

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
AGRÍCOLA
CURSO DE MESTRADO**

**USO DE ISOLADOS BACTERIANOS NO CONTROLE DA
PODRIDÃO VERMELHA DO SISAL**

VALTER CRUZ MAGALHÃES

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

USO DE ISOLADOS BACTERIANOS NO CONTROLE DA PODRIDÃO VERMELHA DO SISAL

VALTER CRUZ MAGALHÃES

Engenheiro agrônomo

Cruz das Almas, 2011

Dissertação submetida ao Colegiado do Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e Embrapa Mandioca e Fruticultura, como requisito para obtenção de Grau de Mestre em Microbiologia Agrícola.

Orientador: Dr. Phellippe Arthur Santo Marbach

Co-Orientadora: Dr^a. Ana Cristina Fermino Soares

CRUZ DAS ALMAS - BAHIA

DEZEMBRO - 2013

FICHA CATALOGRÁFICA

M188u

Magalhães, Valter Cruz.

Uso de isolados bacterianos no controle da podridão vermelha do sisal / Valter Cruz Magalhães. – Cruz das Almas, BA, 2013.

93f.; il.

Orientador: Phellippe Arthur Santos Marbach.

Coorientadora: Ana Cristina Fermino Soares.

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

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

CDD: 633.577

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
AGRÍCOLA
CURSO DE MESTRADO**

**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE
VALTER CRUZ MAGALHÃES**

Dr. Phellippe Arthur Santos Marbach
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB
(Orientador)

Dr. Flávio Henrique Vasconcelos de Medeiros
Universidade Federal de Lavras - UFLA

Dr. Milton R. Abreu Roque
Universidade Federal da Bahia - UFBA

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA
DEZEMBRO – 2013**

À minha família que acreditou e contribui para esta realização, em especial à minha mãe Maria Benedita Assunção Cruz pelos momentos de amor, carinho e compreensão.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus por me conceder o dom da vida, por ser a base forte da mesma, e por me fazer bem mais que vencedor diante dos momentos difíceis em que pensei que não os superaria.

A minha mãe, por ser exemplo a ser seguido e pela confiança incondicional. Pelo seu amor caloroso, e por sua dedicação para com a minha vida, se importando e sonhando juntamente comigo os meus sonhos e projetos.

A toda minha família, pelo apoio, pelos conselhos e por acreditarem em mim. Às minhas irmãs, Jaci e Jack pelos momentos descontraídos e por fazerem parte da minha vida.

Ao meu orientador Dr. Phellippe Marbach, pela disposição, pelo evidente compromisso durante o período de orientação, pelo profissionalismo e preocupação, e pelos conselhos e ensinamentos que contribuíram para o meu aperfeiçoamento técnico-científico e amadurecimento pessoal.

À Dr^a Ana Cristina por sua confiança e dedicação durante o período de orientação. Obrigado por toda ajuda, pelos conselhos e por seu exemplo de profissionalismo, que sem dúvidas é algo a ser seguido.

Ao Dr. Jorge Teodoro de Souza, pela ajuda nos momentos de muitas dúvidas. Pelos conselhos profissionais, pela ajuda sem medir esforços e também pelos momentos de descontração (hora do café).

À Dra. Élide Corrêa, pela ajuda desde os trabalhos de TCC, e pela amizade.

Ao Dr. Carlos Lêdo pela contribuição nos momentos em que as dúvidas estatísticas surgiam.

Ao Prof. Bezerra pela atenção e pela significativa contribuição nesse trabalho.

Aos amigos Jefferson O. de Sá e Marcos Humberto S. Silva por todo tempo disposto na ajuda e construção dos trabalhos, principalmente os de campo. Sem a ajuda de vocês esse trabalho não teria se concretizado.

Aos meus amigos e colegas de curso, que através da amizade fizeram com que os momentos tristes se transformassem muitas vezes em momentos mais alegres. E também por fazerem os momentos alegres serem mais especiais ainda: Fenícia, Dani, Jack Andrade, Sheilinha, Carlos Henrique, Márcia, Adriana Fiuza, Leonardo Sathler, Diogo (meu irmão albino), Diogo (o novo micologista), Any, Carina, July Fernandes, Franciane, Marceley e outros. Aos agregados do Laboratório de Microbiologia Agrícola: Leonardo Barbosa e July Fernandes “best friends”. À

pessoa mais preocupada do mundo: Margarida (rsrsrs). E a toda a equipe de estagiários e técnicos do Laboratório de Microbiologia agrícola da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, por toda ajuda e apoio.

Aos amigos e irmãos da Residência Universitária Hospital que me proporcionaram tanta alegria.

Aos parceiros: Augustinho, Rafael Trocoli e Rafael Mota.

Aos três grandes amigos nas horas de descontração e principalmente nos momentos de discussão científica: Adailson, Juan e Zayda. Vocês são exemplos de profissionais. Agradeço pela amizade.

A todos aqueles que contribuíram de forma direta ou indireta na execução desse trabalho.

*“É preciso que eu suporte duas ou três larvas
Se quiser conhecer as borboletas.”*

Antoine de Saint-Exupéry

INDICE

INTRODUÇÃO

CAPÍTULO 1 – O sisal e a podridão vermelha: Potencial do uso de bactérias como agentes de biocotrole.....13

RESUMO.....14

ABSTRACT.....15

1.1 *Agave sisalana* Perrine ex Engelm.....16

1.2 Importância socioeconômica da cultura do sisal.....19

1.3 Aspectos fitossanitários.....21

1.4 *Aspergillus* spp. e a podridão vermelha do sisal.....22

1.5 O controle biológico de doenças de plantas.....27

1.5.1 Alguns agentes de biocontrole.....28

1.5.1.1 Bactérias como agentes de biocontrole.....29

1.5.1.2 Produção de substâncias antimicrobianas.....31

REFERÊNCIAS.....33

CAPÍTULO 2 – Uso de bactérias de restinga no controle da podridão vermelha do sisal.....43

RESUMO.....44

ABSTRACT.....45

1. INTRODUÇÃO.....46

2. MATERIAIS E MÉTODOS.....47

2.1. Microrganismos, condições de cultivo e suspensões.....47

2.2. Material Vegetal.....47

2.3. Antagonismo de cepas de bactérias contra fungos.....48

2.4. Inibição do crescimento micelial de *A. niger* por compostos voláteis de bactérias.....48

2.5. Efeito do sobrenadante de culturas de bactérias na germinação de esporos de *A. niger*.....49

2.6. Detecção in vitro de enzimas extracelulares (celulase, protease e quitinase).....50

2.7. Avaliação do biocontrole e eficiência dos antagonistas em casa de vegetação.....50

2.8. Controle da podridão vermelha do sisal (<i>A. niger</i>) em campo.....	51
2.9. Detecção por PCR de genes envolvidos com a síntese de antibióticos.....	51
2.10. Identificação molecular dos antagonistas.....	52
2.11. Análise genotípica de isolados bacteriano por meio de BOX-PCR.....	52
3. RESULTADOS.....	53
3.1. Antagonismo de cepas de bactérias contra fungos.....	53
3.2. Inibição do crescimento micelial de <i>A. niger</i> por compostos voláteis de bactérias.....	55
3.3. Efeito do sobrenadante de culturas de bactérias na germinação de esporos de <i>A. niger</i>	56
3.4. Detecção in vitro de celulases, proteases e quitinases.....	57
3.5. Avaliação do biocontrole dos antagonistas em casa de vegetação.....	57
3.6. Controle biológico da podridão vermelha do sisal em campo.....	58
3.7. Presença de genes envolvidos com a via biossintética de antibióticos.....	61
3.8. Identificação dos antagonistas.....	61
3.10. Análise genotípica de isolados bacteriano por meio de BOX-PCR.....	61
4. DISCUSSÃO.....	63
5. REFERÊNCIAS.....	71
ANEXO A.....	77
ANEXO B.....	78
ANEXO C.....	79
ANEXO D.....	81
ANEXO E.....	82
ANEXO F.....	84
ANEXO G.....	86
ANEXO H.....	88

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Cultivares plantados na região produtora de sisal. (A) Sisal comum (*Agave sisalana*) espécie mais cultivada na Bahia (SUINAGA et al., 2008); (B) Híbrido 11648, oriundo do cruzamento das espécies *A. angustifolia* x *A. amaniensis*, também conhecido como sisal de 400 folhas, desenvolvido na região Oeste da África; (C) Escapo - Inflorescência do sisal – local onde são formados os bulbilhos. 18
- Figura 2. Mapa da Bahia e destaque para o Território do Sisal (Adaptado de <http://ebda.ba.gov.br/pactofederativo/index.php?id+territorio-sisal> (Acesso em 12/2012). 22
- Figura 3. (A) A direita e a esquerda plantas de sisal saudáveis e, no meio planta apresentando os sintomas externos da podridão vermelha. Percebe-se o amarelecimento das folhas e o definhamento da planta; (B) Planta de sisal apresentando sintomas internos característicos da podridão vermelha do sisal..... 27
- Figura 4. *Aspergillus niger* – (A) Colônias em meio Czapek, incubadas por 10 dias a 25°C; (B) Colônias em meio Extrato de Malte, incubadas por 10 dias a 25°C; (C) Conidióforos – aumento de 490x; (D) Conídios – aumento de 1890x; (E) Conídios – aumento de 12270x Planta de sisal apresentando sintoma interno característico da doença podridão vermelha do sisal..... 27

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1 – Comparativo da área de produção de sisal no Brasil 2011 / 2012.....23
- TABELA 2 – Identificação dos isolados de *Aspergillus* utilizados em ensaios com bactérias e suas respectivas cidades de isolamento.....25

INTRODUÇÃO

Agave sisalana é uma planta que possui grande interesse econômico no Brasil, sendo uma excelente opção de cultivo frente às condições edafoclimáticas do Nordeste como um todo. A adaptação dessa monocotiledônea ao clima semiárido aliado a característica de resistência, às secas prolongadas e altas temperaturas fazem com que essa planta seja a principal cultura de várias áreas da região Nordeste do Brasil. Tal fato é tão significativo que no território baiano, o sisal representa o segundo produto na pauta de exportação agrícola (SILVA et al., 1993), estimando-se que aproximadamente 150 mil famílias vivam em função desta planta (PIZARRO et al., 1999).

No Nordeste brasileiro conhecem-se dois materiais de plantio, o sisal comum (*A. sisalana*), encontrada em maior predominância, e o híbrido 11648, fruto do cruzamento entre as espécies *A. angustifolia* x *A. amaniensis*, conhecida na região com o nome popular de Agave de 400 folhas (ALVES, SANTIAGO e LIMA 2005; SÁ, 2009; SOUZA SOBRINHO, SILVA e SILVA, 1985; SUINAGA, SILVA e COUTINHO, 2006).

A fibra do sisal, beneficiada representa cerca de 80 milhões de dólares em divisas para o Brasil, sendo este o maior produtor mundial com uma produção anual de 119 mil toneladas e geração anual de cerca de 101 milhões de dólares. A cadeia de serviços, também é responsável pela geração de mais de meio milhão de empregos diretos e indiretos, que começa com as atividades de manutenção das lavouras, colheita, desfibramento e beneficiamento da fibra e termina com a industrialização e confecção de artesanato (MATTOSO, FERREIRA e CURVELO, 1997; SILVA e BELTRÃO, 1999). Além da grande importância econômica, essa cultura também possui uma grande importância social, possibilitando a sobrevivência de aproximadamente 700.000 pessoas em toda região Nordestina (COUTINHO et al., 2006a).

No entanto, observa-se nos últimos anos um declínio desta cultura, expresso em reduções da área cultivada, produção e produtividade, onde os

problemas de origem fitossanitários são os que vêm causando danos mais consideráveis, como é o caso da podridão vermelha do sisal, causada pelo fungo *Aspergillus niger*. Esta doença afeta as principais áreas de produção de sisal da Bahia, Paraíba e Rio Grande do Norte desde a década de 70, atingindo níveis, considerados críticos a partir do ano de 1998 (COUTINHO et al., 2006a).

Essa doença é fatal para a planta infectada, que sobrevive por algum tempo, em função da natureza progressiva do apodrecimento causado pelo agente etiológico (EMBRAPA, 2010).

Diante deste cenário, alternativas vêm sendo exploradas na busca de meios para a prevenção e controle da doença em questão. Neste contexto, o controle biológico surge como uma alternativa viável e racional para o controle de microrganismos fitopatogênicos. Além de reduzir a utilização de defensivos agrícolas, a aplicação de microrganismos no sistema agrícola proporciona o incremento de processos biológicos conduzindo os mesmos a ambientes mais estáveis (MELO e AZEVEDO, 1998; VASILIAUSKAS et. al., 2004).

No primeiro capítulo deste trabalho abordam-se os principais aspectos referentes à cultura do sisal: aspectos botânicos, importância socioeconômica, e um maior enfoque aos aspectos fitossanitários. Da mesma forma também é discutido aspectos inerentes ao biocontrole de doenças de plantas com enfoque para a utilização de bactérias com tal potencial.

No segundo capítulo são apresentados os resultados referentes aos ensaios *in vitro* para análise do potencial de isolados bacterianos de restinga contra alguns fungos fitopatogênicos. Posteriormente esses testes foram direcionados para o controle do fungo *Aspergillus niger*. Nesse sentido, utilizamos como hipótese o fato de que os ambientes de restinga podem abrigar microrganismos com potencial para o controle da podridão vermelha do sisal. Também foram realizados testes em casa de vegetação e em campo para avaliar o comportamento desses isolados em condições *in vivo*.

O objetivo deste trabalho foi analisar o potencial de isolados bacterianos de restinga no controle biológico da podridão vermelha causada pelo fungo *Aspergillus niger*.

CAPÍTULO 1

**O Sisal e a Podridão Vermelha: Potencial do uso de bactérias
como agentes de biocontrole**

RESUMO

MAGALHÃES, V. C.; SOARES, A. C. F.; MARBACH, P. A. S. **O sisal e a podridão vermelha: potencial do uso de bactérias como agentes de biocontrole.** Cruz das Almas, 2013. 87 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

O sisal possui grande interesse econômico para o Brasil, por ser uma excelente opção de cultivo frente às condições climáticas do semiárido. O Brasil é o maior produtor mundial e os estados da Bahia, Paraíba, Rio Grande do Norte e Ceará são os principais produtores nacionais com 96,2%, 3,25%, 0,34 e 0,16% da produção, respectivamente. A fibra do sisal representa cerca de 80 milhões de dólares em divisas para o Brasil, além de gerar mais de meio milhão de empregos diretos e indiretos por meio da sua cadeia produtiva. No entanto os problemas de origem fitossanitários têm causado o declínio desta cultura. A podridão vermelha do sisal, causada pelo fungo *Aspergillus niger*, é a principal causa da decadência da cultura. Plantas afetadas por essa doença não se prestam ao desfibramento e morrem com o progresso da doença. Até o momento, não há descrito nenhum tipo de tratamento e a doença é fatal para a cultura. Neste contexto, o controle biológico é uma alternativa viável e o uso de bactérias é amplamente utilizado no controle de fitopatógenos. Portanto, neste capítulo foram revisados aspectos importantes da cultura do sisal. Por constituir um fator extremamente limitante no desenvolvimento da cultura do sisal, os aspectos fitossanitários são abordados, sendo dada uma atenção especial ao gênero *Aspergillus*. No trabalho são discutidos também diversos aspectos referentes ao controle biológico de doenças de plantas, com um enfoque especial para utilização de bactérias.

Palavras-chave: Fitossanidade; Controle biológico; *Agave sisalana*; *Aspergillus niger*;

ABSTRACT

MAGALHÃES, V. C.; SOARES, A. C. F.; MARBACH, P. A. S. **Sisal and the red rot disease: potential use of bacteria as bio-control agents.** Cruz das Almas, 2013. 87 p. Dissertation (Master's degree in Agricultural Microbiology). Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

The culture of Sisal (*Agave sisalana*) has economic prominence in Brazil due to its aptitude to grown under the unfavorable climatic conditions within the semiarid region. Brazil is the biggest word producer with the States of Bahia, Paraíba, Rio Grande do Norte and Ceará as the main domestic producers, with 96,2%, 3,25%, 0,34% and 0,16% of the national production respectively. Sisal's fiber represents about 80 million dollars in exportations for the country, besides more than half a million direct and indirect jobs generated by its production chain. However, plant disease problems had caused the deterioration of this culture. Red rot disease, caused by the fungus *Aspergillus niger*, is considered as the main disease for this culture and responsible for its decline. Plants infected by the pathogen are unsuitable for fiber production and end up dying with the disease progress. Until now, there is no treatment known for the disease, which is lethal for the culture. Within this context, biological control is a feasible alternative and the use of bacteria is widely used to control plant pathogens. Thus, in this chapter were revised important aspects of the Sisal's culture. Due to represent an extremely limiting factor to the development of the culture, the plant disease features are focused, with an emphasis to the *Aspergillus* Genera. In this work, different characteristics related to the biological control of plant diseases are also discussed, with a singular approach to the use of bacteria.

Keyword: Plant protection, Biological control, *Agave sisalana*, *Aspergillus niger*

1.1 *Agave sisalana* Perrine ex Engelm

Agave sisalana Perrine ex Engelm é uma planta de grande interesse econômico no Brasil, principalmente na região Nordeste. É uma importante produtora de fibra dura que ocupa destaque entre as plantas nativas características de regiões semidesérticas e quentes (MEDINA, 1954; NIKAM; BANSUDE; ANEESH KUMAR, 2003). É uma planta pertencente à classe das monocotiledôneas, família *Agavaceae*, estando dentro do gênero *Agave*, que abriga cerca de 300 espécies em diferentes regiões tropicais (MEDINA, 1954; JUDD et. al., 2007).

Acredita-se que o gênero *Agave* tem como centro natural de dispersão, a região geográfica compreendida entre o sudoeste dos Estados Unidos, México, América Central, Antilhas e Norte da América do Sul (MEDINA, 1954). Sendo a península de Yucatan (situada entre os paralelos 19° 41' e 21° 38' de latitude Norte, e os meridianos 87° 33' e 90° 25' de longitude Oeste de Greenwich), o local mais preciso de sua origem (ALVES; SANTIAGO; LIMA, 2005; MEDINA, 1954; SHARMA; VARSHNEY, 2012), trazida para o Brasil por volta de 1903, sendo amplamente distribuída nas regiões do Nordeste do Brasil e leste da África (SUINAGA; SILVA; COUTINHO, 2006).

O sisal é uma espécie xerófila adaptada a clima quente, alta luminosidade e estiagens prolongadas, o que caracteriza regiões semi-áridas (NIKAM; BANSUDE; ANEESH KUMAR, 2003), apresentando estruturas peculiares que lhe permite resistir a condições de aridez (SILVA; BELTRÃO, 1999). Segundo Oashi (1999), Medina (1954), Silva e Beltrão (1999) tais características relacionam-se com sua cutícula espessa e cerosa, rusticidade natural da planta, presença de folhas carnosas, metabolismo fotossintético do tipo CAM (Metabolismo do Ácido das Crassuláceas) e número reduzido de estômatos (BELTRÃO, 2006). Essas características permitiram a alta adaptação dessa espécie às condições de clima da região Nordeste do Brasil (SANTOS et al., 2009), sendo amplamente cultivada (MEDINA, 1954).

O sisal floresce apenas uma vez, sendo uma planta monocárpica, que emite um pendão floral próximo ao fim do seu ciclo vegetativo, tal estrutura é popularmente conhecida por flecha (Alves; SANTIAGO; LIMA, 2005), nesta floração são produzidos flores, frutos e sementes ou apenas bulbilhos. Os

bulbilhos surgem na panícula após a queda das flores (SUINAGA; SILVA; COUTINHO, 2006), e constituem mudas de propagação vegetativa (NIKAM; BANSUDE; ANEESH KUMAR, 2003;). Outro tipo de material de propagação vegetativa são os rebentos que surgem do rizoma da base da planta mãe (GONDIM; SOUZA, 2009; NIKAM; BANSUDE; ANEESH KUMAR, 2003).

