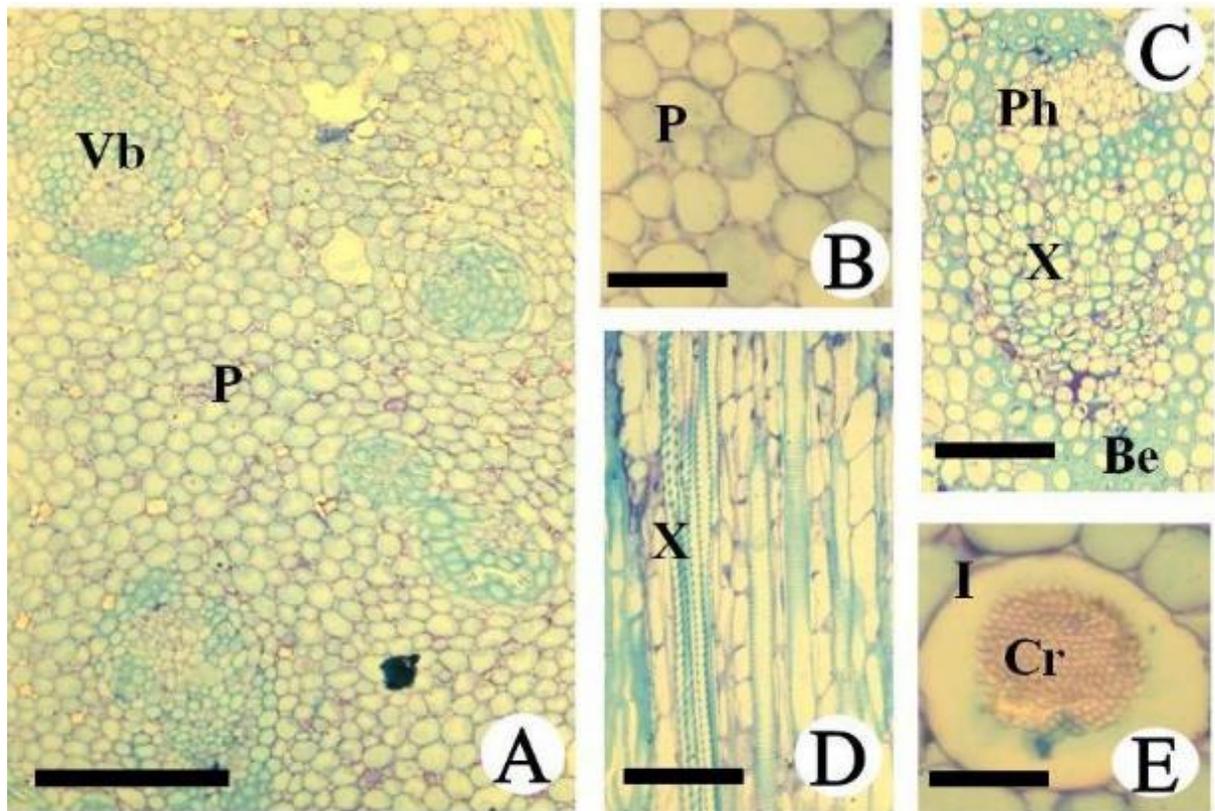


Figura 2

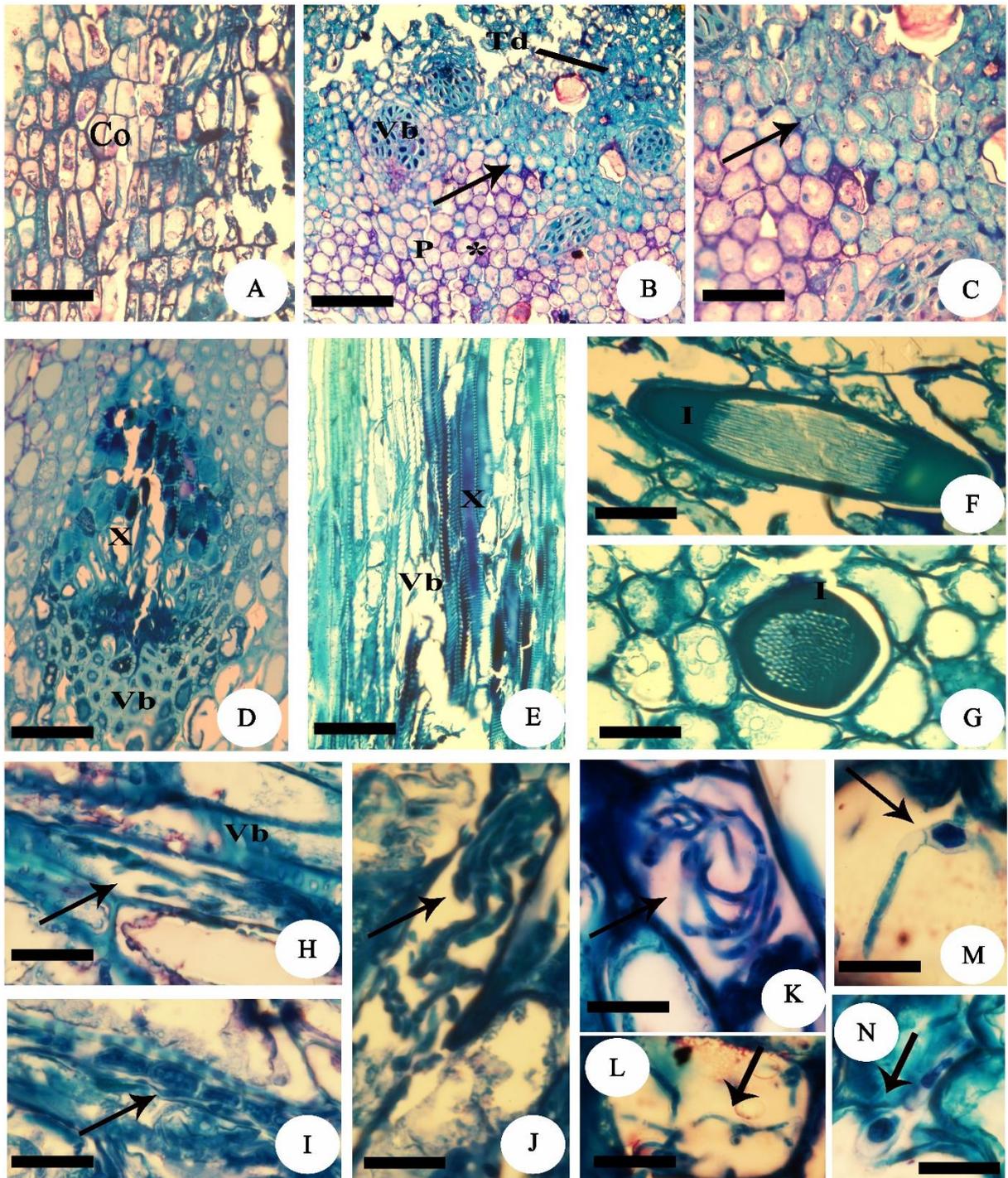
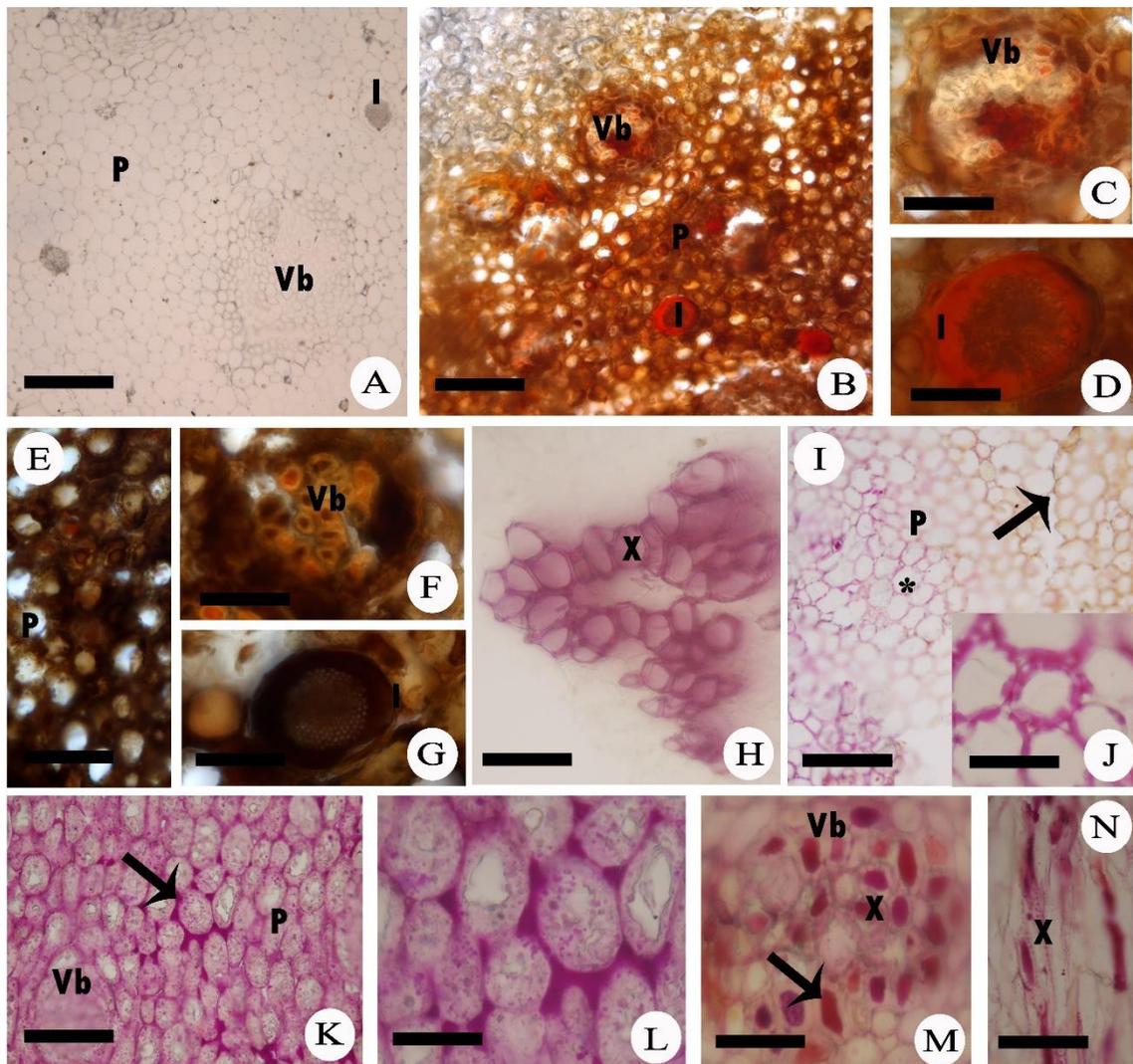


Figura 3



## ARTIGO 3

*Trichoderma* spp. **NO CONTROLE DA PODRIDÃO VERMELHA DO SISAL:  
ESTUDOS HISTOLÓGICOS E MECANISMOS DE AÇÃO**

---

<sup>1</sup>Artigo a ser ajustado nas normas do Comitê Editorial do periódico científico.

## *Trichoderma* spp. NO CONTROLE DA PODRIDÃO VERMELHA DO SISAL: ESTUDOS HISTOLÓGICOS E MECANISMOS DE AÇÃO

**Resumo:** A podridão vermelha causada pelo *Aspergillus welwitschiae* tem sido um fator limitante para a sustentabilidade e expansão da cultura do sisal no Brasil. Este trabalho teve como objetivos: i) avaliar o antagonismo de isolados de *Trichoderma* spp. sobre o *A. welwitschiae*; ii) avaliar o controle da podridão vermelha em plantas de sisal e iii) estudar a interação entre *Trichoderma* - *A. welwitschiae* - *Agave sisalana* ao nível tecidual na planta. No pareamento das culturas, os isolados *T. harzianum* (TCS1, TCS76 e TCS35), *T. koningii* (R39,) *T. piluliferum*; (R72) e *T. aureoviride* (R78) inibiram acima de 70% o crescimento micelial de *A. welwitschiae*. Os metabolitos voláteis dos *Trichoderma* spp. inibiram entre 50-66% o diâmetro do patógeno. A esporulação de *A. welwitschiae* foi menor na presença dos metabolitos voláteis dos isolados *T. harzianum* (TCS35), *T. asperellum* (TCS83), *T. virens* (R62), *T. viride* (R75) e *T. aureoviride* (R78). Os metabolitos não voláteis de *T. harzianum* (F12) destacaram-se na inibição da germinação de esporos (97%), o crescimento micelial (80%) e esporulação ( $2,03E+07$  conídios.ml<sup>-1</sup>). As mudas de sisal tratadas com os isolados *T. longibrachiatum* (TCS15), *T. harzianum* (TCS76, TCS35, R74 e F12), *T. asperellum* (TCS81, TCS83 e TCS85), *T. virens* (R62), *T. viride* (R75) e *T. piluliferum* (F130) apresentaram redução da incidência da podridão vermelha variando de 70 a 93% e redução de 97% na severidade da doença. Os cortes histológicos das mudas de sisal evidenciaram que não houve progresso da doença nos tecidos do caule, devido à lignificação de células parenquimáticas. Hifas, conidióforos e conídios dos isolados *T. longibrachiatum* (TCS15), *T. virens* (TCS43), *T. harzianum* (TCS35,) *T. asperellum* (TCS81 e TCS85), *T. viride* (R75) e *T. piluliferum* (F130) foram observados nos tecidos caulinares. Os isolados de *Trichoderma* spp. induziram respostas de defesa no tecido do caule do sisal e inibiram o crescimento de *A. welwitschiae*, sendo promissores agentes de biocontrole e podem ser formulados e avaliados em campo para o controle da podridão vermelha do sisal.