A planta é uma espécie considerada de rara frutificação, no entanto existem técnicas que a induzem a produção de frutos. Por conta de perturbações ocorrentes no processo de meiose, essas plantas são limitadas a produzir sementes (GONDIM; SOUZA, 2009; GENTRY, 1982 citado por QUEIROZ et al., 2012).

O Brasil se destaca na produção de sisal, gerando receitas anuais que giram em torno de 200 milhões de reais (IBGE, 2011). E a Bahia é o maior estado produtor, respondendo por mais de 95% da produção nacional de fibra (IBGE, 2011).

No Nordeste brasileiro são conhecidos dois materiais de plantio, a espécie *A. sisalana* (o sisal comum) (Figura 1), que é encontrada em maior predominância, e também o híbrido 11648 (Figura 1), que é fruto do cruzamento entre as espécies *A. angustifolia* x *A. amaniensis*. O híbrido 11 648 é conhecido na região como Agave de 400 folhas, e foi desenvolvido na região Oeste da África (ALVES; SANTIAGO; LIMA, 2005; SUINAGA; SILVA; COUTINHO, 2006). Quando comparado com o sisal comum, o híbrido 11648 possui vantagem no quesito produção de fibra (SILVA et. al., 2008).

Segundo Suinaga, Silva e Coutinho (2006) o sisal comum (*A. sisalana*) possui qualidades interessantes para a indústria, qualidades essas intrínsecas a comprimento e resistência da folha, enquanto que o híbrido 11648 é mais resistente à seca, o que lhe dá a vantagem de poder ser colhido durante todo o ano. Quando comparado os dois genótipos, agave 11648 possui a desvantagem de exigir maior esforço do operador da máquina desfibradora.

Gondim e Souza (2009) afirmam que trabalhos de cruzamento, através do aproveitamento da produção de sementes de forma natural e artificial da espécie *A. sisalana*, são de essencial importância para o desenvolvimento de genótipos promissores. Sendo assim é importante que o melhoramento vise o desenvolvimento de características como a resistência a doenças e pragas, tolerância ao déficit hídrico, facilidade de cultivo entre outras.

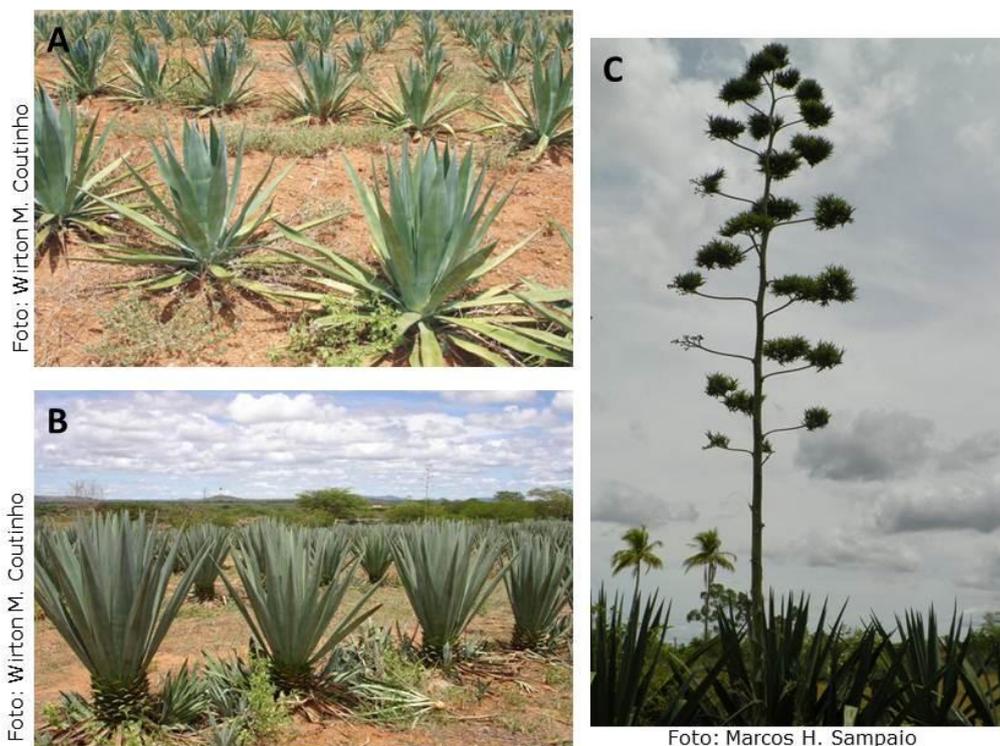


Figura 1. Cultivares plantados na região produtora de sisal. (A) Sisal comum (*Agave sisalana*) espécie mais cultivada na Bahia (SUINAGA et al., 2008); (B) Híbrido 11648, oriundo do cruzamento das espécies *A. angustifolia* x *A. amaniensis*, também conhecido como sisal de 400 folhas, desenvolvido na região Oeste da África; (C) Escapo - Inflorescência do sisal – local onde são formados os bulbilhos.

Analisando a importância da cultura do sisal para o Nordeste Brasileiro, Carvalho, Pinheiro e Silva (2007) realizaram estudos de modo a desenvolver um protocolo eficiente e econômico para a multiplicação de sisal *in vitro*, visto que essa técnica pode contribuir nos trabalhos de melhoramento da cultura para obtenção de plântulas livres de doenças, com alto potencial de produção de fibra.

Cunha Neto e Martins (2012) afirmam que as informações existentes referentes à anatomia de *A. sisalana* são inexpressivas, e que o conhecimento sobre detalhes como: espessura da cutícula, lignificação dos tecidos e desenvolvimento do parênquima poderiam de certa forma auxiliar aspectos envolvidos com a produção vegetal e compreensão da interação entre planta e patógenos (CUNHA NETO; MARTINS, 2012).

1.2 Importância socioeconômica da cultura do sisal

Entre os anos de 1965 e 1974 a produção de sisal no país chegou a 200 mil toneladas/ano. A partir dos anos 80 e 90 a substituição da fibra por produtos de origem sintética causou o declínio da produção, que alcançou valores inferiores a 150 mil toneladas. No entanto, no fim da década de 90 vários países passaram a valorizar a utilização de fibras de origem natural, substituindo as fibras sintéticas. Essa valorização motivou um novo aumento na produção. Ao mesmo tempo, a China inseriu-se no mercado como comprador, ajudando a impulsionar a produção de fibra de sisal (BRASIL, 2007).

Os principais países produtores são: Brasil, Tanzânia, Quênia, Venezuela, e Madagascar. China, África do Sul, Moçambique, Haiti e Cuba também contribuem com quantidades menores (SHARMA; VARSHNEY, 2012). No Brasil, destacam-se Bahia, Paraíba, Rio Grande do Norte e Ceará como os principais produtores, com respectivamente 96,2%, 3,25%, 0,34% e 0,16% da produção nacional (IBGE, 2011) (Tabela 1). A fibra produzida abastece cerca de 70% do mercado mundial de fibras duras (SILVA et. al., 2008).

A agaveicultura brasileira se concentra em áreas de pequenos produtores, com predomínio do trabalho familiar. Essa cultura acaba contribuindo como fonte de emprego e renda para um grande contingente de trabalhadores, constituindo um importante agente de fixação do homem à região semiárida nordestina. Sendo a única alternativa de cultivo com resultados econômicos satisfatórios em alguns dos municípios dessa região (MARTIN et al, 2009; SILVA; BELTRÃO, 1999; SUINAGA; SILVA; COUTINHO, 2006), servindo também, como atividade de apoio à pecuária, através do uso da planta na alimentação de bovinos ou até mesmo através da pastagem nativa intercalada nas áreas exploradas com a cultura (BANDEIRA; SILVA, 2006).

A produção baiana de sisal concentra-se no território do sisal, que é composto por 20 municípios da região semiárida da Bahia, abrangendo uma área geográfica de aproximadamente 21.256,50 Km² (Figura 2). Nessa região destacam-se como produtores os municípios de Campo Formoso, Conceição do Coité, Jacobina, Ourolândia, Queimadas, Santa Luz, Valente (ALVES; SANTIAGO; LIMA, 2005; IDR, 2011 [Acrescentar citação extra]).



Fonte: Adaptado de <http://ebda.ba.gov.br/pactofederativo/index.php?id+territorio-sisal> (Acesso em: 12/2012).

Figura 2: Mapa da Bahia e destaque para o Território do Sisal.

O beneficiamento da fibra de sisal no Brasil é capaz de gerar entre 500.000 a 700.000 empregos diretos e indiretos na região nordestina, através da sua cadeia produtiva, que começa com as atividades de manutenção das lavouras, colheita, desfibramento, beneficiamento e terminando com a industrialização e confecção de artesanato (MATTOSO; FERREIRA; CURVELO, 1997; SILVA; BELTRÃO, 1999; COUTINHO et. al., 2006a).

Pode-se perceber a importância do estado da Bahia na produção de sisal através da análise da tabela 1, que mostra o comparativo de área e produção no Brasil nos anos de 2011 e 2012.

O sisal se encaixa numa crescente tendência mundial, que privilegia a utilização de recursos naturais menos poluidores (MARTIN et al, 2009). Essa demanda mostra que o aumento desse consumo de fibra natural, exige o aumento da produção que abarque o crescente consumo para maior geração de emprego e renda na região semiárida (SILVA, 2008).

Tabela 1. Comparativo da área de produção de sisal no Brasil 2011 / 2012.

Estado	Área (ha)		Produção (t)		R.M. (Kg/ha)*	
	2011	2012	2011	2012	2011	2012
Bahia	274.274	253.059	278.065	242.852	1.014	950
Paraíba	9.268	8.945	7.506	9.408	810	808
Rio Grande do Norte	982	983	555	1.394	565	574
Ceará	475	485	994	765	2.093	2.093
Total Nordeste	284.999	263.472	287.120	249.126	1.007	946
Total Brasil	284.999	263.472	287.120	249.126	1.007	946

(*) Rendimento médio referente à produção (2011/2012); Fonte: Levantamento Sistemático da Produção Agrícola – IBGE.

Em relação ao uso, potencial e expectativa da utilização da fibra, a indústria automobilística tem mostrado destaque, ao experimentar a troca do uso de fibras sintéticas. Empresas como a Ford do Brasil, tem se destacado por colocar no mercado carros produzidos com peças fabricadas a partir da fibra de sisal, tal atitude sugere a redução da quantidade de petróleo utilizada, com possibilidade de exportação da tecnologia utilizada para suas montadoras em outros países (SALGADO, 2008 citado por SILVA, 2008).

A cadeia produtiva do sisal esta presente em todo território do sisal, isso a torna uma grande absorvedora de mão-de-obra, seja pelo trabalho agrícola do campo, como também pelo processo de transformação que possibilita a agregação de valor ao produto (SILVA, 2008).

1.3 Aspectos fitossanitários

Mesmo apresentando características de rusticidade, tolerância a estresse hídrico e resistência a ataque de insetos e microrganismos, em que outras culturas não se desenvolveriam bem, observa-se ao longo dos anos um declínio da cultura do sisal (MEDINA, 1954), expresso em reduções da área cultivada, da produção e da produtividade (Tabela 1). São vários os fatores que têm

contribuído para essa decadência, sendo os problemas de origem fitossanitários os que vêm causando danos mais efetivos (ALVES; SANTIAGO; LIMA, 2005; SUINAGA; SILVA; COUTINHO, 2006).

Medina (1954) acredita que os distúrbios funcionais ocasionados por desequilíbrio nutricional ou fatores climáticos desfavoráveis determinam os maiores prejuízos nas plantações de sisal, e cita vários exemplos de moléstias não parasitárias, inclusive as por carência de elementos. Em outro trabalho Medina (1943) demonstra que a deficiência de potássio no solo é fator marcante no desequilíbrio nutricional da planta, ocasionando a necrose da folha do sisal, caracterizando essa doença como um problema de ordem fisiológico.

Dentre as principais doenças que atacam o sisal no Brasil, temos a antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum agaves* Cav. (MEDINA, 1954); a podridão vermelha do caule, também chamada de podridão vermelha do sisal, cujos autores responsabilizam o fungo *Aspergillus niger* (COUTINHO et al., 2006b; SOARES et al., 2006). Lima et al., (1998) ainda relatam o fungo *Botryodiplodia theobromae* (Pat) (sin.: *Lasiodiplodia theobromae*) causando podridão vermelha do tronco em campos experimentais da Paraíba.

O fungo *Colletotrichum agaves* Cav. não constitui um problema fitossanitário de relevante importância, no entanto a podridão vermelha do sisal causada pelo fungo *A. niger* tem afetado de forma significativa as lavouras de sisal do Brasil (MEDINA, 1954; LIMA et. al., 1998; COUTINHO et. al., 2006; SOARES et al., 2006).

1.4 *Aspergillus* spp. e a podridão vermelha do sisal

O gênero *Aspergillus* constitui um grupo taxonômico diverso, e com relativa importância em diversos segmentos da sociedade. Organismos pertencentes a esse grupo possuem importância agrícola, científica, cultural, farmacêutica, industrial e patológica. Podem ser isolados de variadas fontes em variados ambientes, sendo encontrados em quase todos os locais do planeta, degradando uma ampla gama de substratos orgânicos naturais, crescendo e se reproduzindo em diferentes fontes, mostrando uma enorme flexibilidade nutricional (BAKER; BENNETT, 2008; VARGA et. al., 2011).

Espécies pertencentes ao gênero *Aspergillus*, constituem fungos

filamentosos pertencentes ao filo *Ascomycota*. O nome *Aspergillus* é dado a fase assexuada, enquanto que a fase sexuada é conhecida como *Emericella* (DEEPAKE, 2008). Este gênero é dividido em seções, sendo a seção *Nigri* uma das mais estudadas, pois abriga espécies com reconhecido potencial biotecnológico (ABARCA et. al., 2004).

Abarca et. al., (2004) afirmam que a taxonomia de *Aspergillus* (os da seção *Nigri*) esta longe de ser clara quando baseada apenas em caracteres morfológicos. Por conta disso, Varga et. al., (2011) ao diferenciarem espécies de *Aspergillus* pertencentes à seção *Nigri* oriundos de vários locais do mundo, utilizou de forma conjunta abordagens morfológicas, fisiológicas, ecológicas e moleculares.

A diversidade enzimática utilizada na nutrição dos membros do gênero *Aspergillus* é complementada pela capacidade metabólica de secretar inúmeras enzimas hidrolíticas, metabólitos secundários e ácidos orgânicos (BAKER; BENNETT, 2008; VARGA et. al., 2000 citado por VARGA et. al., 2011; ABARCA et. al., 2004).

Existem algumas espécies de *Aspergillus* que são capazes de causar doenças em animais. É o caso de *A. fumigatus*, que é associado a casos de asma e sinusite em pacientes imunodeficientes. A exposição do trato respiratório humano a *A. fumigatus* é capaz de causar um caso clínico de infecção denominado aspergilose (NIERMAN et. al., 2005). Baker e Bennett (2008) comentam a existência do aumento de casos de infecção por outras espécies de *Aspergillus*, citando *A. flavus*, *A. nidulans* como também possíveis causadores de infecções respiratórias.

Aspergillus niger durante décadas tem sido considerado como uma fábrica biológica de produção maciça de ácido cítrico, destinado à indústria de bebidas e doces (BAKER; BENNETT, 2008).

O Ácido cítrico é utilizado como acidulante primário em produtos como sucos, doces e geleias. Na indústria farmacêutica é utilizado como conservante de sangue, e também pode ser utilizado na fabricação de detergentes e no curtimento de couro (BAKER; BENNETT, 2008).

Além da produção de ácido cítrico, *A. niger* é citado como produtor de uma variedade de enzimas, como amilases, pectinases, celulasas, proteases, queratinases (GODFREY; WEST, 1996 citados por YU et. al., 2004; BANSAL et

al., 2012; KIM, 2003).

A espécie *A. niger* é relatada como o principal agente causador da podridão vermelha do sisal, que afeta as principais áreas de produção na Bahia, Paraíba e Rio Grande do Norte desde o ano de 1998 (COUTINHO et al. 2006a).

As folhas de sisal afetadas por essa doença perdem a sua turgescência, não se prestam ao desfibramento e morrem com o progresso dos sintomas (BOCK, 1965 citado por SÁ, 2013). Em plantas com estádios avançados da doença, as folhas tornam-se amareladas e o tronco completamente apodrecido.

A podridão vermelha é fatal para a planta infectada, que sobrevive por algum tempo, em função da natureza progressiva do apodrecimento causado pelo fungo. A podridão afeta plantas de sisal em todos os estágios fenológicos, desde rebentos a plantas no final do ciclo, e até o presente momento não existe evidências de tratamento (EMBRAPA, 2010).

A incidência da doença pode variar de 5% a 40% nas zonas de produção. A etiologia da doença foi determinada a partir do isolamento do agente, onde fragmentos das margens do tecido afetado foram cortados, desinfetados com hipoclorito de sódio a 1% por 1 minuto, lavados em água esterilizada e inoculados em meio BDA (COUTINHO et al. 2006b).

Para penetrar e infectar os tecidos da planta *A. niger* necessita de lesões mecânicas ou fisiológicas, com isso, ferimentos causados devido ao corte das folhas para o desfibramento e aqueles causados por instrumentos utilizados para realização de tratamentos culturais, constituem importantes meios para penetração desse fitopatógeno (SÁ, 2009). A doença é caracterizada por apresentar tecido com coloração vermelha que se estende desde o caule até a base da folha (figura 4), amarelecimento e murcha das folhas, aliado ao apodrecimento do tronco, o qual começa a se desprender facilmente do chão, levando a planta à morte (LIMA et al., 1998).

O primeiro relato da doença no Brasil se deu no estado da Paraíba (MACHADO, 1951 citado por MEDINA 1954), enquanto que no estado da Bahia pesquisadores da EBDA e da Embrapa Semiárido registraram a primeira ocorrência em um plantio comercial, no município de Santaluz (LIMA et al., 1998).

Sabe-se que alguns outros fungos também possuem a capacidade de causar doenças no sisal, no entanto, Coutinho et al., (2006b) e Soares et al.,

(2006) identificaram somente *A. niger* como agente causador da podridão vermelha do sisal nos estados da Bahia e Paraíba.

Estudos posteriores realizados por Silva (2012b) [Dissertação de Marcos Humberto] mostraram que outras espécies pertencentes ao gênero *Aspergillus* também são capazes de causar podridão vermelha ao sisal. É o caso das espécies *A. japonicus* e *A. terreus* que foram capazes de causar podridão vermelha em mudas de sisal em condições de casa de vegetação (SILVA, 2012b)

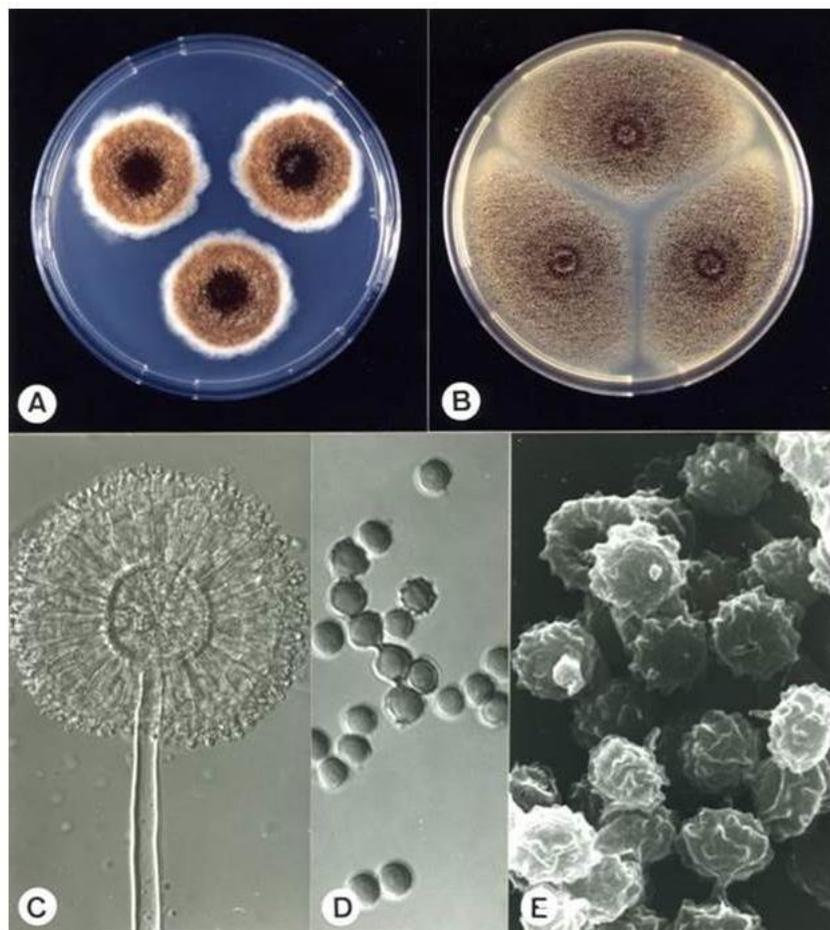


Figura 3. (A) A direita e a esquerda plantas de sisal sadias e, no meio planta apresentando os sintomas externos da podridão vermelha. Percebe-se o amarelecimento das folhas e o definhamento da planta; (B) Planta de sisal apresentando sintomas internos característicos da podridão vermelha do sisal.