**Palavras-chave:** *A. welwitschiae*, Mecanismos de defesa, Histologia, Lignificação

## *Trichoderma* spp. IN THE CONTROL OF SISAL BOLE ROT DISEASE: HISTOLOGICAL STUDIES AND ACTION MECHANISMS

**ABSTRACT:** Sisal bole rot disease caused by *Aspergillus welwitschiae* has been a limiting factor for the sustainability and expansion of sisal culture in Brazil. This work aimed at: i) evaluating the antagonism of *Trichoderma* spp. on *A. welwitschiae*; ii) evaluating the control of bole rot disease in sisal plants and iii) studying the interaction between *Trichoderma* - *A. welwitschiae* - *Agave sisalana* at the plant tissue level. In culture pairing, isolates *T. harzianum* (TCS1, TCS76 e TCS35), *T. koningii* (R39,) *T. piluliferum*; (R72) and *T. aureoviride* (R78) inhibited above 70% the mycelial growth of *A. welwitschiae*. The volatile metabolites of *Trichoderma* spp. inhibited between 50-66% the diameter of pathogen. The sporulation of *A. welwitschiae* was lower in the presence of the volatile metabolites of isolates *T. harzianum* (TCS35), *T. asperellum* (TCS83), *T. virens* (R62), *T. viride* (R75) and *T. aureoviride* (R78). The non-volatile metabolites of *T. harzianum* (F12) caused the inhibition of spore germination (97%), mycelium growth (80%), and sporulation ( $2.03E+07$  conidia.ml<sup>-1</sup>). Plants treated with *T. longibrachiatum* (TCS15), *T. harzianum* (TCS76, TCS35, R74 e F12), *T. asperellum* (TCS81, TCS83 e TCS85), *T. virens* (R62), *T. viride* (R75) and *T. piluliferum* (F130) showed a reduction in the incidence of bole rot disease ranging from 70 to 93% and a reduction of 97% in disease severity. The histological sections of the sisal bulbils evidenced that there was no progress of the disease in the stem tissues, because of lignification of the parenchyma cells. Hyphae, conidiophores and conidia of isolates *T. longibrachiatum* (TCS15), *T. virens* (TCS43), *T. harzianum* (TCS35), *T. asperellum* (TCS81 e TCS85), *T. viride* (R75) and *T. piluliferum* (F130) were observed in stem tissue. The isolates of *Trichoderma* spp. induce defensive responses in sisal stem tissue and inhibit growth of *A. welwitschiae*, being promising agents of biocontrol and can be formulated and evaluated in the field for control of sisal bole rot disease.

**Key words:** *A. welwitschiae*, Defense Mechanisms, Histology, Lignification.

## Introdução

O sisal (*Agave sisalana* Perrine) é uma planta suculenta perene de folhas grandes, as quais são inseridas diretamente no caule em forma de espiral (SILVA et al., 2008). A planta é originária de regiões áridas e semiáridas do México e seu cultivo é voltado principalmente para a extração da fibra das folhas (SILVA et al., 2008; COLEMAN-DERR et al., 2016). A fibra do sisal é categorizada como dura e é destinada para a indústria têxtil (cordas, cordéis, fios e tapetes), sendo também usada na confecção de artesanato, na construção civil e na indústria de papel (GUTIÉRREZ et al., 2008; BASU et al., 2012; SENTHILKUMAR et al., 2018; NAVEEN et al., 2019).

Dentre os países produtores de sisal, o Brasil destaca-se como o maior produtor mundial com área cultivada de 84,861 hectares e produção de 79,629 toneladas em 2017, correspondendo a 40% de toda a produção mundial (FAOSTAT, 2019). No Brasil, o cultivo do sisal concentra-se na região Nordeste, com destaque para o Estado da Bahia com 120,000 hectares de área plantada e 95,3% da produção nacional em 2017 (IBGE, 2017). Em geral, a cultura do sisal é explorada em áreas de pequenos produtores, com predomínio de mão de obra familiar e sendo considerada em muitos casos, como a única cultura capaz de oferecer resultados econômicos satisfatórios nas condições edafoclimáticas do semiárido baiano (SILVA et al., 2008).

A podridão vermelha do sisal causada pelo fungo *Aspergillus welwitschiae*, tem sido o principal problema fitossanitário da cultura durante décadas, contribuindo para redução da área plantada e conseqüentemente produção de fibra (MEDINA, 1954; COUTINHO et al., 2006; ABREU, 2010; DUARTE et al., 2018). No Brasil, a podridão vermelha tem sido reportada em todas as áreas produtoras de sisal (ABREU, 2010) com incidência variando entre 5-40% (COUTINHO et al., 2006; ABREU, 2010).

O *A. welwitschiae* é considerado um parasita fraco por depender de condições de estresse ou injúria da planta para infectá-la e causar a patologia (COUTINHO et al., 2006; DUARTE et al., 2018; SILVA et al., 2008). Cortes histológicos do caule de sisal com podridão vermelha evidenciaram que o *A. welwitschiae* além de colonizar as células paranquimáticas também afeta os

feixes vasculares com degradação dos elementos de vaso, resultando em sintomas externos como amarelecimento e murchamento das folhas (DUARTE et al., 2018). Com o progresso da doença, o caule é completamente apodrecido, causando o tombamento e a morte da planta.

Até o presente momento não existe nenhum produto registrado para o controle dessa doença. O manejo desta cultura sem aporte tecnológico em termos de manejo e conservação de solo, uso de mudas com qualidade genética e fitossanitária, juntamente com o monocultivo tem contribuído para o aumento da podridão vermelha nas áreas produtoras de sisal. Dessa forma, devido à importância socioeconômica do sisal, métodos de controle para a podridão vermelha no sisal são imprescindíveis para a sustentabilidade e expansão dessa cultura.

O controle biológico pode ser uma estratégia de controle eficaz para a podridão vermelha do sisal, pois além dos agentes microbianos apresentarem diferentes mecanismos de controle como antibiose, micoparasitismo e competição, estes têm baixa toxicidade e podem proporcionar outros benefícios para a planta hospedeira como a indução de resistência, promoção de crescimento e tolerância a estresses abióticos (ROATTI et al., 2013; VERMA et al., 2007; ZAIDI et al., 2014). Para patógenos de solo e que sobrevivem em restos de cultura, o controle biológico tem sido um método com resultados positivos e recomendados (GAVA e MENEZES, 2012; LOBO JÚNIOR et al., 2009), pois os agentes de biocontrole podem atuar sobre os patógenos e também atacar suas estruturas de resistências (MELO, 1996).

Especies do gênero *Trichoderma* são os agentes de biocontrole mais estudados contra fitopatógenos e estima-se que mais de 60 % dos biofungicidas registrados mundialmente são à base de *Trichoderma* (VERMA et al., 2007). As espécies desse gênero de fungo são geralmente habitantes saprófitas do solo, mas também podem ocorrerem como simbiontes nos diferentes órgãos de plantas (HARMAN et al., 2004; MUKHERJEE et al., 2012). Dependendo da espécie, o *Trichoderma* sp. pode ter um ou mais mecanismos de ação contra o patógeno, como a produção de toxinas (antifúngicos, quitinases), micoparasitismo (enrolamento, penetração e dissolução do citoplasma de hifas de patógenos), indução de mecanismos de defesa do hospedeiro, ou sucesso na competição por

nutrientes e espaço na rizosfera e/ou na planta (HARMAN et al., 2004; HOWELL, 2003; ROATTI et al., 2013). O *Trichoderma* spp. também pode colonizar os tecidos externos e/ou internos das raízes (MUKHERJEE et al., 2012) e outros órgãos da planta, como endolíticos (DRUZHININA et al., 2011).

Estudos *in vitro* e *in vivo* realizados por Sá (2009 e 2013) selecionaram isolados de *Trichoderma* spp. com potencial para o controle da podridão vermelha do sisal. Dessa forma, este trabalho teve como objetivos: i) avaliar o antagonismo de isolados de *Trichoderma* spp. sobre o *A. welwitschiae*; ii) avaliar o controle da podridão vermelha em plantas de sisal e iii) estudar a interação entre *Trichoderma* - *A. welwitschiae* – *A. sisalana* ao nível tecidual na planta.

## **Material e métodos**

### **Isolados de *Trichoderma* spp. e *A. welwitschiae***

Dezoito isolados de *Trichoderma* spp. de diferentes nichos ecológicos e um isolado de *A. welwitschiae* (A1P1) foram obtidos da coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia Agrícola da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia-UFRB (Tabela 1).

**Tabela 1.** Isolados de *Trichoderma* spp. e *A. welwitschiae*, identificação (morfológica e molecular), origem e nicho ecológico

Isolados	Identificação	Origem	Nicho ecológico
TCS1 <sup>1</sup>	<i>Trichoderma harzianum</i>	Campo Formoso/Ba	Solo/próximo de raízes de sisal
TCS6 <sup>1</sup>	<i>T. harzianum</i>	Campo Formoso/Ba	Solo/próximo de raízes de sisal
TCS15 <sup>1</sup>	<i>T. longibrachiatum</i>	Campo Formoso/Ba	Solo/próximo de raízes de sisal
TCS43 <sup>1</sup>	<i>T. virens</i>	Retirolândia/Ba	Solo/próximo de raízes de sisal
TCS35 <sup>1</sup>	<i>T. harzianum</i>	Araci/Ba	Solo/próximo de raízes de sisal
TCS76 <sup>1</sup>	<i>T. harzianum</i>	Valente/Ba	Solo/próximo de raízes de sisal
TCS81 <sup>2</sup>	<i>T. asperellum</i>	Bom Jesus da Lapa/Ba	Solo/próximo de raízes de bananeira
TCS83 <sup>2</sup>	<i>T. asperellum</i>	Bom Jesus da Lapa/Ba	Solo/próximo de raízes de bananeira
TCS85 <sup>2</sup>	<i>T. asperellum</i>	Bom Jesus da Lapa/Ba	Solo/próximo de raízes de bananeira
R39 <sup>3</sup>	<i>T. koningii</i>	Conceição do Coité/Ba	Raiz/sisal sadio
R62 <sup>3</sup>	<i>T. virens</i>	Conceição do Coité/Ba	Raiz/sisal sadio
R72 <sup>3</sup>	<i>T. piluliferum</i>	Conceição do Coité/Ba	Raiz/sisal sadio
R74 <sup>3</sup>	<i>T. harzianum</i>	Conceição do Coité/Ba	Raiz/sisal sadio
R75 <sup>3</sup>	<i>T. viride</i>	Conceição do Coité/Ba	Raiz/sisal sadio
R78 <sup>3</sup>	<i>T. aureoviride</i>	Conceição do Coité/Ba	Raiz/sisal sadio
C153 <sup>3</sup>	<i>T. piluliferum</i>	Conceição do Coité/Ba	Caule/sisal sadio
F12 <sup>3</sup>	<i>T. harzianum</i>	Conceição do Coité/Ba	Folha/sisal sadio
F130 <sup>3</sup>	<i>T. piluliferum</i>	Conceição do Coité/Ba	Folha/sisal sadio
A1P1 <sup>4</sup>	<i>Aspergillus welwitschiae</i>	Conceição do Coité/Ba	Caule/sisal doente

<sup>1</sup>Identificação molecular realizada por Sá (2013); <sup>2</sup>Identificação molecular realizada por Mascarenhas (2016); <sup>3</sup>Identificação morfológica; <sup>4</sup>Identificação morfológica e molecular conforme Duarte et al. (2018).

### Preparo da suspensão de esporos de *Trichoderma* spp. e *A. welwitschiae*

Os isolados de *Trichoderma* spp. e o *A. welwitschiae* (A1P1) foram cultivados em placa de Petri (90 mm de diâmetro) contendo meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA) durante oito dias na temperatura de 28 °C. A suspensão de esporos foi preparada com a adição de 20 mL de água destilada esterilizada e duas gotas de Tween 20® na placa e a cultura foi raspada com alça de Drigalsky. A concentração de esporos foi calculada com base na contagem em

câmara de Neubauer e foi ajustada por diluição seriada para  $1 \times 10^5$  conídios  $\text{ml}^{-1}$  (BARBOSA et al., 2018).

### **Pareamento de cultura entre *A. welwitschiae* e os isolados de *Trichoderma* spp.**

O pareamento de cultura foi realizado em placas de Petri (90 mm de diâmetro) contendo o meio BDA. Em cada placa foi inoculado 5  $\mu\text{l}$  da suspensão de esporos de *Trichoderma* spp. e 5  $\mu\text{l}$  da suspensão de esporos de *A. welwitschiae*. As suspensões foram depositadas em lados opostos e numa distância de aproximadamente 1,0 cm da borda da placa. O tratamento controle foi constituído de placas contendo apenas o *A. welwitschiae*, colocado em um lado da placa e na mesma distância da borda. O experimento foi mantido em incubadora tipo BOD em escuro contínuo e na temperatura de 28°C. O diâmetro da colônia de *A. welwitschiae* em todos os tratamentos foi mensurado, quando o diâmetro do tratamento controle atingiu 9 cm (a aborda da placa). Os dados do diâmetro foram utilizados para calcular a porcentagem de inibição (PI), com a equação descrita por Sundaramoorthy et al. (2012):  $PI = [(diâmetro da testemunha - diâmetro do tratamento) / diâmetro da testemunha] \times 100$ . O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 19 tratamentos e cinco repetições.