Sua identificação foi feita com base em características morfológicas, no entanto sabe-se que atualmente existem outras diversas espécies pertencentes ao gênero *Aspergillus* (Figura 4), que são indistinguíveis de *A. niger* através de características morfológicas (GIRAUD et al., 2007 citado por SANTOS, 2011). Santos (2011) ainda comenta a necessidade de mais informações acerca da identidade e diversidade genética do fungo, para possibilidade de busca de alternativas mais eficazes para o controle da doença.

Até o momento, não há descrito nenhum tipo de tratamento e a doença é fatal para a cultura. A única forma de evitar maior disseminação da doença nas áreas de produção do nordeste brasileiro é a utilização de medidas preventivas, tais como arrancar e queimar plantas que apresentarem os sintomas; plantar rebentos vindos de áreas sadias para implantação de novos campos; utilizar o resíduo do desfibramento como adubação orgânica para evitar estresses

nutricionais à planta; e manter por maior tempo a umidade do solo e o plantio consorciado com outras culturas (SUINAGA; SILVA; COUTINHO, 2006).



Fonte: http://bcr.org.tw/fungi/fungal_detail.jsp?id=FU200802220004

Figura 4. *Aspergillus niger* - (A) Colônias em meio Czapek, incubadas por 10 dias a 25°C; (B) Colônias em meio Extrato de Malte, incubadas por 10 dias a 25°C; (C) Conidióforo – aumento de 490x; (D) Conídios – aumento de 1890x; (E) Conídios – aumento de 12270x.

Diante deste cenário a pesquisa busca por alternativa para prevenção e controle do fitopatógeno. Neste contexto, o controle biológico surge como uma alternativa viável e racional para o controle de organismos fitopatogênicos, por inserir no contexto agrícola a possibilidade de redução do uso de substâncias xenobióticas (agrotóxicos), responsáveis por prejudicar e poluir o meio ambiente, amenizando os efeitos negativos, principalmente de fungicidas. Além desses aspectos, existe o fato deste método ser econômico e compatível com as comunidades agrícolas de baixa renda (MELO; AZEVEDO, 1998).

1.5 O controle biológico de doenças de plantas

As perdas de produtividade devido à ocorrência de fitopatógenos são estimadas entre 25 e 100%, dependendo da cultura e da doença em questão (OLIVEIRA; URQUIAGA; BALDANI, 2003).

O controle de doenças em plantas, muitas vezes é dependente da utilização de cultivares resistentes em conjunto com fungicidas (ZHANG et. al., 2013). Entretanto, a criação de novas variedades resistentes é muitas vezes demorado, enquanto que o uso de produtos químicos é perigoso, por comprometer o equilíbrio ecológico (SOYTONG et. al., 2005).

Al-Mughrabi e colaboradores (2013) comentam que em alguns casos a falta de fungicidas e cultivares resistentes pode levar a busca por outros métodos de tratamento para algumas doenças, e nesse sentido os biopesticidas se destacam como interessantes ferramentas com potencial para a manutenção sustentável de doenças, em substituição de produtos químicos, e restringindo o desenvolvimento de resistência por parte dos fitopatógenos.

Estimular as relações entre os microrganismos como forma de incrementar os processos biológicos é mais interessante que substituir estes por insumos químicos (VASILIAUSKAS et al., 2004), conduzindo esses ecossistemas agrícolas a ambientes mais estáveis, diminuindo o aporte de insumos com o passar do tempo. A utilização de microrganismos nos sistemas agrícolas, sejam estes para o controle biológico ou para o aproveitamento de nutrientes, constitui uma importante ferramenta para obtenção de sistemas agrícolas mais equilibradas (MORANDI; BETTIOL, 2009).

De forma geral, existe uma tendência por parte da sociedade em relação aos setores de produção, no sentido de melhorar a qualidade dos alimentos oferecidos. O mercado europeu tem como exemplo, o estabelecimento de protocolos que visam principalmente a segurança alimentar dos consumidores. Vários países, inclusive o Brasil, já sentem a necessidade de implantação de sistemas mais sustentáveis, onde o controle biológico é ferramenta indispensável (LOPES, 2009; ZHANG et. al., 2013).

Junqueira e Gasparato (1991) definem controle biológico de doenças de plantas como a redução da densidade de inóculo ou das atividades determinantes para infecção da doença, através da ação de um ou mais

organismos. As atividades determinantes para infecção constituem crescimento, infectividade, agressividade, virulência e outras características que vão ser determinantes para o estabelecimento da doença (JUNQUEIRA; GASPAROTTO, 1991).

Outra definição que se encontra entre as mais bem aceitas entre os pesquisadores para o biocontrole de doenças de plantas diz que o mesmo constitui a redução da densidade do inóculo ou das atividades determinantes da doença, promovida por um ou mais organismos que não o homem, favorecidos naturalmente ou pela manipulação do seu habitat ou ambiente, hospedeiros ou antagonistas ou pela manipulação em massa de um ou mais antagonistas (BETTIOL; GHINE, 1995).

O controle biológico é fundamentado por mecanismo de interação entre os microrganismos envolvidos, que podem ser divididos em competição, antibiose e parasitismo, predação e indução da defesa do hospedeiro. Para o sucesso do antagonista é necessário que o mesmo tenha a capacidade de se multiplicar e colonizar a superfície da planta, mediante isso, o microrganismo estará apto para atuar por meio de um ou mais mecanismos (BETTIOL; GHINI, 1995).

Uma informação que de fato é importante nos estudos de antagonismo entre microrganismos, é que o antagonista não pode apenas ser um bom agente de controle nas condições *in vitro*, sendo necessária também a expressão da sua capacidade de permanecer e de manter sua relação de antagonismo no ambiente, isso nos leva a perceber que existe a necessidade de se conhecer as condições ecológicas que podem afetar o desempenho do agente selecionado. Para que o agente de biocontrole possa ser implantado como manejo de uma determinada enfermidade faz-se necessário que o mesmo tenha condições reais de ser efetivo, confiável e econômico, juntamente com os sistemas de aplicação que complementem a atividade biocontroladora (LUMSDEN; LOCKE, 1989).

1.5.1 Alguns agentes de biocontrole

São relatados na bibliografia diversos microrganismos que possuem ação comprovada no controle biológico de doenças das plantas contra fitopatógenos e insetos. São estes fungos, micorrizas, bactérias e rizobactérias (WALTERS; DANIEL, 2007).

1.5.1.1 Bactérias como agentes de biocontrole

O estudo de bactérias com ação benéfica sejam endofíticas, rizobactérias ou residentes do filoplano tem ganhado destaque e significativa importância no controle biológico de enfermidades que afetam a produtividade de diversas culturas agrícolas (CAMPOS SILVA et. al., 2008; ROMEIRO; GARCIA, 2009; PUSEY; STOCKWELL; MAZZOLA, 2009; ROMEIRO et. al., 2010; YANES et. al., 2012; AL-MUGHRABI et. al., 2013).

Bactérias podem atuar por antagonismo direto, como antibiose, competição por nutrientes, competição por nichos ecológicos, produção de sideróforos, predação e parasitismo, produção de enzimas, compostos voláteis inibitórios, interferência com fenômenos de *quorum sensing*, indução a resistência, ou através mais de um mecanismo (GERHARDSON, 2002; ROMEIRO; GARCIA, 2009).

Até a presente data foram identificados diferentes gêneros envolvidos com o biocontrole, estes incluem *Agrobacterium* (KERR 1972; NEW; KERR 1972; PENYALVER et. al., 2009), *Arthrobacter* (PAPASOTIRIOU et. al., 2013), *Acinetobacter* (AN et. al., 2010), *Azotobacter* (CAVAGLIERI; PASSONE; ETCHEVERRY, 2004) *Bacillus* (KILDEA et. al., 2008; ARAVIND et. al., 2009), *Burkholderia* (KANG et. al., 1998; KING; PARKE, 1993; PARKE, 1990; PARKE et. al., 1991; HEUNGENS; PARKE, 2001; OPELT; BERG, 2004; AN et. al., 2010) *Collimonas* (BOER et. al., 1998; ADESINA et. al., 2007; OPELT; BERG, 2004; KAMILOVA; LEVEAU; LUGTENBERG, 2007), *Miamiensis* (AN et. al., 2010), *Pantoea* (BONATERRA et. al., 2003; REZZONICO et. al., 2011), *Pseudomonas* (PARKE et. al., 1991; DANDURISHVILI et. al., 2011), *Serratia* (GUTIÉRREZ-ROMÁN et. al., 2011; *Stenotrophomonas* (ZHANG; YUEN, 1999) e *Streptomyces* (RAAIJMAKERS; MAZZOLA, 2012; BALTZ, 2008).

Moura e Romeiro (1999) ao testar a atividade *in vitro* de 190 isolados de actinobactérias contra 52 isolados de *Ralstonia solonacearum*, obtidos de vários hospedeiros em regiões diferentes, encontrou um amplo espectro de atividade antagonística. No trabalho de Carrer Filho e colaboradores (2008) a actinobactéria *Nocardioides thermolilacinus* (isolamento UFV-SON-17) foi capaz de produzir substâncias antimicrobianas contra vários fitopatógenos do tomateiro. Em condições de casa de vegetação *N. thermolilacinus* foi capaz de

reduzir a severidade de doenças causadas por: *Alternaria solani*, *Stemphylium solani*, *Corynespora cassiicola*, *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria* *Pseudomonas syringae*. (CARRER FILHO et. al., 2008)

Com o intuito de encontrar agentes de controle biológico contra a podridão radicular do amendoim (*Arachis hypogaea* L.) causado pelo fungo *A. niger*, Yuttavanichakul et. al., (2012) testaram a capacidade de 765 isolados de *Bradyrhizobium* e 350 rizobactérias promotoras de crescimento (PGPR) isolados de solo. Desses apenas quatro isolados de PGPR demonstraram capacidade de inibir o crescimento de *A. niger* in vitro e colonizar as raízes de amendoim. Sendo os quatro melhores isolados selecionados: *Bacillus megaterium*, *B. subtilis*, *B. subtilis* subsp. *subtilis* e *Pseudomonas* sp. Desses quatro, apenas dois isolados (*Bacillus megaterium* e *B. subtilis*) foram capazes de realizar o controle da podridão radicular do amendoim in vivo (YUTTAVANICHAKUL et al., 2012).

Yanes e colaboradores (2012) testaram uma coleção de 738 isolados *Pseudomonas* fluorescentes, obtidos da rizosfera de plantas de Alfafa (*Medicago sativa* L.) de três regiões diferentes, representando três diferentes sistemas agrícolas uruguaios, visando controlar o tombamento (damping-off) causado por *Pythium debaryanum*. Cinco isolados demonstraram significativa capacidade de controlar a doença e promover o incremento de biomassa vegetal. Avaliou-se também a presença de genes envolvidos na síntese de antibióticos (YANES et al., 2012).

An et al., (2010) testaram 125 isolados bacterianos da rizosfera de plantas anuais de diversas áreas costeiras na Coreia, encontrando quatro isolados capazes de induzir a resistência sistêmica (ISR) e promover crescimento em mudas de tomate contra *Phytophthora infestans*. Esses quatro isolados foram selecionados como potenciais agentes de biocontrole contra a requeima (late blight) e foram identificados como *Burkholderia gladioli*, *Miamiensis avidus*, *Acinetobacter quenospora* e *Bacillus cereus* (AN et. al., 2010).

Na tentativa de controlar a podridão seca (dry rot) em batatas armazenadas Recep e colaboradores (2009) testaram a capacidade antagonística de 17 isolados PGPR contra *Fusarium sambucinum*, *Fusarium oxysporum* e *Fusarium culmorum*. Sendo que todos os isolados testados exerceram ação inibitória em placa de Petri contra um ou mais espécies de *Fusarium*, mas apenas um desses isolados (*B. cepacia*) teve efeito significativo

no controle da doença causada por três diferentes espécies de fungos em duas cultivares diferentes de batata (RECEP et. al., 2009).

1.5.3.2 Produção de substâncias antimicrobianas

Bactérias, assim como outros organismos vivos, são capazes de perceber alterações no ambiente e a presença de outros seres vivos à sua volta, sendo isso fundamental para a sua sobrevivência. Para se estabelecerem num determinado ambiente cheio de mudanças, competitivo e adverso, bactérias precisam ajustar de forma rápida e precisa a expressão dos seus genes em respostas a sinais de potenciais ameaças do ambiente e da microbiota presente (ROMEIRO, 2007a).

Os estudos feitos ao longo das últimas décadas têm demonstrado que metabólitos como antibióticos, enzimas e compostos voláteis produzidos por bactérias (de solo e associadas a plantas), são fatores chaves para a supressão de fitopatógenos (HAAS; DEFAGO, 2005; FERNANDO et. al., 2005; LUGTENBERG; KAMILOVA, 2009; LI et. al., 2012; AL-MUGHRABI et. al., 2013). Muitos desses microrganismos produzem substâncias com diferentes graus de atividade contra fungos específicos, ou exibem atividade de largo espectro (RAAIJMAKERS; MAZZOLA, 2012).

Para proliferar e sobreviver em seus micro-habitat as bactérias precisam desenvolver múltiplas estratégias para concorrer e afastar outros organismos (RAAIJMAKERS; MAZZOLA, 2012). Nesse contexto, a produção de metabólitos antimicrobianos constitui um fator importante na adaptação desses microrganismos, permitindo com que estes possam responder adequadamente aos microrganismos vizinhos (BERLEMAN; KIRBY, 2009).

Antibióticas são definidas por Thomashow et. al. (1997) como sendo um grupo de compostos orgânicos quimicamente heterogêneo de baixo peso molecular produzidos por microrganismo, capazes de prejudicar o crescimento ou as funções metabólicas de outros microrganismos.

Vários gêneros e espécies de bactérias possuem a capacidade de produzir substâncias antimicrobianas em condições *in vitro*, estes em sua maioria foram isolados em diferentes solos e também em eucariontes como plantas, insetos e nematoides (RAAIJMAKERS; MAZZOLA, 2012).

O gênero *Streptomyces* é considerado como um dos principais grupos de actinobactérias produtores de antimicrobianos em solos, que podem ser também encontrados em associação com plantas e insetos. Até o presente, mais de 7000 diferentes compostos secundários foram descritos, isolados de *Streptomyces*, sendo muitos desses antibióticos (RAAIJMAKERS; MAZZOLA, 2012; BALTZ, 2008).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABARCA, M. L. et. al., Taxonomy and significance of black aspergilli. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 86, p. 33-49, 2004.

ADESINA, M. F.; LEMBKE, A.; COSTA, R.; SPEKSNIJER, A.; SMALLA, K. Screening of bacterial isolates from various European soils for in vitro antagonistic activity towards *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum*: Site-dependent composition and diversity revealed. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 39, n. 11, p. 2818-2828, Nov. 2007.

ANDRADE, D.X. de. **Instruções para o cultivo do sisal**. João Pessoa: Comissão Executiva do Sisal, 1962. 24p.

AGOSTINO, F.; MORANDI, M. A. B. Análise da viabilidade comercial de produtos à base de *Bacillus subtilis* e *Bacillus pumilus* para o controle de fitopatógenos no Brasil. In: BETITOL, W.; MORANDI, M. A. B. (Eds.) **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariuna: Embrapa Meio Ambiente, p.298-316, 2009.

AL-MUGHRABI, K. I.; VIKRAM, A.; PETERS, R. D.; HOWARDS, R. J.; GRANT, L.; BARASUBIYE, T.; LYNCH, K.; POIRIER, R.; DRAKE, K. A.; MACDONALD, I. K.; LISOWSKI, S. L. I.; JAYASURIYA, K. E. Efficacy of *Pseudomonas syringae* in the management of potato tuber diseases in storage. **Biological Control**, v. 63, p. 315-322, 2013.

ALVES, M. O.; SANTIAGO, E. G.; LIMA, A. R. M. **Diagnóstico sócioeconômico do setor sisaleiro do Nordeste brasileiro**. Fortaleza, Banco do Nordeste do Brasil, 2005, (Série Documentos do ETENE n° 04).

ANDRADE, D.X. de. **Instruções para o cultivo do sisal**. João Pessoa: Comissão Executiva do Sisal, 1962. 24p.

AN, Y.; KANG, S.; KIM, K.; HWANG, B. K.; JEUN, Y. Enhanced defense responses of tomato plants against late blight pathogen *Phytophthora infestans* by pre-inoculation with rhizobacteria. **Crop Protection**, v. 29, p. 1406-1412, 2010.

ARAVIND, R.; KUMAR, A.; EAPEN, S. J.; RAMANA, K. V. Endophytic bacterial flora in root and stem tissues of black pepper (*Piper nigrum* L.) genotype: isolation, identification and evaluation against *Phytophthora capsici*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 48, p. 58-64, 2009.

BAKER, S. E.; BENNETT, J. W. An Overview of the Genus *Aspergillus*. In: GOLDMAN, G. H.; OSMANI, S. A. (Ed.). **The Aspergilli: Genomics, Medical Aspects, Biotechnology, and Research Methods**. Boca Raton: CRC Press, 2008. p. 3-11.

BALTZ, R. H. Renaissance in antibacterial Discovery from actinomycetes. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 8, p. 557-563, 2008.

BANDEIRA, D.A.; SILVA, O.R.R.F. Aproveitamento de resíduos. In: ANDRADE, W. (org.). **O sisal no Brasil**. Salvador: SINDIFIBRAS; Brasília, DF. Apex, 2006. cap.5, p.56-61.

BANSAL, N. et al. Production of cellulases from *Aspergillus niger* NS-2 in solid state fermentation on agricultural and kitchen waste residues. **Waste Management**, Chandigarh, v. 32, p. 1341-1346, 2012.

BARRA, V. R.; SILVA, R. da; FERRAZ, H. G. M.; MACAGNA, D.; SILVA, H. S. A.; MOURA, A. B.; HALFELD-VIEIRA, B. de A.; MENDONÇA, H. L.; VIEIRA JÚNIOR, J. R. Potencialidade antagonística detectada em alguns procaríotas agentes de biocontrole de enfermidades de plantas. **Summa phytopathologica**, Botucatu, v. 34, n. 2, jun. 2008.

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

BERLEMAN, J. E.; KIRBY, J. R. Deciphering the hunting strategy of a bacterial wolfpack. **FEMS Microbiology Review**, v. 33, p. 942-57, 2009.

BETTIOL, W. Componentes do Controle Biológico de Doenças de Plantas. In: BETTIOL, W. (Ed.). **Controle Biológico de Doenças de Plantas**. Jaguaçuana: Embrapa-CNPMP, p. 1-5, 1991.

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

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

BETTIOL, W.; GHINI, R. Proteção de plantas em sistemas agrícolas alternativos. In: CAMPANHOLA, C.; BETTIOL, W. (Eds.). **Métodos alternativos de Controle Fitossanitário**. Jaguaçuana. Embrapa Meio Ambiente. 2003. Pp. 79-95.

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

BOER, W. D.; GUNNEWIEK, J. A. K.; LAFEBER, P.; JANSE, J. D.; SPIT, B. E.; WOLDENDORP, J. W. Anti-fungal properties of chitinolytic dune soil bacteria. **Soil Biology and Biochemistry**. v. 30, n. 2, p. 119-274, Feb. 1998.

BONATERRA, A.; MARI, M.; CASALINI, L.; MONTESINOS, E.; Biological control of *Monilinia laxa* and *Rhizopus stolonifer* in postharvest of stone fruit by *Pantoea agglomerans* EPS125 and putative mechanisms of antagonismo. **International Journal of Food Microbiology**, v. 84, n. 1, p. 93-104, Jul. 2003.

BRASIL. MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO AGRÁRIO. SECRETARIA DE DESENVOLVIMENTO TERRITORIAL. Território do Sisal – Bahia. Brasília, 2007.

CAI, W.; YAN, Y.; LI, L. The earliest records of insect parasitoids in China. **Biological control**. v. 32, n. 1, p. 8-11, 2005

CAMPOS SILVA, J. R. et al. Control with endophytic bacteria and *in vitro* inhibition of *Pseudomonas syringae* pv *tomato*, agent of bacterial speck of tomato. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, Lavras, n. 4, p. 1062-1072, Jul/Ago. 2008.

CARRER FILHO, R.; ROMEIRO, R. S.; GARCIA, F. A. Biocontrole de doenças da parte aérea do tomateiro por *Nocardioides thermophilacinus*. **Tropical Plant Pathology**, v. 33, p. 457-460, 2008.

CARVALHO, J. M. F. C.; PINHEIRO, M. P. N.; SILVA, D. M. S. **Otimização da multiplicação de bulbo de sisal *in vitro***. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2007. 2 p. (Circular Técnica, 107).

CAVAGLIERI, L.; PASSONE, A.; ETCHEVERRY, M. Screening procedures for selecting rhizobacteria with biocontrol effects upon *Fusarium verticillioides* growth and fumosinin B1 production. **Research in Microbiology**, v. 155, n. 9, p. 747-754, Nov. 2004.

CHIN-A-WOENG, T. F. C.; BLOEMBERG, G. V.; LUGTENBERG, B. J. J. Phenazines and their role in biocontrol by *Pseudomonas* bacteria. **New Phytologist**, v.157, p.503-523, 2003.

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

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

CUNHA NETO, I. L.; MARTINS, F. M. Anatomia dos órgãos vegetativos de *Agave sisalana* PERRINE ex ELGELM (AGAVACEAE). **Revista Caatinga**, v. 25, n. 2, p. 72-78, 2012.

DANDURISHVILI, N.; TOKLIKISHVILI, N.; OVADIS, M.; ELIASHVILI, P.; GIORGOBIANI, N.; KESHELAVA, R.; TEDIASHVILI, M.; VAINSTEIN, A.; KHMEL, I.; SZEGEDI, E.; CHERNIN, L. Broad-range antagonistic rhizobacteria *Pseudomonas fluorescens* and *Serratia plymuthica* suppress *Agrobacterium* crown gall tumours on tomato plants. **Journal of Applied Microbiology**, v. 110, n. 1, p. 341-352, Jan. 2011.

DEEPAKE, U. Aero-microbiological studies of Moisture Affected Buildings in the Indoor Environment. **Journal of Young Investigators**, v. 19, Dec. 2008.

EMBRAPA – Cultivo do Sisal. Disponível em: (<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Sisal/CultivodoSisal/doencas.html>). Data de Acesso: 25 de Maio de 2010.

FARR, D.F.; AIME, M.C.; ROSSMAN, A.Y.; PALM, M.E. Species of *Colletotrichum* on Agavaceae. **Mycological Research** 110 p.1395-1408, 2006.

FERNANDO, W. G. D.; RAMARATHNAM, R.; KRISHNAMOORTHY, A. S.; SAVCHUK, S. C. Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 37, p. 955-964, 2005.

FERRAZ, H. G. M.; ROMEIRO, R. da S.; GARCIA, F. A. de O.; SOUZA, A. NEVES de. Biocontrole da mancha-alvo do tomateiro por *Bacillus cereus* em Função do Modo de Dispensa na Planta. **Revista Tropic – Ciências Agrárias e Biológicas**. v.2, n. 2, p.35-39, 2008.

GOLDMAN, G. H.; OSMANI, S. A. (Ed.). **The Aspergilli: Genomics, Medical Aspects, Biotechnology, and Research Methods**. Boca Raton: CRC Press, 2008. p. 3-11.

GERHARDSON, B. Biological substitutes for pesticides. **Trends in Biotechnology**, London, v. 20, n. 8, p. 338-343, 2002.

GONDIM, T. M. de S.; SOUZA, L. C. de. Caracterização de frutos e sementes de sisal, Campina Grande: Embrapa algodão, 2009, 6p. (Embrapa Algodão. Circular Técnica, 127).

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

GUTIÉRREZ-ROMÁN, M. I.; HOLGUÍN-MELÉNDEZ, F.; BELLO-MENDOZA, R.; GUILLÉN-NAVARRO, K.; DUNN, M. F.; HUERTA-PALACIOS, G. Production of prodigiosin and chitinases by tropical *Serratia marcescens* strains with potential to control plant pathogens. **World Journal Microbiology and Biothechnology**, v. 28, n. 1, p. 143-153, Jan. 2011.

HAAS, D.; DEFAGO, G. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, p. 307-319, Apr. 2005.

HEUNGENS, K.; PARKER, J. L. Postinfection biological control of oomycete pathogens of pea by *Burkholderia cepacia* AMMDR1. **Biological Control**, v. 91, n. 4, p. 383-391, 2001.

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

JUDD, W. S. et al. **Plant systematics: a phylogenetic approach**. 3. ed. Massachusetts: Sinauer Associates Inc., 565 p., 2007.

JUNQUEIRA, N. T.V.; GASPAROTTO, L. Controle Biológico de fungos estomáticos causadores de doenças foliares em seringueira. In: BETTIOL, W., (ED.). **Controle biológico de doenças de Plantas**. Jaguaraúna. CNPDA/EMBRAPA, p.307 – 331, 1991.

KAMILOVA, F.; LEVEAU, J. H. J.; LUGTENBERG, B. *Collimonas fungivorans*, an unpredicted *in vitro* but efficient *in vivo* biocontrol agent for the suppression of tomato foot and root rot. **Environmental Microbiology**, v. 9, n. 6, p. 1597-1603, Jun. 2007.

KANG, Y.; CARLSON, R.; THARPE, W.; SCHELL, M. A. Characterization of genes involved in biosynthesis of a novel antibiotic from *Burkholderia cepacia* BC11 and their role in biological control of *Rhizoctonia solani*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 10, p. 3939-3947, Oct. 1998.

KERR, A. Biological control of crown gall: Seed inoculation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 35, p. 493-497, Sep. 1972.

KILDEA, S. et al. *Bacillus megaterium* shows potential for the biocontrol of septoria tritici blotch of wheat. **Biological Control**, v. 47, p. 37-45, 2008.

KIM, J. D. Keratinolytic Activity of Five *Aspergillus* Species Isolated from Poultry Farming Soil in Korea. **Mycobiology**, Seoul, v. 31, p. 157-161, 2003.

KING, E. B.; PARKE, J. L. Biocontrol of *Aphanomyces* root rot and *Pythium* damping-off by *Pseudomonas cepacia* AMMD on four pea cultivars. **Plant Disease**, v. 77, p. 1185–1188, 1993.

KUPPER, K. C.; FERNANDES-GIMENES, N.; GOES, A. Controle biológico de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. **Fitopatologia Brasileira**, v.28, p. 251-257. 2003.

LI, Q.; NING, P. ZHENG, L.; HUANG, J.; LI, G.; HSIANG, T. Effects of volatile substances of *Streptomyces globisporus* JK-1 on control of *Botrytis cinerea* on tomato fruit. **Biological Control**, v. 61, p. 113-120, 2012.

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

LOPES, R. B. A industrialização no controle biológico: produção e comercialização de microrganismos no Brasil. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. (Eds.). **Biocontrole de Doenças de Plantas: Uso e Perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, p. 15-28, 2009

LUGTENBERG, B.; KAMILOVA, F.; Plant-growth-promoting rhizobacteria. **Annual Review Microbiology**, v. 63, p. 541-556, Oct. 2009.

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

MARTIN, A. R.; MARTINS, M. A.; MATTOSO, L. H. C.; SILVA, O. R. R. F. Caracterização química e estrutural de fibra de sisal da variedade *Agave sisalana*. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, São Carlos, v. 19, n. 1, 2009.

MATTOSO, L. H. C.; FERREIRA, F. C.; CURVELO, A. A. S. - "Lignocellulose-Plastic Composites", Leão, A. L.; Carvalho, F. X.; Frollini, E. (ed.), USP & UNESP, São Paulo (1997).

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

MEDINA, J. C. A necrose na base da folha do sisal. **Bragantia**, Campinas, v. 3, n.4, abr. p. 73 – 84, 1943.

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

MORANDI, M. A. B.; BETTIOL, W. Controle Biológico de Doenças de Doenças de Plantas no Brasil. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. (Eds.). **Biocontrole de Doenças de Plantas**: Uso e Perspectivas. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, p. 7-14, 2009.

MOURA, A. B.; ROMEIRO, R. S. *In vitro* evaluation of actinomycetes as antagonists to *Ralstonia solanacearum*. **Ciência e Agrotecnologia**, v.23, p. 281-288, 1999.

NEW, P. B.; KERR, A. Biological control of crown gall: Field measurements and glasshouse experiments. **Journal of Applied Microbiology**, v. 35, p. 279-287, Jun. 1972.

NIERMAN, W. C. et. al. Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. **Nature**, v. 438, p. 1151-1156, 2005.

NIKAM, T. D.; BANSUDE, G. M.; ANEESH KUMAR, K. C. Somatic embryogenesis in sisal (*Agave sisalana* Perr. ex. Engelm). **Plant cell reports**, v. 22, n. 3, p. 188-194, out. 2003.

OASHI, M.C.G. Estudo da Cadeia Produtiva como Subsídio para Pesquisa e Desenvolvimento do Agronegócio do sisal na Paraíba. Universidade Federal de Santa Catarina; Florianópolis – SC, 1999 (tese de doutorado).

OLIVEIRA, A. L. M.; URQUIAGA, S.; BALDANI, J. I. **Processos e mecanismos envolvidos na influencia de microrganismos sobre o crescimento vegetal**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 40p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 161), 2003.

OPELT, K.; BERG, G. Diversity and antagonistic potential of bacteria associated with bryophytes from nutrient-poor habitats of the Baltic Sea Coast. **Applied Environmental Microbiology**, v. 70, n. 11, p. 6569-6579, Nov. 2004.

PAPASOTIRIOU, F. G. et al., Olive mill wastes: A source of resistance for plants against *Verticillium dahliae* and a reservoir of biocontrol agents. **Biological Control**, v. 67, n. 1, p. 51-60, 2013

PARKE, J. L. Population dynamics of *Pseudomonas cepacia* in the pea spermosphere in relation to biocontrol of *Pythium*. **Phytopathology**, n. 80, p. 1307–1311, 1990.

PARKE, J. L.; RAND, R.E.; JOY, A. E.; KING, E. B. Biological control of *Pythium* damping-off and *Aphanomyces* root rot of peas by application of *Pseudomonas cepacia* or *Pseudomonas fluorescens* to seed. **Plant Disease**, v. 75, p. 987–992, 1991.

PENYALVER, R.; OGER, P. M.; SU, S.; ALVAREZ, B.; SALCEDO, C. I.; LÓPEZ, M. M.; FARRAND, S. K. The S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase gene *ahcy* of *Agrobacterium radiobacter* k84 is required for optimal growth, antibiotic production, and biocontrol of crown gall disease. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 22, n. 6, p. 713-724, 2009.

PIZARRO, A. P. B.; OLIVEIRA FILHO, A. M.; PARENTE, J. P.; MELO, M. T. V.; SANTOS, C. E.; LIMA, P. R. O aproveitamento do resíduo da indústria do sisal no controle de larvas de mosquitos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 32, p. 23-29, 1999.

PUSEY, P. L.; STOCKWELL, V. O.; MAZZOLA, M. et al. Epiphytic bacteria and yeasts on apple blossoms and their potential as antagonists of *Erwinia amylovora*. **Phytopathology**, Saint poul, v. 99, n. 5, p. 571-581, 2009.

QUEIROZ, S. R. O. D. et al., Análise cromossômica em bulbilhos de sisal (*Agave* spp.) cultivados em diferentes municípios baianos, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, v. 26, n. 4, p. 842-848, 2012.

RAAIJMAKERS, J. M.; VLAMI, M.; de SOUZA, J. T. Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 81, p. 537–547, 2002.

RAAIJMAKERS, J. M.; MAZZOLA, M. Diversity and natural functions of antibiotics produced by beneficial and plant pathogenic bacteria. **Annual Review Phytopathology**, v. 50, p. 403-424, 2012.

RAMOS, D. M. B.; SILVA, C. F.; BATISTA, L. R.; SCHWAN, R. F. Inibição *in vitro* de fungos toxigênicos por *Pichia* sp. e *Debaryomyces* sp. isoladas de frutos de café (*Coffea arábica*). **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 32, n.3, p. 397-402, 2010.

RECEP, K.; FIKRETTIN, S.; ERKOL, D.; CAFER, E. Biological control of the potato dry rot caused by *Fusarium* species using PGPR strains. **Biological Control**, v. 50, p. 194-198, 2009.

REZZONICO, F.; KAMBER, T.; BLOM, J.; GOESMANN, A.; ISHIMARU, C. A.; FREY, J. E.; STOCKWELL, V. O.; DUFFY, B. Metabolic versatility and antibacterial metabolite biosynthesis are distinguishing genomic features of the fire blight antagonist *Pantoea vagans* C9-1. **Plos One**, v. 6, n. 7, p. 1-8, Jul, 2011.

RODRIGUES, R. **Caracterização morfológica e patológica de *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl., agente causal das podridões de tronco e raízes da videira.** Campinas, p. 68. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical). 2003, IAC.

ROMEIRO, R. da S. Controle biológico de doenças de plantas: Fundamentos. Viçosa: Editora UFV, 2007a. 269p.

ROMEIRO, R. S.; GARCIA, F. A. O. Indução de resistência em plantas a patógenos por eliciadores de natureza bacteriana. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. (Eds.). **Biocontrole de doenças de plantas: Uso e perspectivas.** Jaguaraúna: Embrapa Meio Ambiente, p. 85-99, 2009.

ROMEIRO, R. S. et al. Evidence that the biocontrol agente *Bacillus cereus* synthesize protein that can elicit increased resistance of tomato leaves to *Corynespora cassiicola*. **Tropical Plant Pathology**, Lavras, v. 35, n. 1, p. 11-15, Feb. 2010.

RYAN, A. D.; KINKEL, L. L.; SCHOTTEL, J. L. Effect of pathogen isolates, potato cultivar, and antagonist strain on potato scab severity and biological control. **Biocontrol Science and Technology**, v.14, p.301-311, 2004.

SÁ, J. O. **Patogênese de *Aspergillus niger* e biocontrole da podridão vermelha do sisal por *Trichoderma* spp.** Cruz das Almas, 2009. 65 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias). UFRB, 2009.

SÁ, J. O. **Controle biológico da podridão vermelha do sisal (*Agave sisalana* Perrine) com *Trichoderma* spp. e Actinobactérias.** Cruz das Almas, 2013. 136p. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias). UFRB, 2013.

SALGADO, A. L. B.; CIARAMELLO, D.; AZZINI, A. Melhoramento de *Agave* por hibridação. **Bragantia**, 38, n. 1, p. 1-6. 1979.

SANTOS, J. D. G. et al. Antimicrobial activity of *Agave sisalana*. **African Journal of Biothechnology**, v. 8, n. 22, p. 6181-6184, 2009.

SANTOS, P. O. **Espécies de *Aspergillus* associadas à podridão vermelha do caule do sisal.** Cruz das Almas, 2011. 67p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola), UFRB, 2011.

SILVA, S. L. **A Gestão Social no Território do Sisal**: Uma análise do conselho regional de desenvolvimento rural sustentável da região sisaleira da Bahia. Santo Antônio de Jesus, 2008. 169 p. Dissertação (Mestrado em Cultura, Memória e Desenvolvimento Regional). UNEB, 2008.

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

SILVA, O. R. R. F. da; COUTINHO, W. M.; CARTAXO, W. V.; SOFIATTI, V.; SILVA FILHO, J. L. CARVALHO, O. S. **Cultivo do sisal no Nordeste Brasileiro**, Campina Grande: Embrapa Algodão, 2008, 24p. (Embrapa Algodão. Circular Técnica, 123).

SILVA, A.L.V.; OLIVEIRA I.F.; COSTA, I.S.; ESTRELA, L. APAEB: uma história de fibra, luta e subsistência. Editora Feira de Santana, BA, Brasil, 1993.

SOUZA SOBRINHO, J. de; SILVA, D.D. da; SILVA, F. de A.S. Estudo sobre competição das variedades híbrido 11.648 e *Agave sisalana* na zona fisiográfica tabuleiro. Salvador: Companhia de Celulose da Bahia, 1985. p. irr.

SOYTONG, K.; SRINON, W.; RATTANACHERDCHAI, K.; KANOKMEDHAKUL, S.; KANOKMEDHAKUL, K. Application of antagonistic fungi to control anthracnose disease of grape. **Journal of Agricultural Science and Technology**. v. 1, p. 33-41, 2005.

SUINAGA, F.A.; SILVA, O.R.R.F.; COUTINHO, W.M. Cultivo de sisal na região Semi-árida do Nordeste Brasileiro. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2006. 44 p. (Sistemas de Produção, 5).

THOMASHOW, L. S.; BONSALL, R. E.; WELLER, D. M. Antibiotic production by soil and rhizosphere microbes in situ. In: HURST, C. J.; KNUDSEN, G. R.; MCLNERNEY, M. J.; STETZENBACH, L. D.; WALTER, M. V. (Eds). **Manual of Environmental Microbiology**. Washington, DC: ASM Press, p.493-499, 1997.

TROCOLI, R. O. **Potencial de usos de bactérias associadas ao sistema radicular de abacaxizeiros (*Ananas spp.*) no controle biológico da fusariose (*Fusarium guttiforme* Nirenberg & O'Donnell)**. Dissertação de Mestrado, Cruz das Almas, UFRB, 2010, 93p.

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

VASILIAUSKAS, R.; LYGIS, V.; THOR, M.; STENLID, J. Impact of biological (Rotstop) and chemical (urea) treatments on fungal community structure in freshly cut *Picea abies* stumps. **Biological Control**, n. 31, p. 405-413, 2004.

WALTERS, D. R.; DANIELL, T. Microbial induction of resistance to pathogens. In: WALTERS, D. R. NEWTON, A., LYON, G. (Eds.). Induced Resistance for Plant Diseases Control: **A Sustainable Approach to Crop protection**. Blackwell Publishing, Oxford, p.65-88, 2007.

WELLER, D. M. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. **Annual Reviews of Phytopathology**. v. 26, p. 379-407, 1988.

YANES, M. L.; FUENTE, D. L. L.; ALTIER, N.; ARIAS, A. Characterization of native fluorescent *Pseudomonas* isolates associated with alfalfa roots in Uruguayan agroecosystems. **Biological Control**, v.63, p. 287-295, 2012.