### **Avaliação dos mecanismos de ação dos isolados de *Trichoderma* spp. sobre *A. welwitschiae***

A avaliação dos mecanismos de ação dos isolados de *Trichoderma* spp. no controle de *A. welwitschiae* foi realizada conforme a metodologia descrita anteriormente, exceto que neste bioensaio observou-se a formação de halo de inibição e o crescimento dos isolados de *Trichoderma* spp.. Para avaliação do micoparasitismo dos isolados de *Trichoderma* spp. sobre o *A. welwitschiae* foram colocadas duas lamínulas esterilizadas entre as colônias. Após o crescimento das colônias e o contato entre os fungos, as lamínulas foram retiradas e transferidas para lâminas microscópicas contendo uma gota de lactoglicerol azul. As

estruturas dos fungos e a presença de micoparasitismo pelos isolados de *Trichoderma* spp. foram observados em microscópio óptico no aumento de 100X. O delineamento foi o inteiramente casualizado com três repetições por tratamento.

### **Efeito dos compostos voláteis dos isolados de *Trichoderma* spp. sob o crescimento e esporulação de *A. welwitschiae*.**

A avaliação dos compostos voláteis produzidos pelos isolados de *Trichoderma* spp. com ação antagonista à *A. welwitschiae* foi realizada conforme a metodologia descrita por Guimarães et al. (2016). Em placas de Petri (90 mm de diâmetro) com meio DBA foi inoculado 5 µl da suspensão de esporos de *Trichoderma* spp.. A tampa desta placa de Petri foi substituída pela base de outra placa contendo o mesmo meio e 5 µl da suspensão de *A. welwitschiae*. O tratamento controle foi constituído apenas pelo *A. welwitschiae* em uma das bases. As bases das placas foram unidas e vedadas com parafilme e o ensaio foi mantido em incubadora tipo BOD em escuro contínuo e na temperatura de 28 °C, por dez dias. Após o período de incubação avaliou-se o diâmetro e a esporulação das colônias de *A. welwitschiae*. O diâmetro foi mensurado com uma régua milimétrica. A avaliação da esporulação ocorreu conforme a metodologia descrita na preparação da suspensão de esporos, sendo determinada com base na contagem em câmara de Neubauer e os dados foram expressos em conídeos.mL<sup>-1</sup> e conídeos por cm<sup>2</sup> da colônia do fungo. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 19 tratamentos e três repetições.

### **Metabolitos não voláteis de *Trichoderma* spp. e o efeito sobre *A. welwitschiae***

Avaliou-se o efeito dos compostos não voláteis de *Trichoderma* spp. no crescimento e esporulação de *A. welwitschiae* com a metodologia descrita por Guimarães et al. (2016). Para o preparo dos filtrados das culturas de *Trichoderma* spp., foram transferidos cinco discos de ágar (5 mm) contendo micélio e conídios de *Trichoderma* spp. para frascos de Erlenmeyer com 250 mL de meio BD (Batata-Dextrose) e estes foram incubados a 28°C por sete dias sob agitação orbital (120 rpm). Após o período de incubação, as culturas foram filtradas em

filtro de papel (espessura: 0,20 mm; velocidade de filtração: 27 s e retenção de partículas: 4-7  $\mu\text{m}$ ) e centrifugadas a 2550 rpm por três minutos para remoção das células fungicas. Desse filtrado, 15 mL foram misturados com 45 mL de meio BDA, essa mistura foi homgenizada por agitação manual e foi distribuída em placas de Petri (90 mm de diâmetro). Para o tratamento controle foram adicionados 15 mL de água destilada esterilizada aos 45 mL de BDA. No centro de cada placa foi inoculado 5  $\mu\text{l}$  da suspensão de esporos de *A. welwitschiae*. As placas foram mantidas em BOD em escuro contínuo e na temperatura de 28 °C durante oito dias. A avaliação do diâmetro e esporulação das colônias ocorreu conforme descrito na metodologia para compostos voláteis. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 19 tratamentos e quatro repetições.

O efeito dos filtrados na germinação de esporos de *A. welwitschiae* também foi avaliado. O experimento foi montado em placa de ELISA, com 100  $\mu\text{l}$  de suspensão de esporos de *A. welwitschiae* ( $1 \times 10^5$  conídios  $\text{ml}^{-1}$ ), 100  $\mu\text{l}$  de filtrado de *Trichoderma* spp. e 50  $\mu\text{l}$  do meio líquido BD (Batata Dextrose) em cada poço (MAGALHÃES et al., 2017). O tratamento controle consistiu em 100  $\mu\text{l}$  de suspensão de esporos de *A. welwitschiae* e 150  $\mu\text{l}$  do meio BD. As placas foram mantidas em BOD em escuro contínuo e na temperatura de 28 °C por 24h. Após esse período, o tratamento controle foi avaliado e quando este apresentou mais de 70% dos esporos germinados, adicionou-se 5  $\mu\text{l}$  de lactofenol azul em todos os tratamentos, paralisando a germinação de esporos. A avaliação ocorreu por meio de montagem de lâminas com a suspensão de esporos retirada dos poços da placa ELISA e contagem aleatória de 100 esporos em microscópio de luz com aumento de 40X. Considerou-se como esporo germinado aquele cujo tubo germinativo foi o dobro do diâmetro do esporo. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 19 tratamentos e sete repetições (cada poço foi considerado uma repetição).

## **Controle da podridão vermelha do sisal em condições de casa de vegetação**

### **Produção das mudas de sisal**

Mudas de sisal foram produzidas a partir de bulbilhos coletados em áreas produtoras no município de Conceição do Coité-BA. Os bulbilhos foram inicialmente plantados em bandejas de plástico contendo solo e mantidos em casa de vegetação por 60 dias, com irrigações periódicas. Após esse período, foram transplantados para sacos de mudas (18x24 cm) contendo 2 L de solo e permaneceram em casa de vegetação por 120 dias com irrigação periódica até atingirem a altura de 28 a 30 cm.

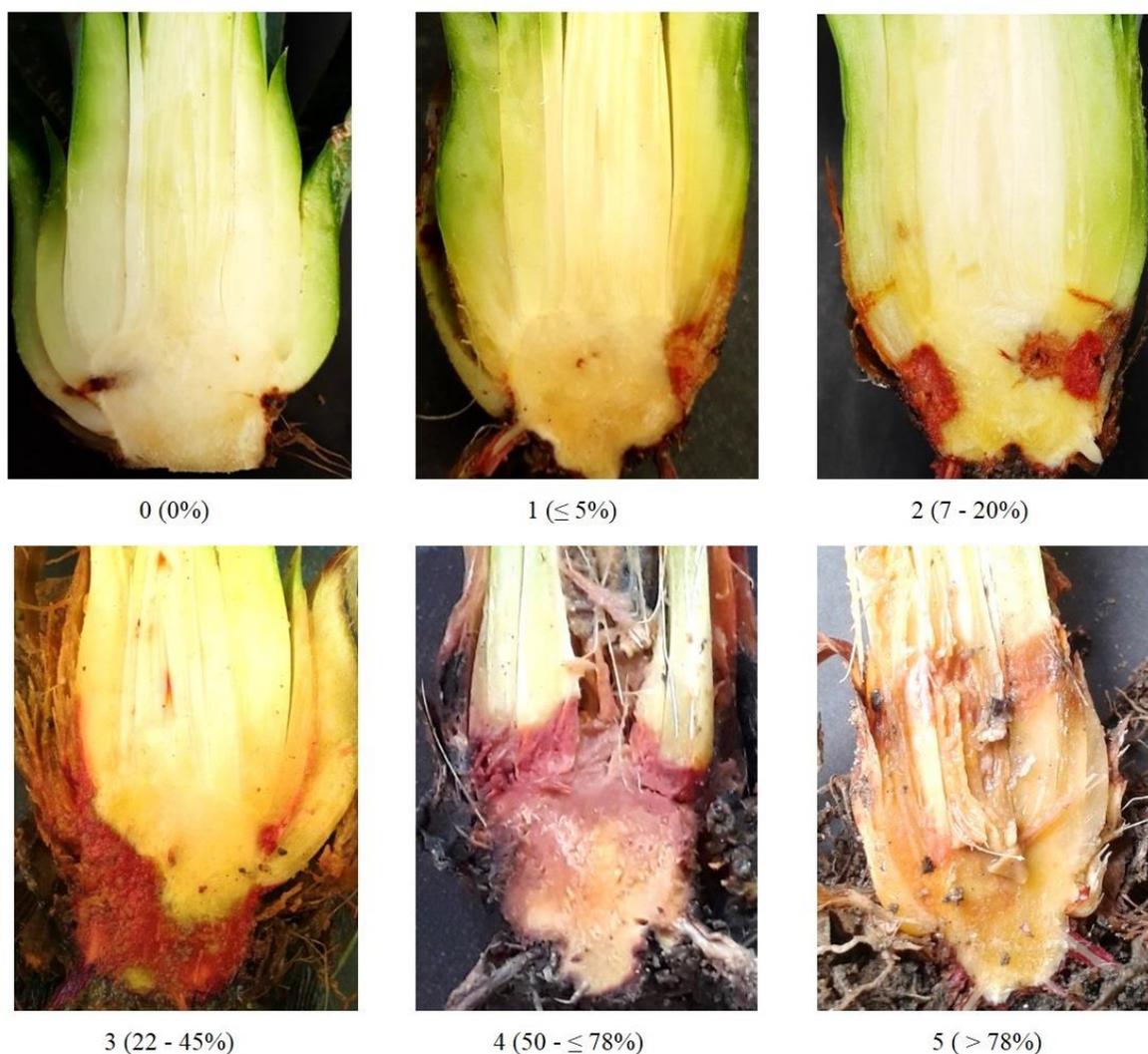
### **Instalação do experimento**

O experimento foi instalado na casa de vegetação (12° 39' 41" S e 39° 5' 12" W) do Centro de Ciências Agrárias Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, campus de Cruz das Almas, Bahia. A temperatura média durante o experimento foi de 24,4 °C noturna e 28,9 °C diurna.

Antes da aplicação dos tratamentos, fez-se dois microfuros no caule das mudas com uma agulha hipodérmica (25 x 0,70 mm) esterilizada. Em cada ferimento transferiu-se 1 mL de suspensão de esporos de *Trichoderma* spp. ( $1 \times 10^7$  conídios  $\text{ml}^{-1}$ ), com uma micropipeta. Vinte e quatro horas após a aplicação dos isolados de *Trichoderma* spp., as mudas foram inoculadas no mesmo ferimento com 1 mL de suspensão de esporos de *A. welwitschiae* ( $1 \times 10^7$  conídios  $\text{ml}^{-1}$ ). Dois tratamentos controle foram adicionados ao experimento, sendo um tratamento constituído apenas da inoculação do *A. welwitschiae* (sem o *Trichoderma* spp.) e o outro composto pela aplicação de 1 mL de água destilada esterilizada (sem inoculação). O delineamento foi em blocos casualizados com 18 tratamentos e dois controles, com três repetições e 10 plantas em cada parcela experimental.

Trinta dias após a inoculação do patógeno, avaliou-se a incidência e severidade da doença. A incidência da doença foi avaliada com base na presença ou ausência de sintomas nas mudas de sisal. O cálculo da incidência foi feito com o número de plantas sintomáticas dividido pelo número total de plantas, obtendo-se os dados em porcentagem (%). Esses dados foram usados para o cálculo de eficiência de controle pela fórmula:  $\text{Eficiência} = \frac{[(\text{incidência da testemunha} - \text{incidência do tratamento}) / \text{incidência da testemunha}] \times 100$ . Para avaliação da

severidade, as plantas foram cortadas longitudinalmente e foi utilizada a escala de notas elaborada, conforme capítulo 1 (Figura 1) (dados não publicados). Os dados de severidade foram transformados para Índice da Doença, conforme a equação:  $\Sigma (\text{nota da escala de doença} * \text{frequência}) * 100 / (\text{número de avaliações} * \text{nota máxima da escala de doença})$  (MCKINNEY, 1923).



Nota	Descrição dos sintomas
0	Caule com lesão mecânica
1	Lesões iniciais no tecido do caule próximo ao tecido basal da folha, com cor castanho claro a avermelhado $\leq 5\%$ da área da haste lesionada
2	Podridão inicial no tecido basal da folha, crescendo em direção ao tecido do caule, com lesões de cor marrom claro a avermelhado, com 7-20% de área lesionada
3	Podridão do caule com lesões castanho claro a avermelhado no tecido basal da folha e no tecido do caule interno, com 22-45% da área lesionada
4	Podridão do caule, com lesões internas de marrom claro a avermelhado, atingindo todo o tecido central do caule e tecido meristemático foliar, com 50 - $\leq 78\%$ da área lesionada
5	Morte da planta, com podridão completa do caule de cor castanho claro

**Figura 1.** Escala de notas para avaliação da severidade da podridão vermelha de mudas de sisal (*Agave sisalana*)

### **Histologia das mudas de sisal tratadas com *Trichoderma* spp.**

Fragmentos de caule de sisal tratado com *Trichoderma* spp. e inoculadas com *A. welwitschiae* e fragmentos de caule sem inoculação (aplicação de água destilada esterilizada) foram fixados em FAA 70 (Formaldeído 37%; Álcool etílico 70%; Ácido Acético Glacial, 0,5: 0,5: 9 v/v/v) por 24 horas (JOHANSEN, 1940), submetidas a vácuo durante o processo de fixação e conservadas em álcool etílico 70%. As amostras foram desidratadas em série etílica e inseridas em 2-hidroxietilmeta-acrilato (historresina-Leica) segundo Meira e Martins (2003). Em seguida, secções transversais e longitudinais com espessura variável (10 - 12 µm) foram obtidas em micrótomo rotativo (Leica RM2245). Os cortes foram corados com uma dupla coloração com azul de toluidina e fucsina básica (JUNQUEIRA, 1990). As lâminas foram montadas com resina sintética (Permount/Fisher).

As lâminas foram visualizadas em microscópio (Olympus BX51) acoplado ao sistema fotográfico digital (Olympus A330). As alterações anatômicas nos tecidos de caule das mudas de sisal tratadas com *Trichoderma* spp. e inoculadas com *A. welwitschiae* foram fotodocumentadas e comparadas com a anatomia das mudas sem inoculação. As escalas das figuras foram obtidas através da projeção de uma lâmina micrométrica fotografada/digitalizada nas mesmas condições ópticas das ilustrações.

Não foi possível realizar a análise histológica do caule das mudas inoculadas apenas com o *A. welwitschiae*, pois ao final do experimento, apresentavam-se totalmente apodrecido.

### **Análise de dados**

Os dados foram avaliados quanto à normalidade e homogeneidade de variância usando os testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Os tratamentos sem variabilidade foram excluídos das análises. Os dados de diâmetro (pareamento de cultura) e esporulação (voláteis e não voláteis) foram transformados para log e, os dados de germinação de esporos foram transformados em raiz quadrada para alcançarem a normalidade. No entanto, os resultados foram apresentados como valores não transformados. Os dados foram

submetidos à análise de variância pelo teste F e para o caso de diferença significativa entre os tratamentos, as médias foram comparadas com o teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ) e as análises foram realizadas utilizando o pacote estatístico R v. 3.0.2 (R Core Team 2016).

## Resultados

### **Pareamento de cultura e mecanismos de biocontrole de *Trichoderma* spp. sobre *A. welwitschiae***

Os isolados de *Trichoderma* spp. inibiram significativamente ( $p < 0,01$ ) o crescimento micelial de *A. welwitschiae* no pareamento das culturas (Tabela 2). Houve destaque para os isolados *T. harzianum* (TCS1, TCS76 e TCS35), *T. koningii* (R39), *T. piluliferum* (R72) e *T. aureoviride* (R78) por inibirem o diâmetro da colônia de *A. welwitschiae* em aproximadamente 72 %. Neste ensaio, o *T. harzianum* (F12) foi o isolado menos eficiente em inibir o crescimento micelial de *A. welwitschiae*, com inibição de 58 % (Tabela 2).

Nenhum isolado apresentou simultaneamente os três mecanismos de biocontrole (competição, antibiose e parasitismo) no pareamento das culturas. A maioria dos isolados de *Trichoderma* spp. (94%) apresentou a competição (nutriente e espaço) como o principal mecanismo de biocontrole (Tabela 2 e Figura 2). A maioria das colônias de *Trichoderma* ocupou todo o meio de cultura e também cresceram sobre a colônia do *A. welwitschiae* (Figura 2). Apenas o isolado *T. viride* (R75) inibiu o crescimento de *A. welwitschiae* por antibiose (formação de halo de inibição) (Tabela 2 e Figura 2).

As observações microscópicas da interação *in vitro* *Trichoderma* - *A. welwitschiae* evidenciaram que os isolados *T. harzianum* (TCS1 e TCS35), *T. koningii* (R39), *T. piluliferum* (R72) e *T. aureoviride* (R78) apresentaram micoparasitismos ao *A. welwitschiae* (Figura 3). A hifa do TCS1 cresceu envolvendo a hifa do patógeno (Figura 3A), enquanto que os isolados R39 e R72 causaram o estrangulamento da hifa do patógeno (Figura 3B e C). Os isolados

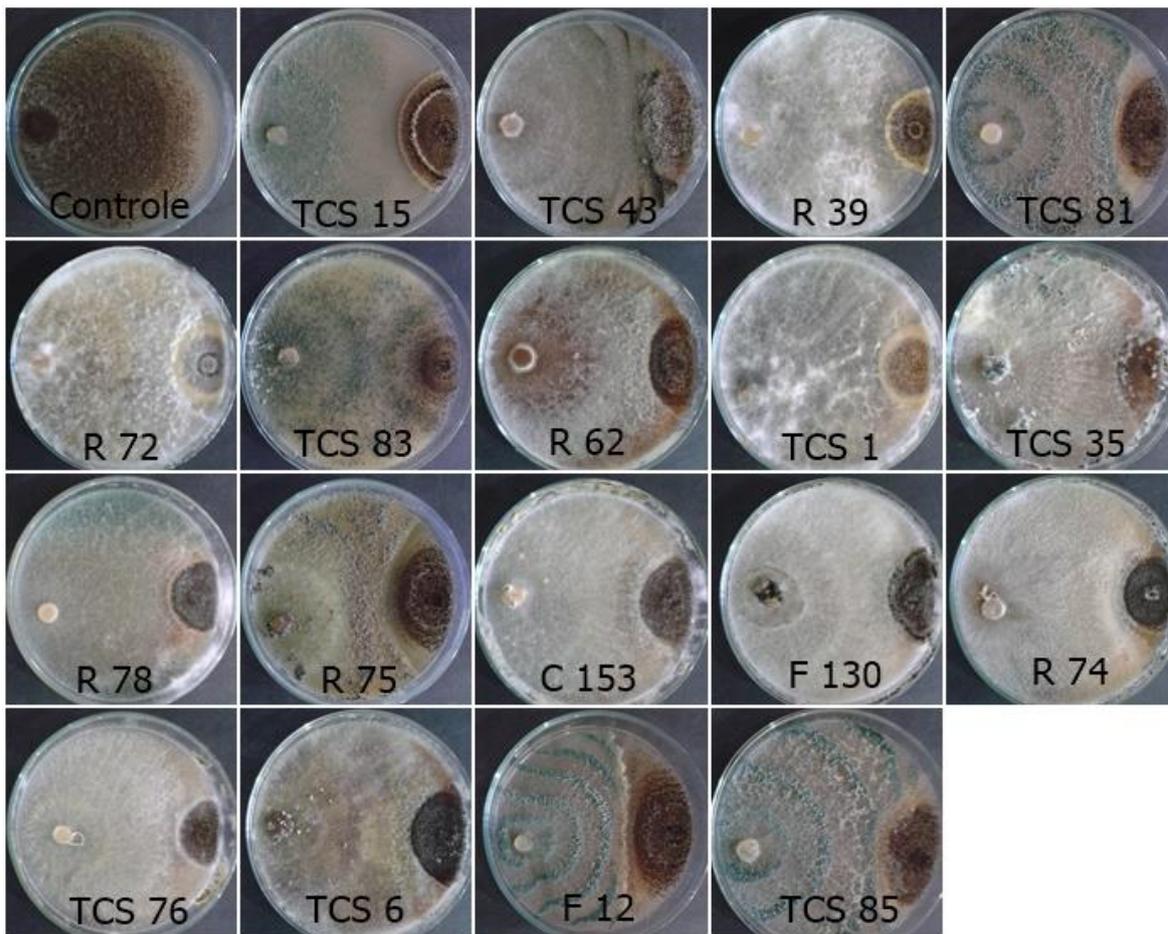
TCS35 e R78 apresentaram a formação de apressorios e penetraram a hifa do patógeno (Figura 3D e E).

**Tabela 2.** Diâmetro das colônias de *A. welwitschiae* e os mecanismos de biocontrole dos isolados de *Trichoderma* spp. no ensaio de pareamento das culturas.

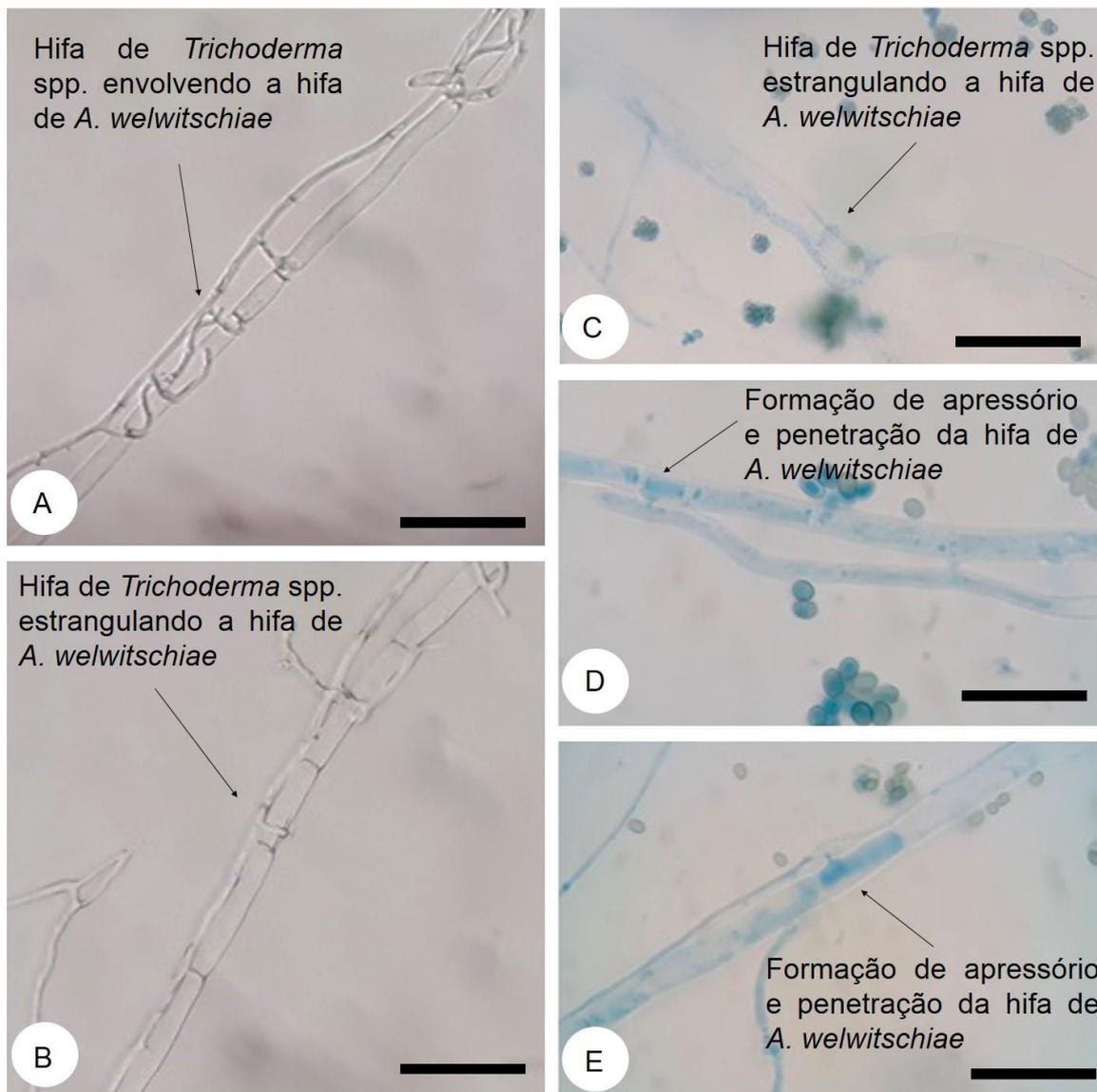
Tratamentos	Diâmetro (cm)		Mecanismo de biocontrole		
	da colônia de <i>A. welwitschiae</i>	PI (%) <sup>1</sup>	Competição	Antibiose	Parasitismo
TCS1	2,5 d	72,00	+	-	+
TCS6	2,6 c	70,89	+	-	-
TCS15	2,7 c	70,00	+	-	-
TCS43	2,7 c	70,22	+	-	-
TCS76	2,4 d	72,89	+	-	-
TCS35	2,4 d	73,11	+	-	+
TCS81	2,9 c	68,22	+	-	-
TCS83	2,7 c	70,44	+	-	-
TCS85	3,2 b	64,67	+	-	-
R39	2,4 d	73,56	+	-	+
R62	2,6 c	70,67	+	-	-
R72	2,5 d	71,78	+	-	+
R74	2,6 c	70,67	+	-	-
R75	3,1 b	66,00	-	+	-
R78	2,4 d	73,78	+	-	+
C153	2,6 c	71,56	+	-	-
F12	3,7 a	58,67	+	-	-
F130	2,7 c	69,78	+	-	-
Sem	9,0				

*Trichoderma*

<sup>1</sup>PI: Porcentagem de inibição calculada pela fórmula:  $PI = [(diâmetro da testemunha - diâmetro do tratamento) / diâmetro da testemunha] \times 100$  (Sundaramoorthy et al., 2012). Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de agrupamento de Scott-Knott ( $p \leq 0,01$ ). (-) negativo, (+) positivo.



**Figura 2.** Fotodocumentação da interação entre isolados de *Trichoderma* spp. e *A. welwitschiae* no pareamento das culturas.



**Figura 3.** Microfotografias da interação entre isolados de *Trichoderma* spp. e *A. welwitschiae* em microscópio de luz com aumento de 100X. (A) *T. harzianum* (TCS1) crescendo e envolvendo a hifa de *A. welwitschiae* (seta). (B) *T. koningii* (R39) e (C) *T. piluliferum* (R72) causando o estrangulamento da hifa do *A. welwitschiae* (seta). (D) *T. harzianum* (TCS35) e (E) *T. aureoviride* (R78) apresentaram formação de apressório e penetração da hifa de *A. welwitschiae* (seta). Escala: 20  $\mu$ m.

**Efeito dos compostos voláteis dos isolados de *Trichoderma* spp. no crescimento e esporulação de *A. welwitschiae*.**

Os metabolitos voláteis dos isolados de *Trichoderma* spp. inibiram entre 50 e 66% o crescimento micelial de *A. welwitschiae*. Todos os tratamentos diferiram significativamente ( $p \leq 0,01$ ) do controle (sem *Trichoderma*) que apresentou média de diâmetro da colônia de 8,93 cm (Tabela 3 e Figura 4).