YIN, S. Y.; KENG, D. C.; YANG, K. Y.; CHEU, D. A further study on the biological control of Verticillium wilt of cotton. **Acta Phytopathologica Sinica**, v. 3, p. 55-61, 1957.

YU, J.; PROCTOR, R. H.; BROWN, D. W.; ABE, K.; GOMI, K.; MACHIDA, M.; HASEGAWA, F.; NIERMAN, W. C.; BHATNAGAR, D.; CLEVELAND, T. E. Genomics of economically significant *Aspergillus* and *Fusarium* species. **Applied Mycology & Biotechnology**, v. 4. p. 249-283, 2004.

YUTTAVANICHAKUL, W.; LAWONGSA, P.; WONGKAEW, S.; TEAUMROONG, N.; BOONKERD, N.; NOMURA, N.; TITABUTR, P. Improvement of peanut rhizobial inoculant by incorporation of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) as biocontrol against the seed borne fungus, *Aspergillus niger*. **Biological Control**, v. 63, p. 87-97, 2012.

ZHANG, Z.; YUEN, G. Y. Biological control of *Bipolaris sorokiniana* on tall fescue by *Stenotrophomonas maltophilia* strain C3. **Phytopathology**, v. 89, n. 9, p. 817-822, Sep. 1999.

ZHANG, G.; WANG, F.; QIN, J.; WANG, D.; ZHANG, J.; ZHANG, Y.; ZHANG, S.; PAN, H. Efficacy assessment of antifungal metabolites from *Chaetomium globosum* No.05, a new biocontrol agent, against *Setosphaeria turcica*. **Biological Control**, v. 64, p. 90-98, 2013.

CAPÍTULO 2

Uso de Bactérias de Restinga no Controle da Podridão Vermelha do Sisal*

*Artigo a ser submetido ao periódico Biological Control [ISSN: 1049-9644]

RESUMO

MAGALHÃES, V. C.; SOARES, A. C. F.; De SOUZA, J. T.; MARBACH, P. A. S.

Uso de bactérias de Restinga no controle da podridão vermelha do sisal.

O sisal possui grande interesse econômico para o Brasil, por ser uma excelente opção de cultivo frente às condições climáticas do semiárido. O Brasil é o maior produtor mundial e a Bahia destaca-se por apresentar a maior produção nacional. A podridão vermelha do sisal causada por *Aspergillus niger* é a principal causa do declínio desta cultura no Brasil. Não existem estratégias de controle que sejam eficazes contra essa doença. Neste trabalho, avaliou-se o potencial de controle de 18 isolados bacterianos contra a podridão vermelha do sisal causada pelo fungo *Aspergillus niger*. Os isolados testados foram capazes de inibir o crescimento micelial, inibiram a germinação de esporos, e produziram compostos voláteis responsáveis pela inibição micelial de *A. niger*. Através da técnica de PCR foi detectado em dois antagonistas (INV e BMH) o gene *bamC*, que encontra-se envolvido na síntese do antibiótico bacilomicina. Experimentos mostraram os isolados INB2, ING2, INM12 e IND2 como sendo os melhores agentes em casa de vegetação e campo. Quatorze isolados mostraram efeito significativo no controle da doença em campo (IND₂, INN₂, INP₂, INL₂, INC₂, INB₂, INM₂, ING₂, INN₁₂, INM₁₂, INF₂, INQ₂, INU₂ e INS₂). O sequenciamento da região 16S do rRNA demonstrou que estes 14 isolados são espécies relacionadas a *Burkholderia plantarii*, *Burkholderia glumae* e *Burkholderia glandioli*. Os isolados INV e BMH foram identificados como *Bacillus* sp.

Palavras-chave: *Burkholderia* spp.; Biocontrol; *Agave sisalana*; *Aspergillus niger*.

ABSTRACT

MAGALHÃES, V. C.; SOARES, A. C. F.; De SOUZA, J. T.; MARBACH, P. A. S.
Biological control of the red rot disease of Sisal (*Agave sisalana*) using Restinga's Bacteria.

The culture of Sisal has economic prominence in Brazil due to its aptitude to grown under the unfavorable climatic conditions within the semiarid region. The country has the biggest world production with the State of Bahia being the nation's main producer of Sisal. Red rot disease, caused by *Aspergillus niger*, is considered as the main cause of decrease of this culture within Brazil. There are no efficient control strategies against the disease. This work evaluated the potential control capabilities of 18 bacterial strains against red rot in Sisal. The isolates were able of inhibit mycelial growth, germination of spores and produced volatile compounds responsible by mycelial growth inhibition of *A. niger*. Using PCR technique, the gene *bamC* was detected in two antagonists (INV and BMH), associated with the synthesis of the antibiotic bacilomicin. Experiments showed that isolates INB2, ING2, INM12 and IND2 were the best control agents under green-house and field conditions. Fourteen isolates had a significant effect to control the disease in the field (IND₂, INN₂, INP₂, INL₂, INC₂, INB₂, INM₂, ING₂, INN₁₂, INM₁₂, INF₂, INQ₂, INU₂ e INS₂). Sequencing of the 16S region of the rRNA showed that these 14 isolates are species related to *Burkholderia plantarii*, *Burkholderia glumae* and *Burkholderia glandioli*. The isolates INV and BMH were identified as *Bacillus* sp.

Keywords: *Burkholderia* spp.; Biocontrol; *Agave sisalana*; *Aspergillus niger*.

1. INTRODUÇÃO

O sisal (*Agave sisalana* Perrine ex Engelm) é uma importante fonte natural para a produção de fibra, que possui significativo destaque entre as plantas nativas características de regiões semidesérticas e quentes (Medina, 1954; Nikam; Bansude; Aneesh Kumar, 2003). Os principais países produtores são: Brasil, Tanzânia, Quênia, Venezuela, e Madagascar (Sharma; Varshney, 2012). O Brasil se destaca como maior produtor mundial na produção de sisal, gerando receitas anuais em torno de 200 milhões de reais, e a Bahia destaca-se como maior estado produtor respondendo por 96% da produção nacional (IBGE, 2011).

As características de rusticidade como a tolerância a estresse hídrico e resistência a ataque de insetos e microrganismos, não impedem que os problemas de origem fitossanitária sejam os que mais tem causado danos ao sisal nos últimos anos (Medina, 1954; Alves; Santiago; Lima, 2005; Suinaga; Silva; Coutinho, 2006). Nesse sentido, merece destaque a doença podridão vermelha causada por espécies do fungo filamentoso *Aspergillus* (Santos, 2011). A espécie *Aspergillus. niger* é relatada como o principal agente causador da podridão vermelha do sisal, que afeta as principais áreas de produção na Bahia e em outros estados do Brasil, e até o momento, não há descrito nenhum tipo de tratamento a esta doença, que é fatal para a cultura (Coutinho et al. 2006a; Coutinho et al., 2006b; Soares et al., 2006).

No controle de doenças de plantas, são utilizados métodos que ajudem a evitar o contato com o patógeno, criando condições ambientais desfavoráveis a este, e erradicando ou reduzindo a quantidade do patógeno em uma planta ou na área (Agris, 2005). Por tanto o controle biológico é um método que leva em consideração o uso de um ou mais microrganismos antagonistas no combate de um patógeno, sendo considerado ambientalmente correto em comparação aos tratamentos químicos (Baker, 1987; Vasiliauskas et al., 2004).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o potencial de uma coleção de bactérias isoladas da serapilheira da Formação Arbustiva Aberta do Parque Estadual Paulo Cesar Vinha, ES, Brasil no controle da podridão vermelha do sisal. Juntamente com essa coleção foram testados dois isolado de solo, oriundos da Região Sisaleira da Bahia, Brasil.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. *Microrganismos e condições de cultivo*

Foram usadas 16 cepas de uma coleção de bactérias, isoladas de material vegetal em decomposição da restinga do Parque Estadual Paulo Cesar Vinha, ES e dois isolados bacterianos oriundos de isolamentos de solo da Região Sisaleira da Bahia, Brasil. A manutenção e preparo do inóculo se deu em caldo LB (Luria Bertani) (Luria e Burrous, 1957). O inóculo foi obtido pela adição de 100µL da cultura em 100 mL de meio de cultura (em erlenmeyer de 250 mL) incubado a 28°C com agitação de 150 RPM durante 20 horas. A cultura foi centrifugada a 14.000 rpm durante 5 min. O sobrenadante foi descartado e o pelete ressuspensão em solução salina (0,89% de NaCl) esterilizada e ajuste da OD (Densidade ótica) em 600 nm para 0,5.

Os fitopatógenos usados nos teste de antagonismos fazem parte da coleção de fungos fitopatogênicos do laboratório de microbiologia da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB) enquanto que os isolados de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*, *Moniliophthora perniciosa*, *Phytophthora capsici* e *Phytophthora palmivora* foram gentilmente cedidos pelo Centro de Pesquisas do Cacau (CEPEC) (**Tabela 1**). Os isolados foram cultivados em batata dextrose ágar (BDA) a 28°C por 7-10 dias antes da sua utilização nos ensaios de antagonismo. O fungo utilizado nos experimentos em casa de vegetação e campo, *Aspergillus niger* (isolado 131), foi isolado a partir de plantas de sisal (*Agave sisalana*) doentes, e pertence à coleção do Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Antes do uso *A. niger* foi cultivado em meio batata dextrose ágar (BDA) por 7 dias a 28°C. Os conídios foram raspados da superfície da cultura, homogeneizados em 20 mL de água destilada autoclavada e 1 gota de Tween 20® e filtrado em gaze estéril antes da quantificação. A suspensão foi ajustada para 1×10^7 conídios.mL⁻¹.

2.2. *Material Vegetal*

No presente estudo foram utilizadas mudas de sisal (*A. sisala* Perrine ex Engelm), obtidas a partir do plantio de bulbilhos coletados de plantas sadias no município de Jacobina, Bahia, Brasil. Os bulbilhos foram plantados em recipientes de 500 mL. As mudas destinadas a ensaios em casa de vegetação

foram plantadas em solo devidamente autoclavado, e após 2 meses selecionados e utilizados na montagem dos experimentos. As plantas selecionadas possuíam tamanho aproximado de 25 cm e estavam livres de ferimentos visíveis e doença.

2.3. Antagonismo de cepas de bactérias contra fitopatógenos

Para avaliar o potencial de antagonismo das 18 cepas contra diferentes agentes fitopatogênicos, incluindo *A. niger* foi utilizado a técnica de duplo cultivo (Li et al., 2011) com algumas modificações. Foram retirados discos de micélio (5 mm de diâmetro) de culturas com 7 a 10 dias de crescimento, que foram colocados no centro da placa de Petri contendo meio BDA. Após 24 horas uma alíquota de 8µL de cada suspensão bacteriana (10^9 UFC.mL⁻¹) (diluída a partir do meio de cultura), foi colocada a 5 mm da extremidade da placa. A distância entre os dois locais de inoculação em cada uma das placas foi de 40 mm. As placas foram seladas com parafilme e incubadas a 28°C durante 10 dias. Para os controles inoculou-se discos de micélio (5 mm de diâmetro) no centro de placas com BDA e 8µL de água destilada autoclavada. Foram usadas 5 repetições para cada tratamento. O crescimento radial e o percentual de redução em relação ao controle foi calculado usando a seguinte fórmula (Al-Mughrabi, 2013):

$$\text{Inibição (\%)} = \frac{C - T}{C} \times 100$$

C – Crescimento micelial do patógeno no tratamento controle (mm);

T – Crescimento micelial do patógeno na presença do antagonista (mm).

2.4. Inibição do crescimento micelial de *A. niger* por compostos voláteis de bactérias

Foi avaliado a capacidade de produção de compostos voláteis em condições *In vitro* contra *A. niger*, de acordo a metodologia descrita por Arrebola et al., (2010) com algumas modificações. As 18 cepas foram reativados em meio de cultivo ágar nutriente (AN) incubados a 28°C durante 24 h, antes da montagem dos ensaios. O fungo foi inoculado no centro da placa em meio batata dextrose ágar (BDA) e fechadas com parafilme. As cepas foram inoculadas em caldo LB e incubadas a 28°C durante 20 horas com agitação de 150 RPM e em

seguida foram transferidos 100µL para placas de Petri contendo meio LB. Os fundos das placas com bactérias foram fechados com os fundos das placas em que as bactérias foram semeadas. As placas foram incubadas em BOD a 28°C ± 2°C, e o crescimento do fungo foi acompanhado a cada 48 h por 10 dias. Foi utilizado como controle o fungo inoculado em meio BDA submetido às mesmas condições de incubação das placas contendo meio de cultura LB sem semente de bactérias. Como segundo controle inoculou-se o fungo em BDA, e usou-se fundos de placas semeadas com *E. coli*, nas mesmas condições dos antagonistas testados. O diâmetro radial final do fungo foi medido no 10º dia tanto nos tratamentos como nos controles. A inibição do crescimento micelial do fungo foi calculada de acordo com a fórmula: $(R1 - R2 / R1) \times 100$, onde *R1* é o valor de controle, *R2* é a medida do fungo em contato com o antagonista. Para cada isolado bacteriano utilizado como tratamento, utilizou-se 6 repetições.

2.5. Efeito do sobrenadante de culturas de bactérias na germinação de esporos de *A. niger*

Para obtenção dos filtrados utilizados nos testes, as bactérias foram semeados em Erlenmeyer com 200 mL de meio líquido Luria-Bertani (LB), e incubados em mesa agitadora orbital (150 rpm e 28°C), durante 48 horas. Após a incubação, foram retiradas alíquotas que foram centrifugadas a 14000 rpm por 15 min. O sobrenadante foi coletado e armazenado em tubos, sendo guardados a 4°C. Antes do armazenamento, o material coletado foi homogeneizado e uma alíquota de 100 µL foi plaqueada em meio TSA e incubados a 28 °C durante 24 h, para comprovar a não existências de células bacterianas no filtrado.

Para avaliar a inibição da germinação de conídios de *A. niger* por filtrados bacterianos, adicionou-se 150 µL de suspensão de conídios, 150 µL do filtrado e 50 µL de BD (Batata-Dextrose) em placa de ELISA, sendo esta vedada com filme PVC e incubada a 37°C. Utilizamos 3 controles, o meio líquido (LB) sem o crescimento das bactérias, água destilada esterilizada; e meio de cultura BD sem o crescimento microbiano. No momento em que os tratamentos controles apresentaram um mínimo de 70% de germinação (16 horas de incubação), adicionou-se 1 gota de lactofenol azul em todos os tratamentos. A avaliação ocorreu por meio da contagem aleatória de 200 conídios em microscópio de luz. Considerou-se como conídio germinado aquele cujo tubo germinativo se

apresentasse superior ao dobro do diâmetro do conídio não germinado. O experimento foi repetido 3 vezes.

2.6. Detecção in vitro de celulases, proteases e quitinases secretadas pelos isolados bacterianos

Os 18 antagonistas foram testados para avaliar o potencial de produção de algumas enzimas hidrolíticas envolvidas no controle biológico, em meio de cultura agarificado suplementado com o substrato da enzima a ser testada. As placas foram divididas em quatro setores e 10µL de cada suspensão bacteriana foi adicionada no centro de cada setor e incubadas a 28°C por 48 h.

A atividade celulolítica foi avaliada usando meio sólido contendo: MgSO₄.7H₂O (0,1 g/L), CaCl₂.2H₂O (0,2 g/L), FeSO₄.7H₂O (0,04 g/L), NaCl (0,2 g/L), KH₂PO₄ (0,3 g/L), K₂HPO₄ (0,5 g/L), Carboximetilcelulose Sigma® (CMC) (5 g/L), extrato de levedura (0,1 g/L) e ágar (15 g/L) (Teather; Wood, 1982). Após 48 h foram adicionados 10 mL de solução de vermelho congo (1mg/mL) em cada placa, após 30 min essa solução foi descartada e adicionou-se 10 mL de uma solução de NaCl a 1M, seguido de incubação por 30 min. Observou-se a formação de um halo alaranjado em torno das colônias, indicando a atividade celulolítica.

A atividade de proteases foi avaliada em meio de ágar contendo leite desnatado (100 g/L), extrato de levedura (1,5 g/L) de acordo Dunn et al., (1997) e visualizado diretamente após 72 h de incubação a 28°C através da formação de um halo transparente ao redor das colônias cuja atividade foi positiva.

A atividade de quitinase foi realizada em meio contendo: NH₄H₂PO₄ (1 g/L), KCl (0,2 g/L), MgSO₄.7H₂O (0,2 g/L), quitina coloidal (10 g/L), ágar (20 g/L), e pH ajustado para 7,0 (Roberts; Selitrennikoff, 1988). As placas foram incubadas por 7 dias a 28°C. A detecção da produção de quitinase foi baseada na visualização de zonas claras ao redor das colônias.

2.7. Avaliação do biocontrole e eficiência dos antagonistas em casa de vegetação

A eficiência do controle biológico das 18 estirpes de bactérias antagonistas foi testada em casa de vegetação. O experimento incluiu os 18 antagonistas e dois tratamentos controles. Um dos controles (Controle positivo)

consistia em plantas inoculadas apenas com água destilada autoclavada. O segundo controle (Controle negativo) era formado por plantas inoculadas apenas com o patógeno *A. niger*. Foram feitos ferimentos padronizados (duas perfurações equidistantes com aproximadamente 1 mm de diâmetro) na base do caule das plantas, aplicou-se 100 µL da suspensão de células bacterianas em cada perfuração (total de 200 µL/planta), e as mudas foram mantidas em repouso por 2 h. Posteriormente as mudas foram inoculadas com 100 µL da solução de esporos de *A. niger* em cada lesão feita anteriormente (total de 200 µL/planta). Após a inoculação do patógeno as mudas foram plantadas novamente em seus recipientes e mantidas sob as condições de casa de vegetação. Foram utilizadas 42 repetições para cada tratamento e após 30 dias as plantas foram colhidas e cortadas transversalmente 0,5 cm acima do ponto da inoculação. Analisou-se a presença ou ausência dos sintomas da doença e a severidade foi avaliada com uso da escala de nota proposta por Sá (2009) (**Figura em anexo**).

Calculou-se a severidade da doença e a eficiência do biocontrole. A severidade da doença foi calculada utilizando índice de infecção de McKinney (1923) de acordo a equação: $\sum(\text{Grau de infecção} \times \text{Frequência}) \times 100 \div (\text{n}^\circ \text{ total de unidades} \times \text{Grau máximo da escala})$. A Eficiência do Biocontrole (%):

$$\frac{[(\text{Severidade no controle} - \text{Severidade no grupo tratado com o antagonista}) \times 100]}{(\text{Severidade no controle})}$$

Os dados foram analisados no software Sisvar versão 4.0 (Ferreira, 2000).

2.8. Controle da podridão vermelha do sisal (*A. niger*) em campo

A eficiência dos 18 antagonistas foi testada contra a podridão vermelha do sisal em condições de campo. Os testes foram realizados com mudas de sisal, no distrito Caatinga do Moura, situado no município de Jacobina-BA, Bahia, Brasil. Foram utilizadas plantas de sisal com 5 meses de idade que foram mantidas na área experimental em recipientes com solo. A inoculação dos agentes de biocontrole/patógeno e avaliação foi realizado conforme descrito na seção anterior. Foram utilizadas 25 repetições para cada tratamento.

2.9. Detecção por PCR de genes envolvidos com a síntese de antibióticos

Foram feitos PCRs utilizando primers de genes específicos envolvidos na biossíntese de importantes antibióticos. O DNA dos 18 antagonistas foi submetido às reações de PCR para amplificação dos seguintes genes: bacilomicina (Ramarathnam et al., 2007), fenazina (Delaney et al., 2001), pirrolnitrina (De Souza et al., 2003), 2,4-diacetilfloroglucinol (2,4-DAPG) (McSpadden et al., 2001) e o gene de resistência à zwittermicina A (Raffel et al., 1996). Os produtos de PCR foram corados com 3 µL de corante, e os produtos separados em gel de agarose 1% contendo brometo de etídio. Foi utilizado o DNA ladder de 100 pb como marcador de peso molecular. Após a corrida eletroforética os géis foram fotodocumentados em transiluminador UV. Através da presença de bandas do tamanho específico para cada gene, avaliou-se o potencial de produção dos antibióticos procurados.

2.10. Identificação molecular dos antagonistas

As 18 cepas antagonistas utilizadas nos experimentos foram identificadas em nível de gênero por sequenciamento do gene 16S do rRNA. O gene 16S do rRNA foi amplificado para sequenciamento com o seguinte par de primers universais 8FN (5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3') e 1492r (5' GGT TAC CTT GTT ACG ACT T 3') (Turner et al., 1999). Após a amplificação, as amostras foram submetidas às reações de sequenciamento. Os produtos de PCR foram enviados juntamente com os iniciadores para sequenciamento na empresa MacroGen Inc (www.macrogen.com/).

2.11. Análise genotípica de isolados bacteriano por meio de BOX-PCR

A diversidade genotípica dos 18 isolados bacterianos foi determinada através da amplificação de fragmentos através do primer BOXA-1 (VERSALOVIC et al., 1994). A reação de amplificação continha 2,5 µL de PCR Buffer (10X); 1,5 µL dNTPs (10 mM); 2,0 µL de MgCl₂ (50 mM); 2,5 µL do primer (10 µM); 0,3 µL de Taq DNA polimerase (5 U/µL); 30 ng de DNA e H₂O ultra pura para um volume final de 25 µL. As condições de amplificação foram realizadas de acordo com McSpadden-Gardener et al. (2000). As amostras foram aplicadas em gel de agarose 2% contendo 0,5 µg/ml de brometo de etídio, submerso em tampão TAE (Tris-Acetato 90 mM e EDTA 1 mM). Como marcador de peso

molécula utilizou-se o DNA ladder de 100 pb. A separação eletroforética foi de 5 h a 40 V.

3. RESULTADOS

3.1. Antagonismo de cepas de bactérias contra fungos

A **Tabela 1** resume os dados referentes a inibição *in vitro* de *A. niger*, *Colletotrichum* sp., *F. oxysporum* f.sp. *cubense*, *M. pernicioso*, *P. capsici* pelos isolados bacterianos utilizados no trabalho. Os antagonistas testados reduziram significativamente ($p < 0,05$) o crescimento micelial de todos os fitopatógenos utilizados no experimento. O percentual de inibição observado entre os diferentes antagonistas variou de 21,88% a 96,22% entre os diferentes fitopatógenos. Os isolados INU₁₂, INP₂, INS₂ e ING₂ apresentaram os maiores valores de inibição *in vitro* para o fungo *A. niger*, sendo esses valores 79,70%, 77,86%, 74,91% e 74,54%, respectivamente. O maior valor de inibição do *Colletotrichum* sp. foi obtido pelo isolado INS₂, que mostrou um percentual de 64,28%. Para *F. oxysporum* f.sp. *cubense*, INC₂ apresentou o maior valor de inibição (67,19%). A maior parte dos isolados mostrou forte inibição contra *M. pernicioso*, sendo o antagonista INN2 o que apresentou o maior valor (96,22%), enquanto que onze outros antagonistas (INU₂, INU₁₂, ING₂, INR₂, INL₂, INP₂, INQ₂, INS₂, INF₂, INN₁₂, INC₂) apresentaram valores entre 89,19% e 82,16%. Na inibição do crescimento micelial de *P. capsici* os isolados INN2, INU₂, INC₂, INN₁₂, INS₂ mostraram os maiores percentuais de inibição, com respectivamente 68,57%, 66,43%, 65%, 63,93% e 63,57%.

De forma geral apenas os isolados INM₁₂ e INS₂ apresentaram um padrão de alto percentual de inibição independente do fitopatógeno testado, sendo este percentual acima de 50% (**Tabela 1**).

Tabela 1

Antagonismo *in vitro* de cepas bacterianas isoladas de restinga contra *Aspergillus niger*, *Colletotrichum* sp., *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*, *Moniliophthora perniciosa*, *Phytophthora capsici*. Presença (+) ou ausência (–) de atividade celulolítica, proteolítica e quitinolítica. Presença ou ausência de genes envolvidos com a produção bacilomicina, fenazina, pirrolnitrina, 2,4-diacetilfloroglucinol e gene de resistência a zwittermicina.

Tratamentos	Inibição <i>in vitro</i> (%)					Atividade Hidrolítica			Antibióticos				
	<i>A.niger</i>	<i>Colletotrichum</i> sp.	<i>F. oxysporum</i>	<i>M. perniciosa</i>	<i>P. capsici</i>	Celulase	Protease	Quitinase	<i>bamC</i> ^A	<i>phzFA</i> ^B	<i>prnD</i> ^C	<i>phlD</i> ^D	<i>zmaR</i> ^E
INB ₂	68,26 ^b	46,07 ^c	45,30 ^f	68,00 ^c	63,57 ^a	-	+	-	-	-	-	-	-
INC ₂	67,90 ^b	44,28 ^d	67,19 ^a	82,16 ^a	65,00 ^a	-	-	+	-	-	-	-	-
IND ₂	40,22 ^e	27,14 ^f	50,39 ^e	68,11 ^c	47,86 ^c	-	-	-	-	-	-	-	-
INF ₂	70,48 ^b	46,07 ^c	38,28 ^g	82,70 ^a	34,64 ^d	-	+	-	-	-	-	-	-
ING ₂	74,54 ^a	48,93 ^c	57,42 ^c	84,86 ^a	48,57 ^c	-	-	-	-	-	-	-	-
INL ₂	71,59 ^b	26,43 ^f	45,31 ^f	84,32 ^a	55,71 ^b	-	-	+	-	-	-	-	-
INM ₂	61,62 ^c	42,14 ^d	47,27 ^e	76,22 ^b	59,64 ^b	-	+	-	-	-	-	-	-
INM ₁₂	72,70 ^b	51,43 ^c	53,52 ^d	74,05 ^b	56,07 ^b	+	+	+	-	-	-	-	-
INN ₂	72,70 ^b	50,00 ^c	51,56 ^e	96,22 ^a	68,57 ^a	-	+	-	-	-	-	-	-
INN ₁₂	71,21 ^b	32,14 ^e	50,00 ^e	82,70 ^a	63,93 ^a	-	+	+	-	-	-	-	-
INP ₂	77,86 ^a	57,14 ^b	44,53 ^f	83,78 ^a	50,71 ^c	-	+	-	-	-	-	-	-
INQ ₂	68,26 ^b	46,07 ^c	58,59 ^c	83,78 ^a	57,14 ^b	-	+	+	-	-	-	-	-
INR ₂	72,70 ^b	32,14 ^e	42,19 ^f	84,86 ^a	48,57 ^c	+	+	-	-	-	-	-	-
INS ₂	74,91 ^a	64,28 ^a	62,50 ^b	83,78 ^a	63,57 ^a	-	+	+	-	-	-	-	-
INU ₂	68,26 ^b	40,71 ^d	45,31 ^f	89,19 ^a	66,43 ^a	-	+	-	-	-	-	-	-
INU ₁₂	79,70 ^a	40,00 ^d	58,98 ^c	88,11 ^a	46,43 ^c	-	+	-	-	-	-	-	-
INV	52,77 ^d	46,43 ^c	21,88 ^h	69,73 ^c	48,57 ^c	+	+	-	+	-	-	-	-
BMH	55,35 ^d	48,57 ^c	43,75 ^f	62,16 ^c	45,00 ^c	+	+	-	+	-	-	-	-
CTL	0,00 ^f	0,00 ^g	0,00 ⁱ	0,00 ^d	0,00 ^e								

Valores médios (médias de cinco repetições) seguidos pela mesma letra dentro de cada coluna são estatisticamente diferentes de acordo o teste de Skott-knott $p < 0.05$.

^A Gene pertencente à via de biossíntese de Bacilomicina;

^B Gene pertencente à via de biossíntese de Fenazina;

^C Gene pertencente à via de biossíntese de Pirrolnitrina;

^D Gene pertencente à via de biossíntese de 2,4-dicetilfloroglucinol;

^E Gene pertencente de resistência à zwittermicina

3.2. Inibição do crescimento micelial de *A. niger* por compostos voláteis de bactérias

Os dados de inibição por compostos voláteis produzidos pelos 18 antagonistas em placa selada são apresentados na **Figura 1**. A maior parte dos antagonistas foram capazes de produzir compostos voláteis capazes de inibir significativamente o crescimento micelial de *A. niger* nas condições in vitro testadas. O isolado INM12 foi o que apresentou o menor percentual de inibição (27,35%). Os isolados que obtiveram os maiores valores percentuais de inibição contra o patógeno testado são ING2, INS2, INL2, INM2, INQ2, INF2, INR2, INU2, INP2, INV, INC2 e IND2 com 72,29%, 71,94%, 69,10%, 68,92%, 68,92%, 68,92%, 67,14%, 67,14%, 65,36%, 64,48%, 64,12% e 63,01%, respectivamente.

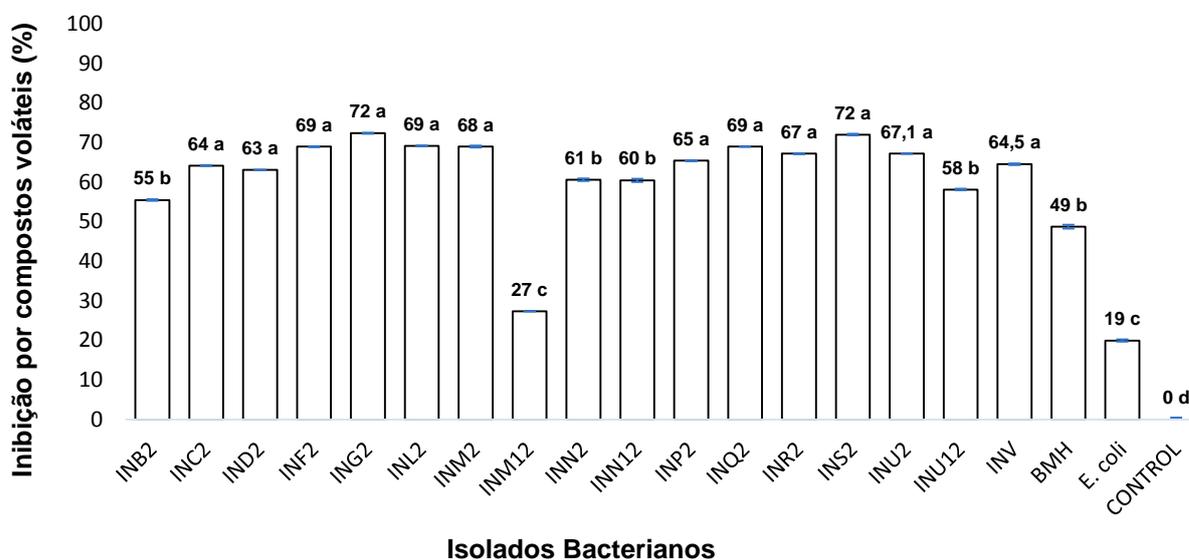


Fig. 1. Ensaio de inibição do crescimento micelial de *Aspergillus niger* por compostos voláteis bacterianos (método da placa selada). Como controle foram usados o fungo inoculado em meio BDA na ausência das bactérias sob as mesmas condições de incubação dos tratamentos com os antagonistas, e também o fungo inoculado em meio BDA na presença do isolado bacteriano *E. coli* DH5 α . Os valores usados representam as médias do crescimento micelial obtidas a partir de seis repetições que foram submetidos ao teste de Skott-Knott ($p < 0,05$). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos e as barras representam o erro padrão da média das seis repetições.

3.3. Efeito do sobrenadante de culturas de bactérias na germinação de esporos de *A. niger*

O efeito do sobrenadante da cultura dos antagonistas na germinação de conídios de *A. niger* em placa de Elisa. Os resultados expressos na **Figura 2** mostram que os sobrenadantes das culturas dos antagonistas INB2, INF2, INM12, INQ2 e INN2 inibiram completamente a germinação do fungo *A. niger*. Os tratamentos contendo o sobrenadante da cultura dos isolados INP2 e 14INV também se mostraram significativamente eficientes em diminuir a germinação de esporos de *A. niger*, onde foi observado um percentual de germinação de 36% e 34% respectivamente (**Fig. 2**). Os conídios submetidos aos sobrenadantes dos isolados INU12 (71,7%), ING2 (79,33%), INU2 (85,33%), INC2 (85,70%), e BMH (86,00%) também tiveram a sua germinação inibida, porém com percentuais de inibição significativamente menores que os melhores antagonistas já citados.

O percentual de germinação de *A. niger* não diferiu dos controles quando expostos aos sobrenadante oriundos dos isolados INM2, INL2, IND2, INS2, INR2 e INN12, onde o percentual de germinação foi de 91,67%, 95,67%, 96,33%, 97,67%, 97,67%, e 98,67% respectivamente (**Fig. 2**).

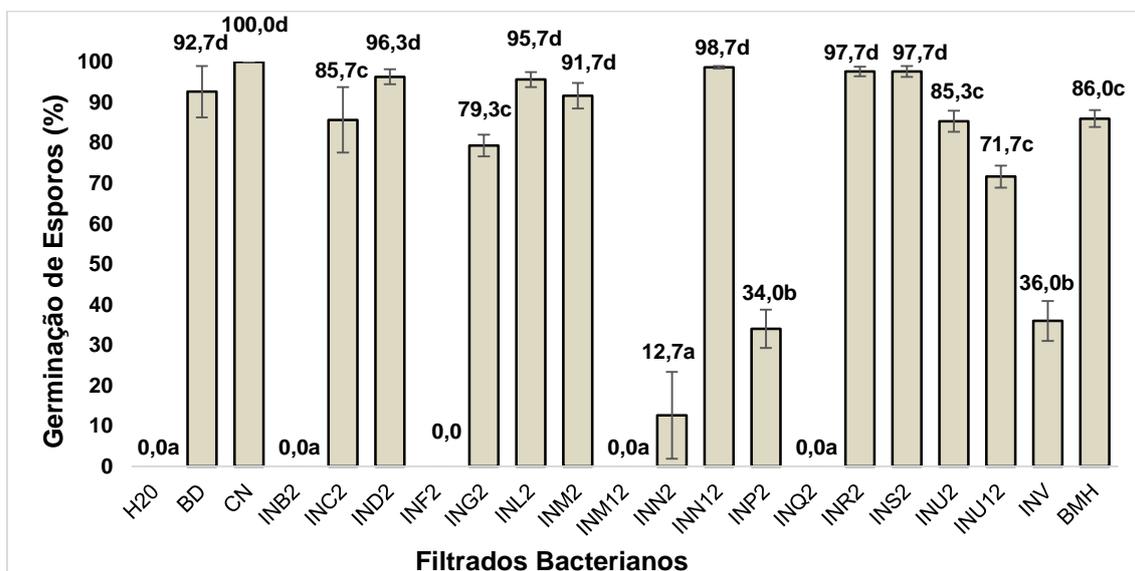


Fig. 2. Percentual de germinação de conídios de *Aspergillus niger* após 16 horas de incubação a 37°C, tratados com filtrados de culturas de isolados bacterianos de restinga. Como controle foram usados meio de cultivo batata-dextrose (BD), meio de cultivo Luria-Bertani (LB) e água destilada autoclavada (H2O). Os valores médios foram obtidos a partir de 3 repetições, cada repetição formada pela contagem de 200 esporos ao acaso. Letras diferentes indicam diferenças significativas encontradas entre os tratamentos pelo teste de Skott-Knott ($p < 0,05$). As barras representam o erro padrão da média das seis repetições.

3.4. Detecção in vitro de celulases, proteases e quitinases secretadas pelos isolados bacterianos

A produção de enzimas celulolíticas, proteolíticas e quitinolíticas das diferentes cepas de bactérias isoladas de restinga são resumidas na **Tabela 1**. As atividades hidrolíticas indicadas pela formação de zonas claras ao redor da colônia bacteriana, foram observadas em meio suplementado com CMC, leite desnatado após 48 h a 28 °C e em meio suplementado com quitina coloidal após 7 dias a 28°C. Apenas a cepa INM₁₂ apresentou atividade de produção para as três enzimas em estudo. As cepas IND₂, ING₂ não apresentaram formação de alo transparente nos meios testados. Dos 18 antagonistas, apenas quatro (INM₁₂, INR₂, INV e BMH) apresentaram indicação de secreção de celulase. Em relação à secreção de proteases apenas quatro isolados (INC₂, IND₂, ING₂ e INL₂) não demonstraram capacidade para a produção nas condições in vitro citadas, enquanto que 14 cepas demonstraram potencial para a produção desta enzima. Para a produção de quitinase, seis cepas se mostraram potenciais produtores da enzima, sendo estas INC₂, INL₂, INM₁₂, INN₁₂, INQ₂ e INS₂.

Protease foi a enzima mais comum, sendo produzida por 88,88% das cepas. O contrário foi observado para produção de quitinase e celulase, onde apenas 33,33% e 22,22% das cepas demonstraram potencial para produção in vitro respectivamente.

3.5. Avaliação do biocontrole dos antagonistas em casa de vegetação

Dos 18 antagonistas testados, 16 demonstraram eficiência de biocontrole de no mínimo 50% nas condições de casa de vegetação (**Tabela 3**). O antagonista mais promissor, o isolado INB₂, apresentou eficiência de controle de 95,73%, enquanto que a estirpe menos eficiente apresentou um valor de 29,06% (BMH). Outros três isolados também demonstraram altos valores de eficiência em casa de vegetação. É o caso dos isolados ING₂, INM₁₂ e IND₂ que apresentaram eficiência de biocontrole de respectivamente 94,87%, 92,31 e 85,47% (**Tabela 3**)

Os isolados citados como os de maior eficiência (INB₂, ING₂, INM₁₂ e IND₂) apresentaram valores de severidade da doença significativamente pequenos, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos, exceto do controle

caracterizado pela ausência de doença (CTL) (**Tabela 3.**) Dos 18 antagonistas, os dois que apresentaram os menores valores de eficiência, são oriundos de solo da região sisaleira da Bahia, ambiente que naturalmente são encontradas plantas de sisal sadias e doentes, enquanto que os 16 isolados restantes foram isolados de material em decomposição da restinga no Parque Estadual Paulo Cesar Vinha, ES, Brasil sendo portanto isolados alóctones. A incidência da doença na população de mudas foi reduzida em até 50% pela aplicação dos antagonistas INB2, ING2, INM12, IND2 e INQ2. Destes INB2 e ING2 se sobressaíram por apresentar a menor incidência expressa em 12,50% (**Tabela 3**).

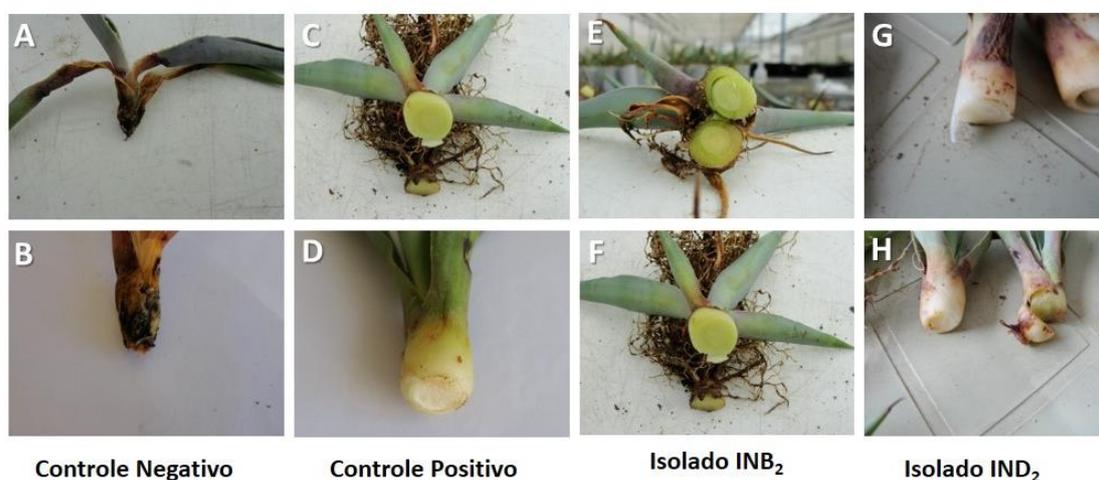


Fig. 3. Efeito antagonista dos isolados INB2 e IND2 em casa de vegetação. A-B – Mudas inoculadas apenas com *Aspergillus niger*. C-D – Mudas inoculadas com água destilada autoclavada. E-F – Mudas inoculadas com o antagonista INB2. G-H – Mudas inoculadas com o antagonista IND2.