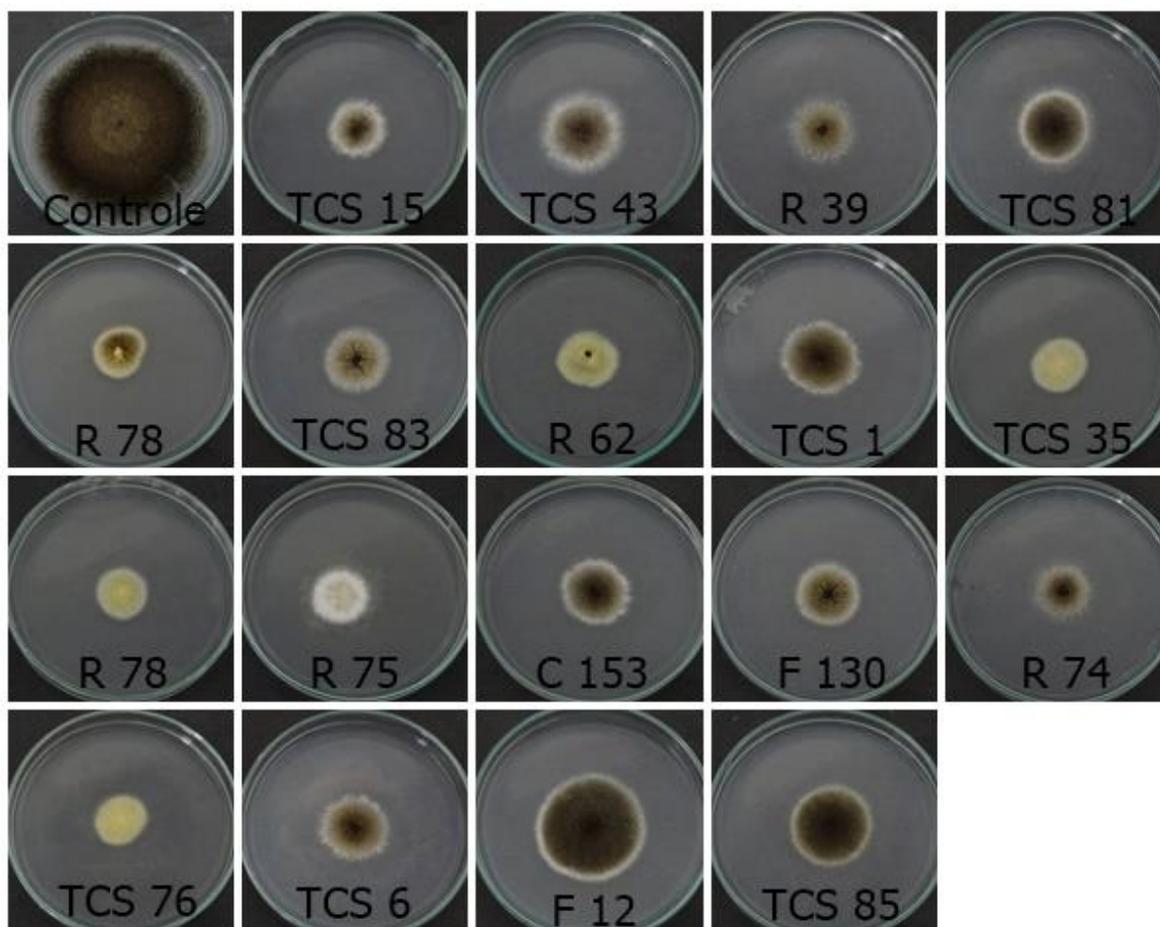
O número total de esporos produzidos por *A. welwitschiae* foi reduzido significativamente pelos compostos voláteis dos isolados de *Trichoderma* spp.. O tratamento controle (sem *Trichoderma*) apresentou a maior produção de esporos com  $3,00E+09$  conídeos.ml<sup>-1</sup>. Na relação dos esporos produzidos por área da colônia, os metabolitos voláteis produzidos pelos isolados *T. asperellum* (TCS81 e TCS85), *T. harzianum* (R74 e F12) e *T. piluliferum* (F130) não diminuíram significativamente a produção de esporos por cm<sup>2</sup> da colônia de *A. welwitschiae*. Houve destaque para os metabolitos voláteis dos isolados *T. harzianum* (TCS35), *T. asperellum* (TCS83), *T. virens* (R62), *T. viride* (R75) e *T. aureoviride* (R78) por proporcionarem redução no número de esporos produzidos em relação ao diâmetro da colônia do fungo (Tabela 3).

**Tabela 3.** Efeito inibitório dos metabolitos voláteis de isolados de *Trichoderma* spp. sobre o diâmetro e esporulação de *A. welwitschiae*.

Tratamentos	Diâmetro (cm)		Esporulação	
	da colônia de <i>A. welwitschiae</i>	PI (%) <sup>1</sup>	conídios.ml <sup>-1</sup>	conídios.cm <sup>2</sup>
TCS1	3,80 b	57,45	1,14E+08 d	9,86E+06 b
TCS6	3,78 b	57,67	1,51E+08 d	1,26E+07 b
TCS15	3,26 c	63,49	6,95E+07 e	7,91E+06 b
TCS43	4,15 b	53,53	8,43E+07 e	5,92E+06 b
TCS76	3,16 c	64,61	6,50E+07 e	6,98E+06 b
TCS35	2,96 c	66,85	9,67E+06 e	1,41E+06 c
TCS81	4,45 b	50,17	4,40E+08 b	2,88E+07 a
TCS83	3,90 b	56,33	1,79E+07 e	1,25E+06 c
TCS85	4,33 b	51,51	4,82E+08 b	3,32E+07 a
R39	3,51 c	60,69	7,40E+07 e	7,61E+06 b
R62	3,01 c	66,29	2,33E+07 e	3,08E+06 c
R72	2,93 c	67,19	4,90E+07 e	6,89E+06 b
R74	3,43 c	61,59	1,97E+08 d	2,11E+07 a
R75	3,06 c	65,73	4,08E+06 e	6,42E+05 c
R78	3,11 c	65,17	1,37E+07 e	1,69E+06 c
C153	3,33 c	62,71	1,54E+08 d	1,60E+07 b
F12	3,95 b	55,77	2,83E+08 c	2,00E+07 a
F130	3,23 c	63,83	1,58E+08 d	1,89E+07 a
Sem	8,93 a		3,00E+09 a	4,72E+07 a

*Trichoderma*

<sup>1</sup>PI: Porcentagem de inibição calculada pela fórmula:  $PI = [(diâmetro da testemunha - diâmetro do tratamento) / diâmetro da testemunha] \times 100$  (Sundaramoorthy et al., 2012). Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de agrupamento de Scott-Knott ( $p \leq 0,01$ ).



**Figura 4.** Fotodocumentação das colônias de *A. welwitschiae* em meio BDA submetidas aos metabolitos voláteis de isolados de *Trichoderma* spp.

#### **Metabolitos não voláteis de *Trichoderma* spp. sobre *A. welwitschiae***

O efeito inibitório dos metabolitos não voláteis sobre o diâmetro das colônias de *A. welwitschiae* variou de acordo com o isolado de *Trichoderma* spp. Os tratamentos com os isolados *T. piluliferum* (C153 e R72) e *T. koningii* R39 não diminuíram o crescimento das colônias, dessa forma, obtiveram diâmetro médio de 9 cm igual o tratamento controle. Houve destaque para os metabolitos do isolado *T. harzianum* (F12) que inibiu em aproximadamente 80 % o diâmetro das colônias de *A. welwitschiae* (Tabela 4 Figura 5).

A esporulação de *A. welwitschiae* também foi afetada pelos metabolitos não voláteis dos isolados de *Trichoderma* spp. Os metabolitos não voláteis dos isolados de *Trichoderma* spp. reduziram a produção de esporos em comparação

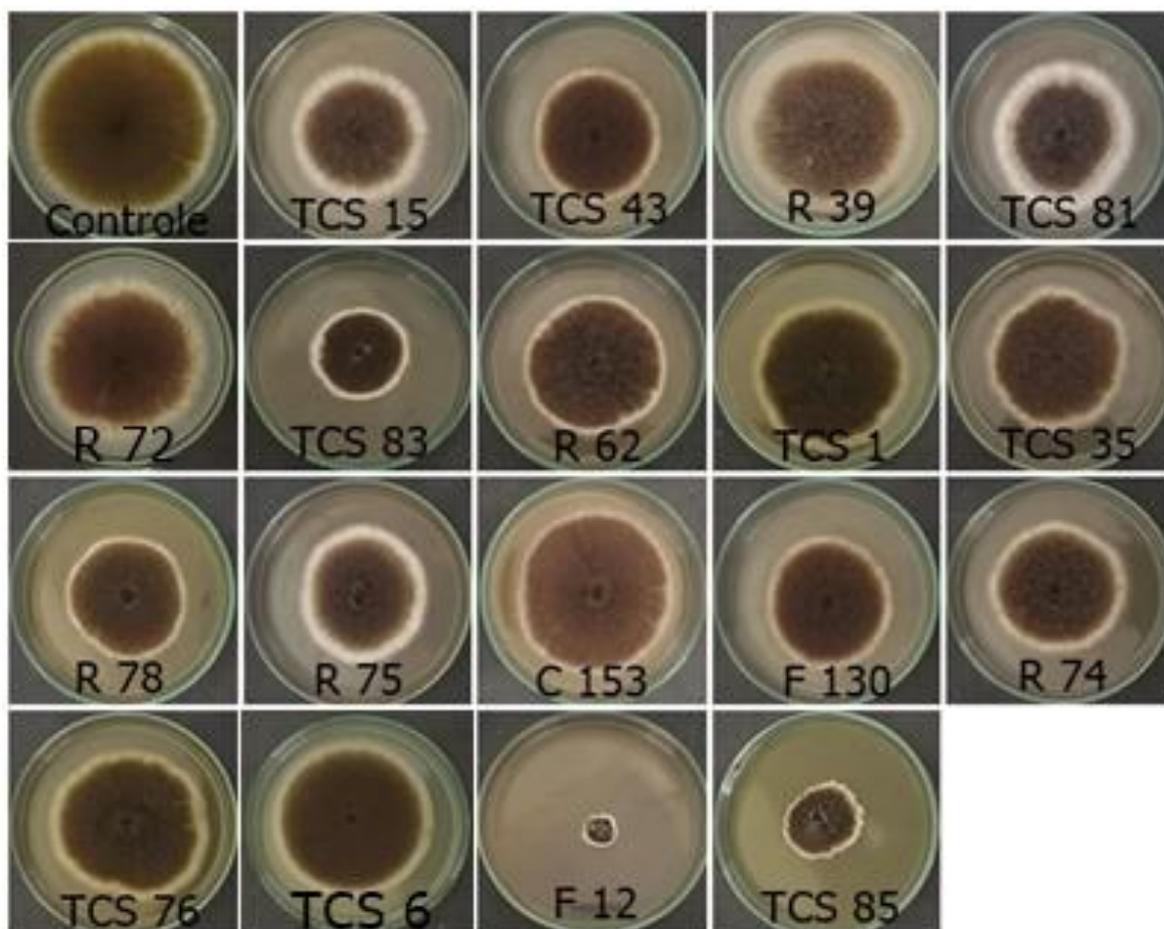
com o tratamento controle que apresentou produção de esporos de  $3,83E+09$  conídeos. $ml^{-1}$ . Dentre os tratamentos, os metabolitos não voláteis do isolado *T. harzianum* (F12) destacaram com a menor produção de esporos ( $2,03E+07$  conídeos. $ml^{-1}$ ). Para a relação esporos produzidos por área da colônia do patógeno, os metabolitos não voláteis dos isolados *T. longibrachiatum* (TCS15) e *T. harzianum* (R74) estimularam a produção de esporos, resultando numa esporulação por  $cm^2$  maior que a do tratamento controle ( $6,02E+07$  conídios. $cm^2$ ). A menor esporulação por  $cm^2$  foi obtidas pelos tratamentos com os metabolitos não voláteis dos isoaldos *T. harzianum* (TCS1 e F12) e *T. virens* (R62) com  $1,58E+07$ ,  $7,28E+06$  e  $1,31E+07$  conídios. $cm^2$ , respectivamente (Tabela 4 Figura 5).

Os metabolitos não voláteis dos isolados de *Trichoderma* spp. inibiram em mais de 50% a germinação de esporos de *A. welwitschiae* (Tabela 4). O tratamento controle (sem *Trichoderma*) apresentou germinação de 100%, evidenciando a elevada viabilidade dos esporos. Houve destaque para os tratamentos com os isolados *T. virens* (TCS43) e *T. harzianum* (F12) que causaram a redução na germinação dos esporos em 99% e 97%, respectivamente (Tabela 4).

**Tabela 4.** Efeito inibitório de metabolitos não voláteis de isolados de *Trichoderma* spp. sobre o crescimento micelial, esporulação e germinação de *A. welwitschiae*.

Tratamentos	Diâmetro da	Esporulação		Germinação
	colônia de <i>A. welwitschiae</i>	Conídios.ml <sup>-1</sup>	Conídios.cm <sup>2</sup>	(%)
	(cm)			
TCS 1	8,27 a	8,43E+08 e	1,58E+07 d	43,16 a
TCS 6	8,50 a	2,30E+09 b	4,20E+07 c	35,30 b
TCS 15	4,12 d	1,18E+09 d	9,86E+07 a	28,66 b
TCS 43	5,21 c	1,17E+09 d	5,49E+07 b	1,00 d
TCS 76	8,55 a	1,62E+09 c	2,95E+07 c	50,83 a
TCS 35	6,77 b	1,13E+09 d	3,11E+07 c	44,60 b
TCS 81	4,53 c	1,09E+09 d	6,75E+07 b	39,00 a
TCS 83	3,41 d	7,05E+08 e	6,66E+07 b	39,50 a
TCS 85	3,68 d	6,48E+08 e	6,09E+07 b	32,33 b
R39	9,00	2,42E+09 b	3,80E+07 c	24,50 c
R74	7,05 b	3,71E+09 a	9,54E+07 a	43,16 a
R62	8,13 a	6,80E+08 e	1,31E+07 d	33,16 b
R72	9,00	1,75E+09 c	2,74E+07 c	31,33 b
R75	6,52 b	1,08E+09 d	3,25E+07 c	33,50 b
R78	6,76 b	1,02E+09 d	2,87E+07 c	17,50 c
C153	9,00	1,50E+09 c	2,36E+07 c	45,83 a
F12	1,88 e	2,03E+07 f	7,28E+06 d	3,16 d
F130	6,47 b	1,69E+09 c	5,15E+07 b	50,00 a
<i>Sem Trichoderma</i>	9,00	3,83E+09 a	6,02E+07 b	100

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de agrupamento de Scott-Knott ( $p \leq 0,01$ ).