3.6. Controle biológico da podridão vermelha do sisal em campo

Os resultados do biocontrole da podridão vermelha causada pelo fungo *A. niger* são mostrados na **Tabela 2**. Todos os tratamentos com antagonistas diferiram estatisticamente do controle sem doença (CTL H₂O). A eficiência mínima observada foi de 50% (INV), e o isolado que apresentou o melhor valor de eficiência foi IND2 com 77,03% (**Tabela 2**).

Dentre os antagonistas testados, um grupo formado por 14 isolados (IND2, INN2, INP2, INL2, INC2, INB2, INM2, ING2, INN12, INM12, INF2, INQ2, INU2 e INS2) se mostraram eficientes na redução da severidade da podridão

vermelha nas condições ambientais testadas, não havendo diferença estatística significativa entre os mesmos. Os isolados INU12, BMH, INR2 e INV apresentaram valores de severidade significativamente menores que o controle apenas com o patógeno (CTL ASP), no entanto esses valores foram inferiores quando comparados com os outros antagonistas (**Tabela 2**). Dentre os isolados que se destacaram, a incidência da doença também foi reduzida (**Figura 4**)

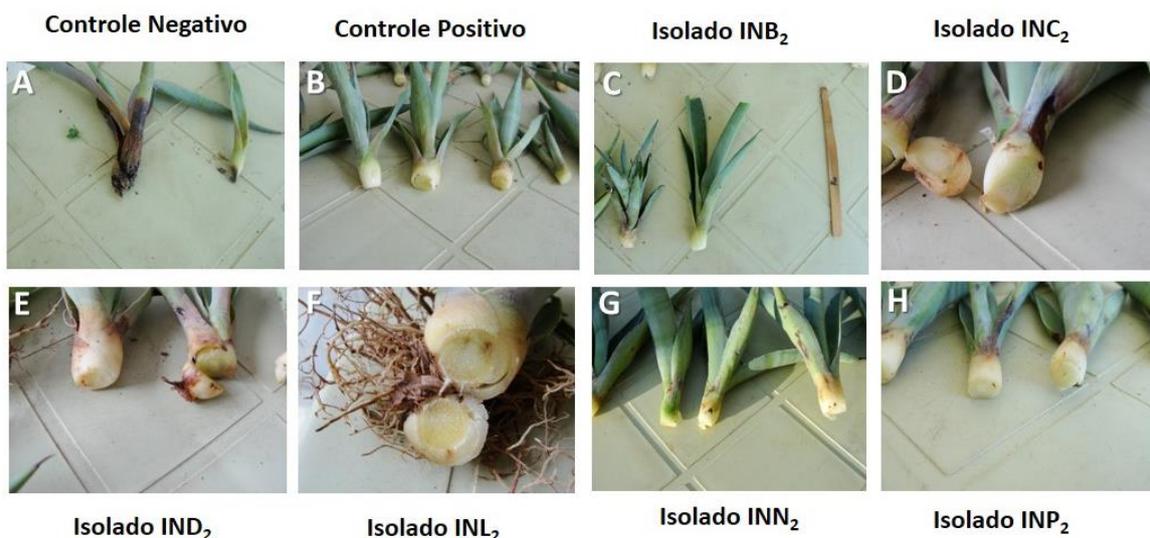


Fig. 4. Efeito antagonista dos isolados INB2 e INC2, IND2, INL2, INN2 e INP2 em campo. Os As fotos representam o efeito de isolados que compunham o grupo dos 14 antagonistas que obtiveram os melhores resultados em campo. A– Muda inoculada apenas com *Aspergillus niger*. B– Muda inoculada com água destilada autoclavada. C – Muda inoculada com o antagonista INB2. D – Muda inoculada com o antagonista INC2. E – Muda inoculada com o antagonista IND2. F – Muda inoculada com o antagonista INL2. G – Muda inoculada com o antagonista INN2. H – Mudanças inoculadas com o antagonista INP2.

Tabela 2

Incidência, severidade e eficiência do controle biológico da Podridão vermelha causada por *Aspergillus niger* tratados com isolados bacterianos de restinga em casa de vegetação e campo.

Tratamentos	Experimento em Casa de Vegetação			Experimento em Campo		
	Incidência da Doença (%)	Severidade da Doença (%)	Eficácia do Biocontrole (%)	Incidência da Doença (%)	Severidade da doença (%)	Eficácia do Biocontrole (%)
INB ₂	12,50	4,17 ± 1,75 a	95,73	76,00	29,33 ± 3,40 b	70,27
INC ₂	72,50	38,33 ± 3,51 c	60,68	60,00	26,67 ± 7,60 b	72,97
IND ₂	27,50	14,17 ± 4,95 a	85,47	52,00	22,67 ± 4,50 b	77,03
INF ₂	52,5	23,33 ± 2,18 b	76,07	64,00	32,00 ± 4,90 b	67,57
ING ₂	12,50	5,00 ± 1,67 a	94,87	72,00	30,67 ± 4,00 b	68,92
INL ₂	65,00	30,00 ± 3,78 b	69,23	56,00	26,67 ± 6,32 b	72,97
INM ₂	82,50	48,33 ± 5,46 d	50,43	80,00	30,67 ± 3,40 b	68,92
INM ₁₂	17,50	7,50 ± 2,34 a	92,31	64,00	32,00 ± 4,42 b	67,57
INN ₂	92,50	48,33 ± 2,44 d	50,43	64,00	24,00 ± 4,00 b	75,68
INN ₁₂	60,00	26,67 ± 5,35 b	72,65	72,00	32,00 ± 2,50 b	67,57
INP ₂	80,00	38,33 ± 5,00 c	60,68	68,00	25,33 ± 2,50 b	74,33
INQ ₂	47,50	21,67 ± 3,02 b	77,78	72,00	33,33 ± 6,32 b	66,22
INR ₂	65,00	37,50 ± 7,01 c	61,54	80,00	45,33 ± 3,27 c	54,06
INS ₂	57,50	25,83 ± 1,97 b	73,50	68,00	34,67 ± 3,89 b	64,87
INU ₂	77,50	40,00 ± 5,04 c	58,97	68,00	34,67 ± 6,80 b	64,87
INU ₁₂	85,00	45,00 ± 4,32 d	53,85	76,00	37,33 ± 3,40 c	62,16
INV	72,50	50,00 ± 6,78 d	48,72	72,00	49,33 ± 7,18 c	50,00
BMH	97,50	69,17 ± 3,55 e	29,06	64,00	41,33 ± 3,89 c	58,11
CTL H20	0,00	0,00 ± 0,00 a	100,00	0,00	0,00 ± 0,00 a	100,00
CTL ASP	100,00	97,50 ± 1,22 f	0,00	100,00	98,67 ± 1,33 d	0,00

Valores médios (médias de quarenta e duas repetições no experimento em casa de vegetação e vinte e cinco no experimento em campo) seguidos pela mesma letra dentro de cada coluna são estatisticamente diferentes de acordo o teste de Skott-knott $p < 0.05$.

3.7. Presença de genes envolvidos com a via biossintética de antibióticos

Os resultados do PCR demonstraram que dos cinco genes procurados, apenas o gene *bamC* que codifica para a produção de bacilomicina foi encontrado (**Tabela 1**). Houve amplificação do fragmento correspondente somente para os isolados BMH e INV (*Bacillus* sp.) (**Figura em anexo**). Para todos os outros genes não houve amplificação do fragmento correspondente esperado nos isolados.

3.9. Identificação dos antagonistas

A **Tabela 3** mostra a identificação dos 18 isolados com base no sequenciamento do gene 16S do rRNA. Dentre os 18 antagonistas dois gêneros são representados: *Burkholderia* e *Bacillus*. *Burkholderia* é representado por 16 isolados (INB2, INC2, INF2, ING2, INL2, INM2, INM12, INN2, INN12, INP2, INQ2, INR2, INS2, INU2 e INU12) e *Bacillus* por dois isolados (INV e BMH) (**Tabela 3**).

3.9. Análise genotípica de isolados bacteriano por meio de BOX-PCR

A análise genotípica por rep-PCR utilizando iniciadores BOX foi realizada com todos os isolados bacterianos. De forma geral os produtos de amplificação mostraram apenas dois diferentes padrões de bandas. Esse resultado corrobora com o sequenciamento do gene 16S do rRNA, já que foram encontrados dois grupos distintos de gêneros bacterianos (*Burkholderia* e *Bacillus*). (**Figura 5**).

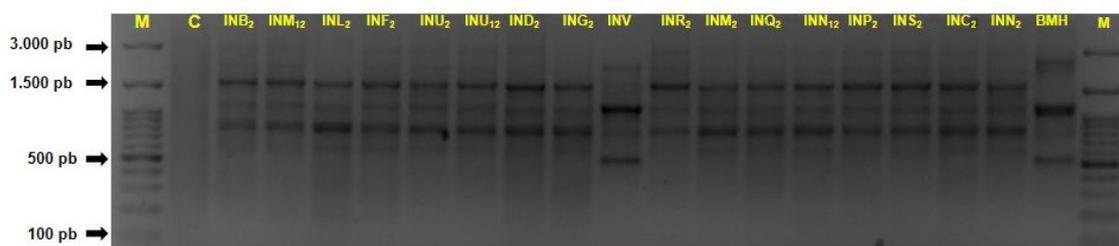


Fig. 5. Perfil eletroforético em gel de agarose obtido por meio de BOX-PCR, mostrando o perfil genotípico de cada um dos 18 isolados. (M) – Marcador molecular (DNA Ladder); (C) – Controle Negativo.

Tabela 3

Identificação dos 18 agentes de biocontrole

Identificação Molecular				
Isolado	Espécie (BLAST-NCBI)	Identidade (%)	Nº de Acesso	Cobertura (%)
INB ₂	<i>Burkholderia plantarii</i>	99	AB183679.1	99
INC ₂	<i>Burkholderia glumae</i>	99	CP001504.2	99
IND ₂	<i>Burkholderia plantarii</i>	92	AB682220.1	100
INF ₂	<i>Burkholderia gladioli</i>	99	HQ023278.1	98
ING ₂	<i>Burkholderia glumae</i>	99	CP001504.2	99
INL ₂	<i>Burkholderia gladioli</i>	99	HQ023278.1	98
INM ₂	<i>Burkholderia glumae</i>	99	CP001504.2	97
INM ₁₂	<i>Burkholderia plantarii</i>	99	AB183679.1	98
INN ₂	<i>Burkholderia glumae</i>	99	CP001504.2	98
INN ₁₂	<i>Burkholderia glumae</i>	90	EF193641.1	95
INP ₂	<i>Burkholderia glumae</i>	99	NR102846.1	99
INQ ₂	<i>Burkholderia gladioli</i>	99	HQ023278.1	99
INR ₂	<i>Burkholderia plantarii</i>	99	AB183679.1	99
INS ₂	<i>Burkholderia glumae</i>	99	NR102846.1	99
INU ₂	<i>Burkholderia plantarii</i>	99	AB183679.1	97
INU ₁₂	<i>Burkholderia plantarii</i>	99	AB183679.1	99
INV	<i>Bacillus subtilis</i>	99	JX433023.1	99
BMH	<i>Bacillus subtilis</i>	99	JX433023.1	99

4. DISCUSSÃO

Até o momento não existem estratégias de manejo eficientes contra a podridão vermelha do sisal na região sisaleira do estado da Bahia. Também não existem métodos de controle eficazes para a supressão da doença. Logo faz-se necessário o desenvolvimento de estratégias que visem o controle da doença em questão. A utilização do controle biológico, através do uso de microrganismos é uma eficiente ferramenta para o manejo de doenças, além de ser uma técnica considerada favorável ao meio ambiente (Tjamos et al, 2005).

No processo de busca por bactérias benéficas para o uso no controle biológico de doenças e na promoção de crescimento de plantas, o sucesso é dependente da escolha do local de busca e do seleção dos microrganismos antagonistas, sendo que várias estratégias podem ser utilizadas com essa finalidade (Fravel, 2005). Nossa primeira abordagem foi analisar se uma coleção de bactérias de ambiente de restinga apresentava potencial para utilização no controle biológico de doenças de plantas. Para tanto, avaliou-se a atividade antagônica *in vitro* frente a alguns agentes fitopatogênicos reconhecidos (*A. niger*, *Colletotrichum* sp., *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*, *Moniliophthora perniciosa* e *Phytophthora capsici*). Posteriormente os trabalhos concentraram-se em avaliar a ação antagônica a *Aspergillus niger*, visando a utilização dos isolados no controle biológico da podridão vermelha do sisal.

Todos os 18 isolados testados inibiram significativamente o crescimento micelial de todos os fitopatogênicos testados. Os antagonistas INU₁₂, INP₂, INS₂ e ING₂ foram os que mais se destacaram na inibição do crescimento micelial de *A. niger*. Resultados de antagonismo semelhantes foram encontrados por Tenorio-Salga et al., (2013) ao testarem uma coleção de 15 isolados de *Burkholderia tropica* contra quatro fitopatogênicos (*Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium oxysporum* e *Sclerotium rolfsii*), onde todos os antagonistas inibiram o crescimento micelial em comparação com o controle.

Os resultados do teste de inibição por compostos voláteis mostram que a maior parte dos isolados produzem compostos voláteis capazes de inibir significativamente o crescimento de *A. niger*. A inibição do crescimento micelial foi mais efetiva na presença de INC₂, IND₂, INF₂, ING₂, INL₂, INM₂, INP₂, INQ₂, INR₂, INS₂, INU₂ e INV, que apresentaram valores de inibição de 64%, 63%,

69%, 72%, 69%, 68%, 65%, 69%, 67%, 72%, 67%, 64,5% respectivamente. Tenorio-Salgado (2013) encontrou resultados semelhantes ao testar 15 isolados de *Burkholderia tropica* contra quatro fungos fitopatogênicos (*Fusarium culmorum*, *Fusarium oxysporum*, *Sclerotium rolfsii* e *Colletotrichum gloesporioides*), que encontrou o maior valor de inibição pelo isolado MTo296 contra o fungo *S. rolfsii* ($86 \pm 4,5\%$). Fernando et. al., (2005) ao demonstrar a atividade antifúngica de compostos voláteis produzidas por bactérias no controle do patógeno *Sclerotinia sclerotiorum* destacam a importância da produção de antibióticos voláteis no controle de patógenos presentes no solo, e comenta que esse é o local mais eficaz para esse tipo de mecanismo, já que nessas condições esses compostos teriam condição de entrar em contato com os propágulos do patógeno também presente no solo.

Além do efeito antifúngico, alguns trabalhos também relatam que substâncias voláteis produzidas por bactérias também possam estar envolvidas na promoção de crescimento de plantas (*Arabidopsis thaliana*) (Ryu et. al., 2003). Voláteis bacterianos também podem contribuir com o aumento da taxa de sobrevivência de bactérias benéficas pela diminuição de alguns potenciais concorrentes por nutrientes (Mackie; Wheatley, 1999).

A germinação de conídios de *A. niger* foi completamente inibida na presença de sobrenadantes da cultura de cinco isolados de *Burkholderia sp.* (isolados INB₂, INF₂, INM₁₂, INQ₂ e INN₂). No entanto, embora o efeito tenha sido menor, os sobrenadantes produzidos pelos isolados INP₂ e INV também foram capazes de inibir significativamente a germinação de esporos.

A inibição da germinação de esporos por filtrados de culturas pode ser explicada pela liberação de compostos antimicrobianos que podem ser produzidos tanto por *Burkholderia spp.* como por *Bacillus spp.* em meio de cultura. Kelani-Feki et al., (2011) isolou compostos com atividade antifúngica (alquil-quinona e didecil-ftalato) a partir de sobrenadantes de culturas de *B. cepacia*. Da mesma forma alguns trabalhos mostram que diferentes espécies de *Bacillus* demonstram alta atividade inibitória contra fitopatógenos, decorrente da produção de diferentes antibióticos como: bacilomicina, bacilisina, fengicina e zwittermicina A (Athukorala et al., 2009; Chen, 2009b).

Um dos primeiros passos para a implantação do biocontrole é a procura por agentes com evidente potencial, nesse sentido a estratégia mais utilizada

baseia-se na atividade antagônica expressa *in vivo* (Idris et al., 2007). Logo, os testes de casa de vegetação e campo são cruciais para confirmação do potencial expresso nas condições *in vitro*.

Nos testes realizados em casa de vegetação o isolado INB₂, apresentou os melhores resultados de eficiência de biocontrole (95,73%), juntamente com os isolados ING₂, INM₁₂ e IND₂ com eficiência de biocontrole de respectivamente 94,87%, 92,31% e 85,47%. Nesse caso, o resultado expresso por INB₂ em casa de vegetação se relaciona com o resultado obtido no teste de antagonismo *in vitro*. No entanto, os dados também mostram que isolados que apresentaram potencial antagônico *in vitro*, não confirmaram esse potencial *in vivo*. Tal exemplo pode ser evidenciada a partir dos resultados mostrados pelo isolado INU₁₂, que se destacou como o melhor antagonista nos testes de antagonismo em placa de Petri, mas não confirmou seu potencial quando testado em casa de vegetação.

O isolado BMH (*Bacillus* sp.) apresentou o menor valor de eficiência em de biocontrole em casa de vegetação (29,06%). Em campo sua eficiência foi de 58,01%, sendo considerada menor quando comparado com os outros isolados testados. Estes resultados contrastam com os apresentados por Idris et al. (2007) que ao testar isolados de *Bacillus* spp. como agentes de biocontrole contra *Fusarium oxysporum* no combate à podridão radicular em Sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench), apresentaram os melhores resultados em casa de vegetação, resultados esses que se relacionaram aos encontrados nas condições *in vitro*.

Dentre os antagonistas utilizados no trabalho, os testes em campo revelaram que INV, BMH, INR₂ e INU₁₂ apresentaram os menores valores de eficiência de biocontrole.

O antagonista *Burkholderia* sp. isolado IND₂, apresentou o melhor valor de eficiência (77,03%). Um grupo formado por 14 isolados (IND₂, INN₂, INP₂, INL₂, INC₂, INB₂, INM₂, ING₂, INN₁₂, INM₁₂, INF₂, INQ₂, INU₂ e INS₂) apresentaram resultados significativos na redução da podridão vermelha nas condições de campo testadas, não havendo diferença estatística significativa entre os valores de severidade apresentados.

Isolados de *Bacillus* sp., principalmente *B. subtilis* são considerados agentes potenciais de biocontrole de uma variedade de doenças fúngicas em

plantas (Sundaramoorthy et. al., 2012; Yang et. al., 2012; Kildea et. al., 2008; Idris et al., 2007). No entanto, os dados expostos no presente trabalho mostram claramente que os isolados de *Burkholderia* testados se mostraram mais eficientes no controle da podridão vermelha do sisal que os isolados de *Bacillus* sp. (INV) nas condições testadas.