**Figura 5.** Fotodocumentação das colônias de *A. welwitschiae* crescidas em meio BDA com filtrado de isolados de *Trichoderma* spp.

### Controle da podridão vermelha em condições de casa de vegetação

As mudas de sisal tratadas com os isolados de *Trichoderma* spp. tiveram significativa redução ( $p < 0,01$ ) na incidência e severidade da podridão vermelha, no período de 30 dias de avaliação (Tabela 5 e Figura 6). Nas mudas do tratamento controle (inoculadas apenas com *A. welwitschiae*) a incidência da doença foi de 100% e as mudas apresentaram folhas murchas, amareladas e o caule totalmente apodrecido (planta morta) (Tabela 5, Figura 6A e C). Estes sintomas iniciaram aos oito dias após a inoculação do patógeno e com 15 dias, aproximadamente 90% das mudas apresentavam caules apodrecidos e mortos (Figura 6A e C). Nas mudas inoculadas *Trichoderma* spp., os sintomas da doença surgiram tardiamente, com aproximadamente 20 dias após a inoculação do

patógeno e em geral, as mudas permaneceram assintomáticas durante todo o experimento (Figura 6B).

Entre os tratamentos, as mudas tratadas com o isolado *T. harzianum* (TCS1) apresentaram maior incidência da doença com 77%. Os isolados *T. longibrachiatum* (TCS15), *T. harzianum* (TCS76, TCS35, R74 e F12), *T. asperellum* (TCS81, TCS83 e TCS85), *T. virens* (R62), *T. viride* R75, e *T. piluliferum* (F130) destacaram-se por promoverem a redução na incidência da podridão vermelha entre 70-93% e na severidade em 97% (Tabela 5). Esse efeito biocontrolador da podridão vermelha pode ser observado nas mudas tratadas com esses isolados de *Trichoderma*, as quais permaneceram assintomáticas e vigorosas como as mudas que não recebem inoculação, durante os 30 dias de avaliação (Figura 6 B e D). Com o corte longitudinal das mudas, observou-se que o caule tratado com esses isolados de *Trichoderma* apresentava lesões iniciais (sintomas de podridão) e, em geral, a doença não progrediu no tecido caulinar, permanecendo próxima ao tecido basal da folha, local da inoculação (Figura 6 E).

**Tabela 5.** Incidência, eficiência de controle e severidade da podridão vermelha em mudas de sisal tratadas com isolados de *Trichoderma* spp.

Tratamentos	Incidência (%)	Eficiência de controle (%) <sup>1</sup>	Severidade (%) <sup>2</sup>
TCS 1	77 a	23	8,33 a
TCS 6	57 b	43	8,66 a
TCS 15	7 c	93	0,66 b
TCS 43	37 b	63	4,00 b
TCS 76	14 c	86	1,33 b
TCS 35	7 c	93	1,00 b
TCS 81	24 c	76	3,66 b
TCS 83	10 c	90	1,66 b
TCS 85	14 c	86	1,33 b
R62	7 c	93	1,00 b
R72	37 b	63	6,66 a
R74	20 c	80	3,33 b
R75	14 c	86	1,66 b
R78	50 b	50	5,66 a
C153	50 b	50	7,00 a
F12	7 c	93	1,00 b
F130	30 c	70	3,00 b
<i>Sem Trichoderma</i>	100	0	100

<sup>1</sup>Eficiência de controle calculada pela fórmula: Eficiência= [(incidência da testemunha – incidência do tratamento) / incidência da testemunha] x 100. <sup>2</sup>Índice de Severidade da Doença, conforme a equação:  $\Sigma$  (nota da escala de doença \* frequência) \* 100 / (número de avaliações \* nota máxima da escala de doença) (McKinney, 1923). Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de agrupamento de Scott-Knott ( $p \leq 0,01$ ).



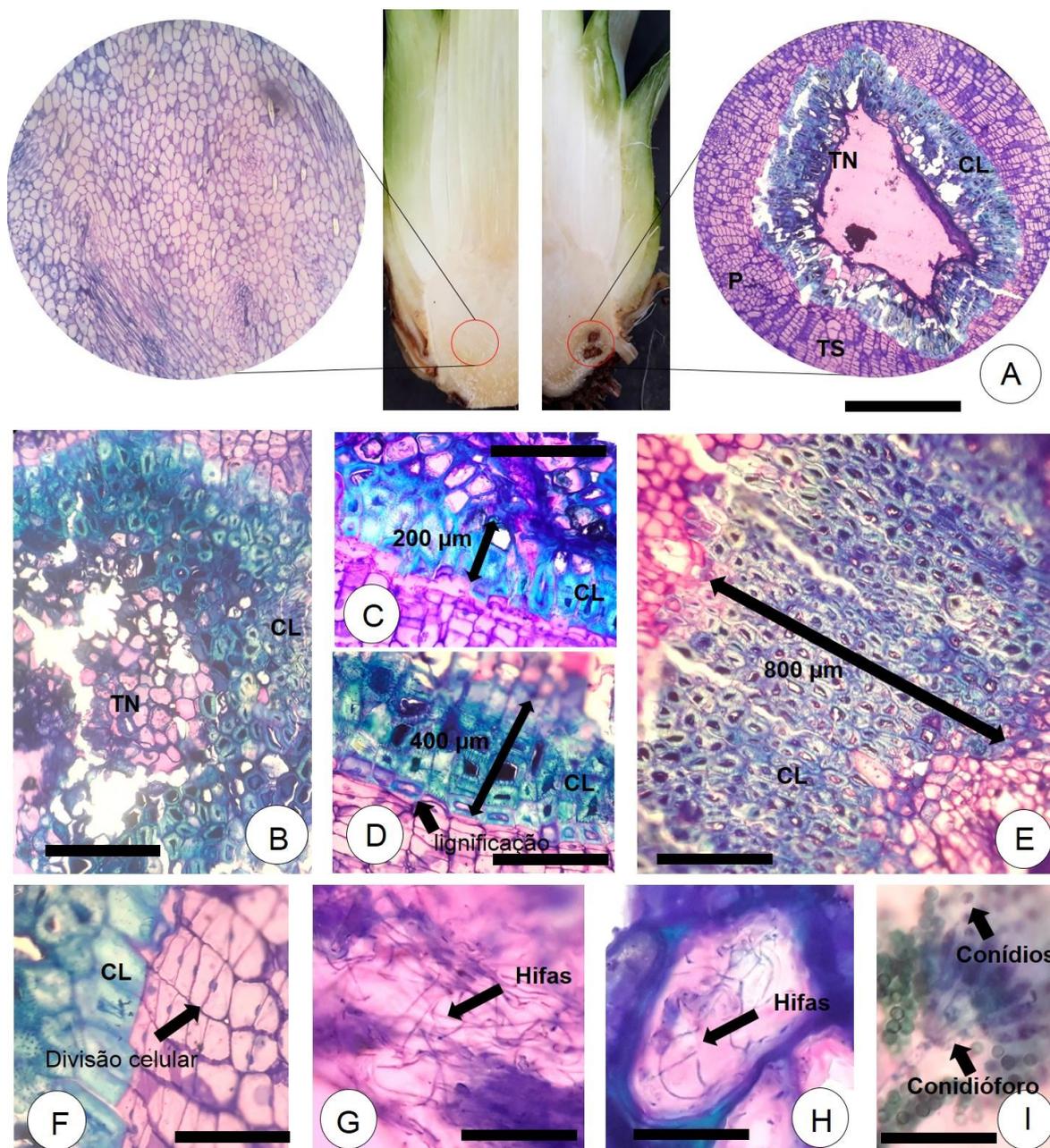
**Figura 6.** Mudanças de sisal com 30 dias após o tratamento com os isolados de *Trichoderma* spp. (A) Mudanças inoculadas apenas com *A. welwitschiae* (Controle 1). (B) Mudanças tratadas com *Trichoderma* sp. e inoculadas com *A. welwitschiae*, (C) Muda com folhas murchas, amareladas e com caule totalmente apodrecido (morta). (D) Muda sem inoculação (Controle 2). (E) Corte longitudinal do caule para avaliação da severidade da doença.

### **Histologia do caule das mudas tratadas com *Trichoderma* spp.**

Os cortes histológicos do caule das mudas de sisal do controle (sem inoculação) evidenciaram que todo o tecido caulinar estava sadio e sem alterações anatômicas. Células parenquimáticas isodiamétricas de parede celular delgada compõe o parênquima de preenchimento e os espaços entre os feixes vasculares (Figura 7A).

Nas secções anatômicas do caule de sisal que foram tratados com isolados de *Trichoderma* spp. foi observado que a podridão vermelha estava presente no parênquima de preenchimento (Figura 7A). As células parenquimáticas colonizadas pelo *A. welwitschiae* apresentaram parede celular degradada e sem formato definido (Figura 7A). Além disso, no tecido caulinar foi evidenciado que o *A. welwitschiae* foi contido devido a deposição de lignina na parede celular das células do parênquima (Figura 7B, C, D e E). O tecido necrosado apresenta-se cercado por camadas de células lignificadas, com espessuras variando de 200 a 800  $\mu\text{m}$  (Figura 7A, B, C, D e E). Também foi observado que algumas células parenquimáticas encontravam-se em processo de lignificação (Figura 7D) e outras em processo de divisão celular (Figura 7F).

Hifas fúngicas foram encontradas nos caules tratados com isolados de *Trichoderma* spp. e inoculados com *A. welwitschiae* (Figura 7G). Na maioria dos cortes analisados, não foram observadas estruturas reprodutivas (conidióforos), o que impossibilitou a identificação dos fungos (*A. welwitschiae* ou *Trichoderma*) (Figura 7G). Não foram observadas estruturas reprodutivas (conidióforo e conídios) de *A. welwitschiae* em todos os cortes analisados. Nos tecidos das plantas tratadas com os isolados *T. longibrachiatum* (TCS15), *T. virens* (TCS43), *T. harzianum* (TCS35), *T. asperellum* (TCS81 e TCS85), *T. viride* (R75) e *T. piluliferum* (F130) foi possível identificar os antagonistas, pois além de hifas (Figura 7G e H), esses isolados apresentaram conidióforos e conídios (Figura 7I).



**Figura 7.** Cortes histológicos de caule de mudas de sisal. (A) Fragmento de caule de sisal sem inoculação (esquerda) e tratado com *Trichoderma* (direita) e a visualização do corte transversal. (B) Camadas de células lignificadas envolvendo o tecido necrosado com espessura de 200μm (C), 400 μm (D) e 800 μm (E). (F) Células parenquimáticas em processo de divisão (seta). Presença de hifas (setas) no tecido necrosado (G) e em células parenquimáticas (H). Presença de conidióforo e conídios (I) de *Trichoderma* spp. Abreviações: CL: Células lignificadas. P: parênquima TD: Tecido necrosado. TS: Tecido sadio. Escala: 150 μm (A); 60 μm (B, C, D, E); 30 μm (F); 1 μm (G, H, I).

## Discussão

A podridão vermelha é a doença mais destrutiva da cultura do sisal no Brasil. Estratégias de controle são necessárias para evitar o aumento da doença nas áreas produtoras de sisal e para impedir a sua disseminação para áreas isentas da doença. Este é o primeiro estudo com a descrição do efeito de isolados de *Trichoderma* no controle de *A. welwitschiae*, agente causal da podridão vermelha nos tecidos de *Agave sisalana*.

Estudos têm demonstrado resultados promissores na utilização de *Trichoderma* como antagonista a outras espécies do gênero *Aspergillus*. Gajera e Vakharia, (2010) avaliaram o antagonismo entre 12 isolados de *Trichoderma* contra *A. niger*, agente causal da podridão do colo em amendoim e relataram que o isolado de *T. viride* 60 reduziu em 86,2% o crescimento micelial do patógeno no pareamento das culturas. No México, Sánchez e Rebolledo, (2010) utilizaram isolados de *T. longibrachiatum*, *T. viridescens* e *T. reseei* obtidos de solos de áreas produtoras de *A. tequilana* no controle do *Thielaviopsis paradoxa*, agente causal da tristeza e morte desta espécie de *Agave*, principal doença da *A. tequilana*. Esses autores evidenciaram que os isolados de *Trichoderma* causaram inibição acima de 80% do crescimento micelial do patógeno. Sá, (2009) avaliou o antagonismo de 44 isolados de *Trichoderma* sobre o *A. niger* e constatou que os isolados *T. virens* (TCS16) e *T. viride* (TCS23) inibiram 100% o crescimento micelial e esporulação do patógeno.

Espécies de *Trichoderma* atuam no controle de fitopatogenos por meio de um ou mais mecanismos como micoparasitismo, antibiose, competição e indução de resistência da planta (ELAMATHI et al., 2018; HARMAN et al., 2004; ROATTI et al., 2013). Nesse estudo, os isolados de *Trichoderma* spp. apresentaram diferentes mecanismos de ação (competição, micoparasitismo, antibiose, produção de compostos antifúngicos voláteis e não voláteis que atuam na inibição do crescimento micelial, esporulação e germinação de esporos de *A. welwitschiae*. Além disso, os isolados de *Trichoderma* spp. induziram a defesa do sisal (lignificação).

No teste de pareamento, a maioria dos isolados de *Trichoderma* spp. foi eficiente em ocupar o meio de cultivo e também crescer sobre as colônias de *A. welwitschiae*. Esse comportamento tem sido relatado na maioria dos ensaios com cultura pareada envolvendo *Trichoderma* e fitopatogênicos como *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora capsici*, *Colletotrichum falcatum*, *A. niger* (BUNBURY-BLANCHETTE e WALKER, 2019; ELAMATHI et al., 2018; GAJERA e VAKHARIA, 2010; MOUSUMI et al., 2019).

Especies de *Trichoderma* spp. podem exercer o biocontrole direto parasitando uma variedade de fungos (BENÍTEZ et al., 2004). Embora esse seja o primeiro relato do micoparasitismo de *A. welwitschiae* por isolados de *Trichoderma* spp., Rai et al. (1980) evidenciaram o micoparasitismo de outras espécies do gênero *Aspergillus* como *A. candidus*, *A. luchuensis* e *A. niger* por *T. viride*. De acordo com os autores, as hifas do *T. viride* enrolaram e penetraram apenas os conidióforos dos hospedeiros. No presente trabalho, observou-se que os isolados de *Trichoderma* spp. parasitaram apenas as estruturas vegetativas do *A. welwitschiae*. O micoparasitismo é um processo complexo e inclui o crescimento quimiotrópico de *Trichoderma*, reconhecimento do hospedeiro pelos micoparasitas, secreção de enzimas extracelulares, penetração das hifas e lise do hospedeiro (ELAMATHI et al., 2018; VINALE et al., 2008; ZEILINGER et al., 1999). A importância do micoparasitismo como mecanismo de ação variar a depender da espécie do *Trichoderma* e do patógeno (RAI et al., 1980; SÁNCHEZ et al., 2007; OJHA e CHATTERJEE, 2008; RAJESH et al., 2016).

Coincidentemente, os isolados que apresentaram dois mecanismos de ação destacaram-se entre os tratamentos por causarem maior inibição no crescimento micelial de *A. welwitschiae*. Um estudo realizado por El-Debaiky, (2017) também revelou que o *T. harzianum* teve ação contra patógenos como *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Sclerotium cepivorum* e *Sclerotinia sclerotiorum* por meio dos mecanismos da antibiose e de micoparasitismo. Em outro caso, o *T. harzianum* inibiu o crescimento micelial (56%) de *S. sclerotiorum* por meio da competição e as hifas do antagonista cresceram em paralelo ou entrelaçadas com hifas do patógeno, evidenciando também o micoparasitismo (ZHANG et al., 2016).

Em geral, os metabolitos voláteis e não voláteis dos isolados de *Trichoderma* também apresentaram atividade inibitória sobre o *A. welwitschiae*. Entretanto, os voláteis foram mais eficientes em inibir o crescimento e esporulação do patógeno, em comparação com os não voláteis. Possivelmente, o fato dos não voláteis serem produzidos na ausência do patógeno no meio líquido (BD) e serem homogeneizados em meio sólido (BDA) possa ter influenciado no efeito antagônico. Isaias et al. (2014) constataram que os metabolitos voláteis de 20 isolados de *Trichoderma* spp. causaram inibição acima de 77% do crescimento micelial de *Verticillium dahliae*, enquanto que para a maioria dos metabolitos não voláteis a inibição não ultrapassou 50%. A variedade e o número de compostos encontrados no metaboloma de diferentes espécies de *Trichoderma* são surpreendentemente elevados e incluem enzimas líticas e hormônios, além de muitos metabolitos secundários com funções biológicas importantes (LORITO et al., 2010). A produção de metabolitos secundários por *Trichoderma* spp. é dependente da estirpe e inclui diferentes classes de compostos antifúngicos sendo os antibióticos voláteis um deles (LORITO et al., 2010).

Além dos mecanismos de ação já mencionados, os agentes de controle podem elicitar respostas de resistência aos patógenos podendo, inclusive, induzir a ativação de mecanismos estruturais de defesa da planta. A lignificação é um mecanismo de resistência pré-formada nas plantas, mas que também pode ser elicitado como respostas a estresses bióticos e abióticos (BHUIYAN et al., 2009; VANCE et al., 1980). A deposição de lignina torna a parede celular mais resistente à pressão mecânica aplicada durante a penetração pelo fungo, bem como torna a célula mais resistente à dissolução por enzimas líticas e restringir a difusão de enzimas e toxinas do patógeno para o hospedeiro, e da água e nutrientes do hospedeiro para o fungo (VANCE et al., 1980; SMITH et al., 2007; MALINOVSKY et al., 2014). Neto e Martins, (2012) já haviam reportado que o sisal sadio apresenta células altamente lignificadas no córtex da raiz e que essas células são uma barreira física da planta contra o ataque de microrganismos. Apesar do sisal possui esse mecanismo estrutural, nesse estudo foi confirmado que as plantas sem tratamento (sem *Trichoderma* spp.) não conseguem conter a infecção pelo *A. welwitschiae* e acabam morrendo. Em contrapartida, nas plantas

que receberam o tratamento com *Trichoderma*, esse mecanismo de defesa demonstrou ser eficiente em conter o patógeno nos tecidos caulinares. Possivelmente, os isolados de *Trichoderma* spp. causaram uma aceleração na deposição de lignina nas células do parênquima das plantas tratadas. Adicionalmente, o fato de algumas células estarem no processo de lignificação e divisão celular, sugere que este mecanismo de defesa estava ativo, mesmo após o isolamento do tecido necrosado.

A lignina também tem sido correlacionada com plantas resistentes e susceptíveis a patógenos (GARCÍA et al., 2015). Xu et al. (2011) inocularam plantas de algodão susceptíveis e resistentes a *Verticillium dahliae* e reportaram que ambos os tipos de plantas apresentaram um aumento no nível de expressão de genes relacionados à síntese de lignina após a inoculação do patógeno, sendo esse aumento maior e mais rápido no genótipo resistente. Não existe registro de genótipos resistentes ao *A. welwitschiae*, entretanto os resultados obtidos neste estudo, apontam que algumas plantas podem expressar o gene relacionado com a síntese de lignina mais rapidamente, resultando em maiores camadas de células lignificadas.

De maneira geral, os efeitos de *Trichoderma* na planta são determinados pela interação entre elicitores produzidos pelo fungo e pelos receptores da planta e podem desempenhar um papel na indução de mudanças na fisiologia e expressão gênica das mesmas (HARMAN e SHORESH, 2007). Não foi possível identificar qual(is) elicitor(es) produzido(s) pelos isolados de *Trichoderma* estão envolvidos no processo de lignificação na cultura do sisal. Koike et al. (2001) relataram que as raízes de pepino tratadas com filtrado do cultivo de *Trichoderma* 24h antes da inoculação de *Colletotrichum orbiculare*, induziu a lignificação em pontos de penetração do patógeno nas folhas, e resultou na redução no número total e diâmetro das lesões em 46% e 62%, respectivamente. Entretanto, os autores também não chegaram a identificar o elicitor presente no filtrado de *Trichoderma*, mas sugeriram que os polissacarídeos e os lipídios, podem ter sido os elicitores que desencadearam a resistência em pepino. Em outro estudo, Nandini et al. (2017) reportaram que o tratamento de mudas de milho com Proteína Bruta Total (TCP) de *T. atroviride* induziu a deposição localizada de

lignina e corroborou com o aumento da proteção (56%) contra o míldio causada por *Sclerospora graminicola*.

As análises histológicas também evidenciaram a presença dos isolados de *Trichoderma* nos tecidos caulinares. Sete isolados obtiveram sucesso na colonização dos tecidos, sendo possível observar além das hifas, as estruturas de reprodução (conidióforo e conídios) (Figura 7). Interessantemente, esses isolados foram obtidos de diferentes nichos ecológicos incluindo raiz de sisal (*T. viride* (R75)), folha de sisal (*T. piluliferum* (F130)), solo próximo das raízes de sisal (*T. longibrachiatum* (TCS15), *T. virens* (TCS43) e *T. harzianum* (TCS35)) e solo próximo de raízes de bananeira (*T. asperellum* (TCS81 e TCS85)). Esse resultado demonstra embora sejam de nicho ecológico diferentes, esses agentes de controle biológico podem estabelecer uma interação duradoura com o sisal, fazendo com que os efeitos benéficos dessa interação possam se manter por todo ou grande parte do ciclo da planta (HARMAN et al., 2004; DRUZHININA et al., 2011). A interação *Trichoderma*-planta geralmente acontece na região da raiz e embora o *Trichoderma* spp. possa colonizar externamente e internamente as raízes das plantas (MUKHERJEE et al., 2012), algumas espécies não se restringem aos tecidos radiculares, e podem ser encontradas em diferentes partes da planta como é o caso do *T. amazonicum* colonizando folhas de *Hevea brasiliensis* (CHAVERRI et al., 2011), *T. atroviride* e *T. koningii* em folhas de *Cupressaceae* (HOSSEYNI-MOGHADDAM e SOLTANI, 2013), *T. polyalthiae* em caule de *Polyalthia debilis* (NUANKAEW et al., 2018), *T. harzianum*, *T. koningiopsis*, *T. hamatum* e *T. ovalisporum* em tricomas de cacau (BAILEY et al., 2009).

Este estudo é inovador dentro da área do controle biológico, pois além de investigar os possíveis mecanismos de ação utilizados por *Trichoderma* spp. no controle da podridão vermelha do sisal, utilizando técnicas histológicas apresenta os efeitos que ocorrem nas plantas tratadas com o agente de biocontrole ao nível celular. As técnicas apresentadas nesse trabalho também podem ser utilizadas por outros pesquisadores para investigar as interações antagonista-patógeno-hospedeiro em outros patossistemas. Estudos futuros focarão na identificação dos elicitores responsáveis por esse importante processo e que podem estar relacionados com a resistência de plantas a patógenos. A identificação dos

compostos voláteis e não voláteis produzidos por esses isolados e o seu efeito na indução de resistência também é uma prioridade. Os isolados relatados neste estudo são recomendados para a formulação de um bioproduto para o controle da podridão vermelha causada pelo *A. welwitschiae* no sisal e assim contribuir para diminuição das perdas causadas por essa doença.

## Conclusão

Os isolados de *Trichoderma* spp. possuem potencial inibitório sobre o *A. welwitschiae*. O *T. longibrachiatum* (TCS15), *T. harzianum* (TCS76, TCS35, R74 e F12), *T. asperellum* (TCS81, TCS83 e TCS85), *T. virens* (R62), *T. viride* R75, e *T. piluliferum* (F130) têm potencial para o controle da podridão vermelha do sisal. O estudo histológico evidenciou que os isolados de *Trichoderma* induziram a lignificação de células parenquimáticas no sisal. Em estudos futuros, o efeito biocontrolador desses isolados também deve ser investigado sob condições de campo, além de identificar o(s) elicitador(es) responsáveis pelo processo de lignificação no sisal e o desenvolvimento de bioprodutos a base desses isolados para o controle da podridão vermelha do sisal.

## Referências

ABREU, K. C. L. DE M. Epidemiologia da podridão vermelha do sisal no Estado da Bahia. 2010. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. 2010.

BAILEY, B. A.; STREM, M. D.; WOOD, D. *Trichoderma* species form endophytic associations within *Theobroma cacao* trichomes. **Mycological Research**, v. 113, n. 12, p. 1365–1376, 2009.

BARBOSA, L. O.; LIMA, J. S.; MAGALHÃES, V. C.; GAVA, C. A. T.; SOARES, A. C. F.; MARBACH, P. A. S.; SOUZA, J. T. Compatibility and combination of selected bacterial antagonists in the biocontrol of sisal bole rot disease. **BioControl**, v. 63, n. 4, p. 595–605, 2018.

BASU, G. et al. Potentiality for value-added technical use of Indian sisal. **Industrial Crops and Products**, v. 36, n. 1, p. 33–40, 2012.

BENÍTEZ, T. et al. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**, v. 7, p. 249-260, 2004.

BHUIYAN, N. H. et al. Role of lignification in plant defense. **Plant signaling & behavior**, v. 4, n. 2, p. 158- 159, 2009.

BUNBURY-BLANCHETTE, A. L.; Walker, A. K. *Trichoderma* species show biocontrol potential in dual culture and greenhouse bioassays against Fusarium basal rot of onion. **Biological Control**, v. 130, p. 127-135, 2019.

CHAVERRI, P.; GAZIS, R. O.; SAMUELS, G. J. *Trichoderma amazonicum*, a new endophytic species on *Hevea brasiliensis* and *H. guianensis* from the Amazon basin. **Mycologia**, v. 103, n.1, p. 139–151, 2011.

COLEMAN-DERR, D. et al. Plant compartment and biogeography affect microbiome composition in cultivated and native *Agave* species. **New Phytologist**, v. 209, n. 2, p. 798–811, 2016.

COUTINHO, W.M. et al. Bole rot of sisal caused by *Aspergillus niger* in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n. 6, p 605,2006.

DRUZHININA, I. S. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 10, p. 749–759, 2011.

DUARTE, E.A.A. et al. Putting the Mess in Order: *Aspergillus welwitschiae* (and Not *A. niger*) Is the Etiological Agent of Sisal Bole Rot Disease in Brazil. **Frontier Microbiology**, v. 9, p. 1-21, 2018.

ELAMATHI, E. et al. Expression analysis on mycoparasitism related genes during antagonism of *Trichoderma* with *Colletotrichum falcatum* causing red rot in sugarcane. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, v. 27, n. 3, p. 351–361, 2018.

EL-DEBAIKY, S. A. Antagonistic studies and hyphal interactions of the new antagonist *Aspergillus piperis* against some phytopathogenic fungi in vitro in comparison with *Trichoderma harzianum*. **Microbial Pathogenesis**, v. 113, p. 135–143, 2017.

FAOSTAT- Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOSTAT Disponível em: <http://faostat.fao.org/>. Acesso em 12 de Janeiro de 2019.

GAJERA, H. P.; VAKHARIA, D. N. Molecular and biochemical characterization of *Trichoderma* isolates inhibiting a phytopathogenic fungi *Aspergillus niger* Van Tieghem. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 74, n. 3-4, p. 274–282, 2010.

GARCÍA, T. et al. Wounding induces local resistance but systemic susceptibility to *Botrytis cinerea* in pepper plants. **Journal of Plant Physiology**, v. 176, p. 202–209, 2015.

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, p. 633-640, 2012.

GUIMARÃES, G. R. et al. Ação de metabólitos voláteis e não voláteis de *Trichoderma harzianum* sobre o crescimento de *Cladosporium herbarum*. **Pesquisa Agropecuária Pernambucana**, v. 21, n. 1, p. 7-11, 2016.

GUTIÉRREZ, A.; RODRÍGUEZ, A.; DEL RÍO, J. C. Chemical composition of lipophilic extractives from sisal (*Agave sisalana*) fibers. **Industrial Crops and Products**, v. 28, n. 1, p. 81–87, 2008.

HARMAN, G.E. et al. *Trichoderma* species—opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Review Microbiology**, v. 2, p. 43–56, 2004.

HARMAN, G. E.; SHORESH, M. The mechanisms and applications of symbiotic opportunistic plant symbionts. **Novel Biotechnologies for Biocontrol Agent Enhancement and Management**, p. 131–155, 2007.

HOSSEYNI-MOGHADDAM, M. S.; SOLTANI, J. Bioactivity of endophytic *Trichoderma* fungal species from the plant family Cupressaceae. **Annals of Microbiology**, v. 64, n. 2, p. 753–761, 2013.

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.

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola, janeiro de 2017**. Disponível em: <https://ww2.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/default.shtm>. Accessed 12 Janeiro 2019.

ISAIAS, C.O et al. Ação antagônica e de metabólitos bioativos de *Trichoderma* spp. contra os patógenos *Sclerotium rolfsii* e *Verticillium dahliae*. **Summa Phytopathologica**, v. 40, n. 1, p. 34-41, 2014.

JOHANSEN, D.A. Plant Microtechnique. New York: McGraw-Hill, 1940.

JUNQUEIRA, C.U. O uso de cortes finos de tecidos na medicina e biologia. **Meios & Métodos**, v. 66, p. 10-11, 1990.

KOIKE, N. et al. Induction of systemic resistance in cucumber against several diseases by plant growth-promoting fungi: lignification and superoxide

generation. **European Journal of Plant Pathology**, v. 107, n. 5, p. 523–533, 2001.

LOBO JÚNIOR, M., GERALDINE, A. M., CARVALHO, D. D. C. Controle biológico de patógenos habitantes do solo com *Trichoderma* spp., na cultura do feijoeiro comum. **Circular Técnica n. 85**, 2009.

LORITO, M. et al. Translational research on *Trichoderma*: from 'omics to the field. **Annual Review Phytopathology**, v. 498, p. 395–417, 2010.

MAGALHÃES, V. C. et al. *Burkholderia* isolates from a sand dune leaf litter display biocontrol activity against the bole rot disease of *Agave sisalana*. **Biological Control**, v. 112, p. 41–48, 2017.

MALINOVSKY, F.G.; FANGEL, J.U.; WILLATS, W.G.T. The role of the cell wall in plant immunity. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, p. 1-12, 2014.

MASCARENHAS, M. S. Controle do mal-do-panamá com *Trichoderma* spp. e diferentes matéria orgânica. 2016. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. 2016.

MCKINNEY, H.H. A new system of grading plant diseases. **Journal of Agricultural Research**, v. 26, p. 195–218, 1923.

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

MEIRA, R. M. S. A.; MARTINS, F. M. Inclusão de material herborizado em metacrilato para estudos de anatomia vegetal. **Revista Árvore**, v. 27, n. 1, p.109-112, 2003.

MELO, I.S. *Trichoderma* e *Gliocladium* como bioprotetores de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 4, p. 261-295, 1996.

MOUSUMI, DAS, M.; HARIDAS, M.; SABU, A. Biological control of black pepper and ginger pathogens, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* and *Phytophthora capsici*, using *Trichoderma* spp. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 17, p. 177-183, 2019.

MUKHERJEE, M. et al. *Trichoderma*–Plant–Pathogen Interactions: Advances in Genetics of Biological Control. **Indian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 4, p. 522–529, 2012.

NANDINI, B. et al. Total crude protein extract of *Trichoderma* spp. induces systemic resistance in pearl millet against the downy mildew pathogen. **3 Biotech**, v. 7 n. 3, p. 183, 2017.

NAVEEN, J. et al. Mechanical and physical properties of sisal and hybrid sisal fiber-reinforced polymer composites. **Mechanical and Physical Testing of Biocomposites, Fibre-Reinforced Composites and Hybrid Composites**, p. 427–44, 2019.

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

NUANKAEW, K. et al. *Trichoderma polyalthiae* sp. nov., an endophytic fungus from *Polyalthia debilis*. **Phytotaxa**, v. 371, n. 5, p. 273, 2018.

OJHA, S.; CHATTERJEE, N.C. Potential deterrence of *Trichoderma* spp. against fusarial wilt of tomato. **Journal of Mycopathological Research**. v. 46, n. 1, p. 47–51, 2008.

RAI, B.; SINGH, V. N.; SINGH, D. B. *Trichoderma viride* as a mycoparasite of *Aspergillus* spp. **Plant and Soil**, v. 57, n. 1, p. 131–135, 1980.

RAJESH, R. W.; RAHUL, M. S.; AMBALAL, N. S. *Trichoderma*: A significant fungus for agriculture and environment. **African Journal of Agricultural Research**, v. 11, n. 22, p. 1952–1965, 2016.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2016.

ROATTI, B. et al. Abiotic stresses affect *Trichoderma harzianum* T39-induced resistance to downy mildew in grapevine. **Phytopathology**, v. 103, n. 12, p. 1227–1234, 2013.

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

SÁ, J. O. de. Controle biológico da podridão vermelha do sisal (*Agave sisalana* Perrine) com *Trichoderma* spp. e Actinobactérias. 2013. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2013.

SÁNCHEZ, V.; REBOLLEDO, O. *Trichoderma* species in soil cultivated with *Agave tequilana* in Los Altos South region, Jalisco and assessment of their antagonistic capacity against *Thielaviopsis paradoxa*. **Revista Mexicana de Micologia**, v. 32, p. 11–18, 2010.

SÁNCHEZ, V. et al. *In vitro* antagonism of *Thielaviopsis paradoxa* by *Trichoderma longibrachiatum*. **Mycopathologia**, v. 163, n. 1, p. 49–58, 2007.

SENTHILKUMAR, K. et al. Mechanical properties evaluation of sisal fibre reinforced polymer composites: A review. **Construction and Building Materials**, v. 174, p. 713–729, 2018.

SILVA, O. R. R. F. et al. Cultivo do sisal no nordeste brasileiro. **Circular Técnica** n. 123, 2008.

SMITH, A.H. et al. Anatomical and histochemical defence responses induced in juvenile leaves of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus nitens* by *Mycosphaerella* infection. **Forest Pathology**, v. 37, n. 6, p. 361– 373, 2007.

SUNDARAMOORTHY, S et al. Combinatorial effect of endophytic and plant growth promoting rhizobacteria against wilt disease of *Capsicum annum* L. caused by *Fusarium solani*. **Biological Control**, v. 60, n. 1, p. 59-67, 2012.

VANCE, C. P.; KIRK, T. K.; SHERWOOD, R. T. Lignification as a mechanism of disease resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v. 18, n.1, p. 259–288, 1980.

VERMA, M. et al. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control. **Biochemical Engineering Journal**, v. 37, n.1, p. 1–20, 2007.

VINALE, F. et al. *Trichoderma*–plant–pathogen interactions. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, n. 1, p. 1–10, 2008.

XU L. et al. Lignin metabolism has a central role in the resistance of cotton to the wilt fungus *Verticillium dahliae* as revealed by RNA-Seq-dependent transcriptional analysis and histochemistry. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, p. 5607–5621, 2011.

ZAIDI, N. W. et al. *Trichoderma* species as abiotic stress relievers in plants. **Biotechnology and Biology of Trichoderma**, p. 515–525, 2014.

ZEILINGER, S. et al. Chitinase gene expression during mycoparasitic interaction of *Trichoderma harzianum* with its host. **Fungal Genetics and Biology**, v. 26, n. 2, p. 131-140, 1999.

ZHANG, F. et al. Biocontrol potential of *Trichoderma harzianum* isolate T-aloé against *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 100, p. 64-74, 2016.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A escala de notas desenvolvida para quantificação da podridão vermelha do sisal em mudas inoculadas com *A. welwitschiae* foi facilmente utilizada pelos avaliadores nas estimativas da severidade da doença. A descrição detalhada dos sintomas internos da podridão vermelha em cada nível de severidade também contribuiu nas estimativas da doença, principalmente em caso de dúvidas. O treinamento dos avaliadores antes das avaliações é recomendado para que se obtenha dados acurados e altamente precisos. Essa escala de notas possibilitará a realização de estudos futuros com a avaliação de métodos de controle sob condições de estufa e campo, na determinação de resistência de plantas (sisal e híbrido) e em teste de agressividade de diferentes isolados de *A. welwitschiae*.

Os resultados obtidos com a histologia do caule de plantas de sisal com a podridão vermelha contribuíram para a melhor compreensão da interação *A. welwitschiae*-*A. sisalana*. Na secção transversal do caule de sisal infectado foi observado que a doença estava presente em todo o parênquima fundamental e que as células parenquimáticas colonizadas pelo patógeno apresentam-se com a parede celular degradada e sem formato definido, sugerindo que o *A. welwitschiae* está atuando como patógeno necrotrófico. As secções longitudinais evidenciam a presença do fungo tanto nos elementos de vaso como em células do parênquima, demonstrando que o mesmo pode fazer uso dessas duas vias para poder locomover-se nos tecidos de *A. sisalana*. Alguns mecanismos de defesa do sisal também foram evidenciados nos cortes histológicos do caule infectado, como a obliteração dos elementos de vaso, presença de compostos fenólicos na pigmentação vermelha característica da doença e lignificação da parede celular de células parenquimáticas. Embora a planta possua tais mecanismos de defesa, a doença continua a se espalha pelo tecido caulinar do sisal até causar a morte da planta. Dessa forma, a intervenção com algum método de controle é necessária para conter a podridão vermelha nos tecidos do sisal.

Os isolados de *Trichoderma* spp. apresentaram diferentes mecanismos de ação (competição, micoparasitismo, antibiose, produção de compostos (voláteis e não voláteis) na inibição do crescimento micelial, esporulação e germinação de

esporos de *A. welwitschiae*. A utilização de um ou mais mecanismos de biocontrole variou de um isolado para outro.

O controle biológico da podridão vermelha com os isolados de *Trichoderma* spp. resultou numa diminuição significativa da incidência e severidade nas mudas que foram tratadas com esse agentes de biocontrole. O *T. longibrachiatum* (TCS15), *T. harzianum* (TCS76, TCS35, R74 e F12), *T. asperellum* (TCS81, TCS83 e TCS85), *T. virens* (R62), *T. viride* R75, e *T. piluliferum* (F130) apresentaram a maior eficiência de controle entre os tratamentos testados. Diferente das mudas sem *Trichoderma* (controle) que apresentaram sintomas característicos da doença e morreram com 15 dias após a inoculação do patógeno, as mudas tratadas com estes isolados permaneceram assintomáticas e vigorosas durante todo o período de avaliação.

O estudo histológico dos caules de mudas de sisal tratados com os isolados de *Trichoderma* spp. demonstrou que a podridão vermelha estava presente no parênquima de preenchimento, entretanto, o progresso da doença no tecido caulinar foi contido por camadas de células com parede celular lignificada. A espessura da camada das células lignificadas variou de isolado para isolado, sugerindo que o processo de lignificação foi influenciado pelos agentes de biocontrole. Além de induzirem o mecanismo de resistência no sisal, estruturas como hifas, conidióforos e conideos dos isolados *T. longibrachiatum* (TCS15), *T. virens* (TCS43), *T. harzianum* (TCS35), *T. asperellum* (TCS81 e TCS85), *T. viride* (R75) e *T. piluliferum* (F130) foram visualizados nos cortes histológicos do caule do sisal. Esse resultado demonstra estes isolados podem se estabelecer no tecido do sisal, desenvolvendo uma interação simbiótica com a planta.

Os achados nesse estudo são inovadores dentro da área do controle biológico e inéditos para a podridão vermelha do sisal, pois além de investigar a eficiência de biocontrole, através da anatomia vegetal, demonstra os efeitos a nível celular ocorridos nas plantas tratadas com os agentes de controle biológico. Em estudos futuros, o efeito biocontrolador dos isolados de *Trichoderma* spp. deve ser investigado sob condições de campo, além de identificar o(s) elicitore(s) responsáveis pelo processo de lignificação no sisal e o desenvolvimento de

bioprodutos a base desses isolados deve ser elaborado e testado no controle da podridão vermelha do sisal.