Outro resultado que merece destaque, é que isolados que apresentam bons resultados nos testes *in vitro* nem sempre confirmam esses resultados quando testados nas condições de campo. O isolado INU₁₂, que mostrou os melhores resultados de inibição do crescimento micelial, não confirmou o seu potencial nos experimentos de casa de vegetação e campo. Outra inferência é a de que o melhor antagonista em casa de vegetação (isolado INB₂) não se destacou no grupo dos melhores produtores de compostos voláteis capazes de inibir o crescimento micelial de *A. niger*. Este resultado é comumente observado em vários trabalhos, onde um número alto de antagonistas é selecionado pela sua atividade antagonista *in vitro*, no entanto muitas vezes não existe a correlação desses dados com os obtidos nas condições de casa de vegetação e/ou campo (Williams E Asher, 1996).

Ainda em relação aos resultados por compostos voláteis, o antagonista INM₁₂ que apresentou o menor valor percentual de inibição (27,35%), se destacou entre os melhores isolados na redução da doença em casa de vegetação (eficiência de biocontrole de 92,31%), e também mostrou-se eficiente na redução da doença nas condições de campo. Isso pode significar que três situações coisas podem estar ocorrendo nas condições *in vivo*: o isolado pode estar utilizando outro mecanismo específico que não a produção de compostos voláteis para controle da doença; nas condições de solo esse isolado pode ter o seu potencial de produção de compostos voláteis amplificado por algum fator específico; ou ele lança mão de outros mecanismos que o ajude a complementar esse nível de proteção que é expresso na redução considerável da doença em casa de vegetação e campo. Sabe-se que a eficácia de um determinado agente de biocontrole é dependente, principalmente, da não utilização de um único mecanismos de ação, e sim de uma combinação de diferentes formas de atuação (Alabouvette et al., 1993), que acaba lhe garantindo vantagem.

Nesse trabalho pode-se observar que os agentes de biocontrole confirmaram sua performance na casa de vegetação em relação ao campo, no

entanto uma clara variação pode ser percebida pela análise dos valores de eficiência de biocontrole, severidade e incidência da podridão vermelha do sisal. Os isolados que mostraram potencial no controle da doença em casa de vegetação, se mantiveram significativamente eficazes na redução da doença em campo. Esse dado é interessante no sentido de auxiliar o direcionamento de novos estudos que tenham como finalidade a seleção de novos agentes eficazes no controle da podridão vermelha do sisal. Sendo assim, pode ser proposto que a seleção de agentes de controle biológico para a podridão vermelha seja prioritariamente iniciada em casa de vegetação, e posteriormente esses possíveis agentes podem ser levados às condições de campo. Essa ideia é interessante no sentido de ajudar a poupar esforços e recursos laboratoriais na triagem de agentes que acabam não apresentando um efeito de controle interessante.

Os isolados INB₂, ING₂, INM₁₂ e IND₂ apresentaram ótimos valores de biocontrole no experimento em casa de vegetação e se mantiveram no grupo dos 14 isolados que apresentaram evidente biocontrole da podridão vermelha em campo. Isso reafirma o potencial destes para uso no biocontrole da podridão vermelha. Os dados observados *in vitro* mostram a possibilidade de que esses quatro isolados utilizem diferentes mecanismos de ação para o controle da doença em questão. O isolado INB₂, foi capaz de produzir proteases e inibir a germinação de esporos e o crescimento micelial do patógeno. O isolado ING₂ apenas demonstrou ação de antibiose no crescimento micelial contra *A. niger* e outros fitopatógenos testados. O isolado INM₁₂ se destacou em vários testes, produzindo proteases, celulase e quitinase, inibindo a germinação de esporos e o crescimento micelial do patógeno. Enquanto que IDN₂ se destacou apenas na produção de compostos voláteis.

Em relação às diferenças observadas nos valores incidência, severidade e eficiência de biocontrole (em casa de vegetação e campo), vários são os fatores que podem estar ligados a essas diferenças. Em casa de vegetação os testes foram realizados com solo autoclavado, enquanto que nas condições de campo a microbiota natural pode ter tido influência. Também é relatado em alguns trabalhos que a eficiência dos agentes de biocontrole depende em parte do inóculo inicial do patógeno, e atribuem as diferenças observadas à flutuações

de população do patógeno que ocorrem naturalmente no campo (Algam et al., 2004; Ramesha, R.; Phadke, 2012).

Várias espécies pertencentes ao gênero *Burkholderia* são descritas como bons antagonistas e agentes biocontrole (Altindag et al., 2006; Heydari; Misaghi, 1998; Recep et. al., 2009). Testes *in vitro* contra *Fusarium sambucinum*, *Fusarium oxysporum* e *Fusarium culmorum*, foram realizados por Recep et. al., (2009) destaca o isolado OSU-7 de *B. cepacia* como o que apresentou os maiores valores de inibição. Nesse mesmo estudo 17 isolados são testados para o controle da podridão seca da batata causada por três espécies de fungos em duas cultivares de batata, o antagonista mostrou resultados significativos sobre o controle da doença.

Embora não se possa afirmar com certeza, os dados apresentados indicam a possibilidade de que esse seja o primeiro relato de isolados filogeneticamente relacionados às espécies *Burkholderia plantarii* e *Burkholderia glumae* mostrando atividade de biocontrole em plantas. Essas espécies são reconhecidamente descritas como fitopatógenos agressivos que causam podridão bacteriana (*Burkholderia plantarii*) e morte (*Burkholderia glumae*) em mudas de arroz (Uematsu, et. al., citado por Maeda, 2006; Azegami et. al., 1987). Testes de patogenicidade realizados em casa de vegetação (dados não mostrados) confirmaram que esses isolados não são capazes de causar doença em plantas de sisal.

Dos cinco antibióticos procurados através da amplificação de genes por PCR, apenas um tipo foi encontrado em dois antagonistas. O gene *bamC* foi detectado nos isolados INV e BMH, sugerindo que os mesmos podem produzir o antibiótico Bacilomicina (**Figura em anexo**). É provável que os bons resultados apresentados nos testes de germinação de esporos utilizando sobrenadantes da cultura de INV, possam ser explicados pela presença desse antibiótico. Para os outros isolados, não foi detectado a presença dos genes procurados. No entanto, os resultados mostrados na germinação de esporos de *A. niger* sugerem que INB₂, INF₂, INM₁₂, INQ₂, INN₂ e INP₂ produzem algum composto inibidor que é liberado no meio de cultura, e tem atuação comprovada na inibição da germinação de esporos.

A análise do genoma de estirpes de *Bacillus* spp. que apresentam atividade comprovada de biocontrole, tem revelado que cerca de 4 a 8,5% do

seu genoma é dedicado a produção de compostos secundários (Chen et al., 2007; 2009; Earl et al., 2008).

A presença do gene *prnD* gene envolvido com a biossíntese do antibiótico Pirrolnitrina, não foi detectado via PCR. Mas sabe-se que várias espécies de *Burkholderia* e *Pseudomonas* são produtoras de Pirrolnitrina, e esse antibiótico apresenta alta atividade antifúngica contra vários grupos (Ascomycotas, Basidiomicotas e Deuteromicotas) (Raaijmakers et al., 2002). O potencial apresentado por *Burkholderia* spp. e *Bacillus* spp. de sintetizar uma grande quantidade de compostos antifúngicos é fator determinante na sua capacidade de controlar fitopatógenos quando aplicados como agentes de biocontrole (Kelani-Feki, 2011; Athukorala; Fernando; Rashid, 2009), além de possuírem capacidade para promover a resistência sistêmica induzida (Ryu et al., 2004).

Os isolados de *Burkholderia* utilizados neste trabalho apresentaram diferentes resultados para os testes *in vitro* e para os testes realizados em casa de vegetação e campo. O sequenciamento do gene 16S do rRNA mostra que esses isolados estão muito relacionados filogeneticamente a *Burkholderia plantarii* e *Burkholderia glumae* (Tabela 3). Foi feita a análise genotípica por rep-PCR utilizando o primer BOXA-1 com o intuito de esclarecer as diferenças existentes entre esses isolados. No entanto, o resultado não mostrou diferenças genotípicas entre os isolados de *Burkholderia*. Sendo assim, os resultados de diversidade são congruentes com os resultados do 16S.

Anotações geradas a partir da análise dos genomas completamente sequenciados, vem mostrando que dentro de uma mesma espécie o conteúdo gênico do genoma pode variar muito entre indivíduos. Isso pode ser observado naturalmente em *E. coli* e em outras espécies, como *Burkholderia cenocepacia*. O genoma do isolado IA139 de *E. coli* apresentou um total de 5.029 genes, enquanto que o isolado str. K-12 mostrou um total de 4.497 (Touchon et al., 2009; Riley et al., 2005). *Burkholderia cenocepacia* também mostra divergências nos valores de conteúdos gênicos de diferentes cepas. O isolado J2315 de *B. cenocepacia* apresenta conteúdo gênico de 7.365 genes enquanto que o isolado AU 1054 apresenta 6,632 genes (Holden et al., 2008). Essa é uma provável explicação para as divergências de resultados encontrados para os isolados de *Burkholderia*.

Ao longo dos últimos 40 anos vários estudos têm demonstrado que metabólitos, antibióticos, compostos voláteis e enzimas produzidas por bactérias de solo e associadas a plantas são considerados fatores chaves na supressão de fitopatógenos (Raaijmakers, 2002; Hass, 2005; Lugtenberg; Kamilova, 2009).

Nesse estudo mostramos que cepas do gênero *Burkholderia* e *Bacillus* possuem potencial para o biocontrole da podridão vermelha do sisal causado pelo fungo *Aspergillus niger*. Sendo os isolados de *Burkholderia* sp. os que mais se destacaram.

REFERÊNCIAS

- Agrios, G. N. Plant pathology. Burlington, MA: Elsevier Academic, 2005. 922p.
- Al-Mughrabi, K. I.; Vikram, A.; Peters, R. D.; Howardc, R. J.; Grant, L.; Barasubiye, T.; Lynch, K.; Poirier, R.; Drake, K. A.; Macdonald, I. K.; Lisowski, S. L. I.; Jayasuriya, K. E. 2013. Efficacy of *Pseudomonas syringae* in the management of potato tuber diseases in storage. *Biological Control* 64, 315-322.
- Alabouvette, C.; Lemanceau, P.; Steinberg, C. 1993. Recent Advances in the biological control of *Fusarium* wilts. *Pest Science* 37, 365-373.
- Algam, S.A., Xie, G. L.; Li, B.; Coosemans, J. 2004. Comparative performance of *Bacillus* spp. in growth promotion and suppression of tomato bacterial wilts caused by *Ralstonia solanacearum*. *Journal of Zhejiang University* 30, 603-610.
- Altindag, M.; Sahin, M.; Esitken, A.; Ercisli, S.; Guleryuz, M.; Donmez, M.F.; Sahin, F. 2006. Biological control of brown rot (*Moniliana laxa* Ehr.) on apricot (*Prunus armeniaca* L. cv. *Hacıhaliloglu*) by *Bacillus*, *Burkholdria* and *Pseudomonas* application under in vitro and in vivo conditions. *Biological Control* 38, Orlando, 369–372.
- Alves, M. O.; Santiago, E. G.; Lima, A. R. M., 2005. Diagnóstico sócioeconômico do setor sisaleiro do Nordeste brasileiro. Fortaleza, Banco do Nordeste do Brasil, (Série Documentos do ETENE n° 04).
- Arrebola, E.; Sivakumar, D.; Korsten, L. 2010. Effect of volatile compounds produced by *Bacillus* strains on postharvest decay in citrus. *Biological Control* 53, 122-128.
- Athukorala, S. N. P., Fernando, W. G. D.; Rashid, K. Y. 2009. Identification of antifungal antibiotics of *Bacillus* species isolated from different microhabitats using polymerase chain reaction and MALDI-TOF mass spectrometry, *Canadian Journal of Microbiology* 55, n. 9, 1021-1032.
- Azegami, K., Nishiyama, K., Watanabe, Y., Kadota, I., Ohuchi, A., Fukazawa, C. 1987. *Pseudomonas plantarii* sp. nov., the causal agent of rice seedling blight. *International Journal of Systematic Bacteriology* 37, 144-152.
- Baker, K. F. 1987. Evolving concepts of biological control of pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 25, 67-85.
- Chen X. H.; Koumoutsi, A.; Scholz, R.; Eisenreich, A.; Schneider, K.; Heinemeyer, L.; Morgenstern, B.; Voss, B.; Hess, W. R.; Reva, O.; Junge, H.; Voigt, B.; Jungblut, P. R.; Vater, J.; Süßmuth, R.; Liesegang, H.; Strittmatter, A.; Gottschalk, G.; Borriss, R. 2007. Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Nature Biotechnology* 25, 1007–1014.

Chen, X.H.; Koumoutsis, A.; Scholz, R.; Schneider, K.; Vater, J. Sussmuth, R.; Piel, J.; Borriss, R. 2009. Genome analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 reveals its potential for biocontrol of plant pathogens. *Journal of Biotechnology* 140, 27–37, 2009.

Chen, X.; Scholz, R.; Borriss, M.; Junge, H.; Mogel, G.; Kunz, S.; Borriss, R. 2009b. Difficidin and bacilysin produced by plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* are efficient in controlling fire blight disease, *Journal of Biotechnology*, v.140 p.38-44.

COUTINHO, W. M.; LUZ, C. M.; Suassuna, N. D.; Silva, O. R. R. F.; Suinaga, F. A. 2006a. A podridão do tronco do sisal. Campina Grande, PB: Embrapa Algodão, 4 p. (Embrapa Algodão. Comunicado Técnico, 281).

Coutinho, W.M.; Suassuna, N.D.; Luz, C.M. da; Suinaga, F.A.; Silva, O.R.R.F. da. 2006b. Bole rot of sisal caused by *Aspergillus niger* in Brazil. *Fitopatologia Brasileira* 31, 605.

Delaney, S.M.; Mavrodi, D.; Bonsall, V.R.F.; Thomashow, L.S. 2001. *phzO*, a gene for biosynthesis of 2-hydroxylated phenazine compounds in *Pseudomonas aureofaciens* 30-84. *Journal of Bacteriology* 183, 318-327.

De Souza, J.T.; Raaijmakers, J.M. 2003. Polymorphisms within the *prnD* and *pltC* genes from pyrrolnitrin and pyoluteorin producing *Pseudomonas* and *Burkholderia* spp. *FEMS Microbiology Ecology* 43, 21-34.

Dunn, C., Crowley, J.J., Moënne-Loccoz, Y., Dowling, D.N., De Bruijn, F.J., O'gara, F. 1997. Biological control of *Pythium ultimum* by *Stenotrophomonas maltophilia* W18 is mediated by an extracellular proteolytic activity. *Microbiology* 143, 3921-3931.

Earl A. M, Losick R, Kolter R. 2008. Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. *Trends Microbiology* 16, 269-275.

Fravel, D. R. 2005. Commercialization and implementation of biocontrol. *Annual Review Phytopathology* 43, 337-359.

Fernando, W. G. D.; Ramarathanam, R.; Krishnamoorthy, A. S.; Savchuk, S. C. 2005. Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol. *Soil Biology and Biochemistry* 37, 955-964.

Ferreira, D.F. 2000. Análises estatísticas por meio do SISVAR para Windows versão 4.0. In: Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade Internacional de Biometria, vol 45, São Carlos, 2000. Resumos. São Carlos: UFSCAR, 2000. p. 255 – 258.

Haas, D.; Defago, G. 2005. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Reviews Microbiology* 3, 307-319.

Heydari, A.; Misaghi, I. J. 1998. Biocontrol activity of *Burkholderia cepacia* against *Rhizoctonia solani* in herbicide-treated soils. *Plant Soil* 202, 109-116, 1998.

Holden M. T.; Seth-Smith, H. M.; Crossman, L. C.; Sebaihia, M.; Bentley, S. D.; Cerdeño-Tárraga, A. M.; Thomson, N. R.; Bason, N.; Quail, M.A.; Sharp, S.; Cherevach, I.; Churcher, C.; Goodhead, I.; Hauser, H.; Holroyd, N.; Mungall, K.; Scott, P.; Walker, D. White, B. Rose, H.; Iversen, P.; Mil-Homens, D.; Rocha E. P.; Fialho, A. M.; Baldwin, A.; Dowson, C.; Barrell, B. G.; Govan, J. R.; Vandamme, P.; Hart, C. A.; Mahenthiralingam, E.; Parkhill, J. 2008. The genome of *Burkholderia cenocepacia* J2315, an epidemic pathogen of cystic fibrosis patients. *Journal of Bacteriology* 191, n.1, 261-277.

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

Idris, H. A.; Labuschagne, N., Korsten, L. 2007. Screening rhizobacteria for biological control of *Fusarium* root and crown rot of sorghum in Ethiopia. *Biological Control* 40, n.1, 97-106.

Kelani-Feki, O. Culioli, G.; Ortalo-Magné, A.; Zouari, N.; Blach, Y.; Jaoua, S. 2011. Environmental *Burkholderia cepacia* Cs5 acting by two analogous alkyl-quinolones and a didecyl-phtalate against a broad spectrum of phytopathogens fungi, *Current Microbiology* 62, n.5, 1490-1495.

Kildea, S.; Ransbotyn, V.; Khan, M. R.; Fagan, B.; Leonard, G.; Mullins, E.; Doohan, F. M. 2008. *Bacillus megaterium* shows potential for the biocontrol of septoria tritici blotch of wheat. *Biological Control* 47, 37-45.

Lacerda, L. D.; Araujo, D. S. D.; Maciel, N. C. 1993. Dry coastal ecosystems of the tropical Brazilian coast. 1993. Pp. 477–493 in van der Maarel, E. (ed.) *Dry coastal ecosystems: Africa, America, Asia and Oceania*. Elsevier, Amsterdam.

Li, Q.L., Jiang, Y.H., Ning, P., Zheng, L., Huang, J.B., Li, G.Q., Jiang, D.H., Hsiang, T. 2011. Suppression of *Magnaporthe oryzae* by culture filtrates of *Streptomyces globisporus* JK-1. *Biological Control* 58, 139-148.

Lugtenberg, B., Kamilova, F. 2009. Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual Review Microbiology* 63, 541-556.

Luria, S. E., BURROUS, J. W. 1957. Hybridization between *Escherichia coli* and *Shigella*. *Journal of Bacteriology* 74, 461-476.

Mackie, A. E., Wheatley, R. E. 1999. Effects of the incidence of volatile organic compound interactions between soil bacterial and fungal isolates. *Soil Biology and Biochemistry* 31, 375-385, 1999.

Maeda, Y., Shinohara, H., Kiba, A., Ohnishi, K., Furuya, N., Kawamura, Y., Ezaki, T., Vandamme, P., Tsushima, S., Hikichi, Y. 2006. Phylogenetic study and multiplex PCR-based detection of *Burkholderia plantarii*, *Burkholderia glumae*

and *Burkholderia gladioli* using *gyrB* and *rpoD* sequences. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 56, 1031-1038.

Mckinney, H. H. 1923. A new system of grading plant diseases. Journal of Agricultural Research 26, 195-218.

McSpadden-Gardener, B. B., Schroeder, K. L., Kaloger, S. E., Raaijmakers, J. M., Thomashow, L. S., Weller, D. M. 2000. Genotypic and phenotypic diversity of pHID-containing *Pseudomonas* isolated from the rhizosphere of wheat. Applied and Environmental Microbiology 66, 1939–1946.

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

Nikam, T. D.; Bansude, G. M.; Aneesh Kumar, K. C. 2003. Somatic embryogenesis in sisal (*Agave sisalana* Perr. ex. Engelm). Plant cell reports 22, n. 3, 188-194.

Raaijmakers, J. M., Vlami, M., de Souza, J. T. 2002. Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. Antonie van Leeuwenhoek 81, 537–547.

Raffel, S. J., Stabb, E. V.; Milner, J. L., Handelsman, J. 1996. Genotypic and phenotypic analysis of zwittermicin A-producing strains of *Bacillus cereus*. Microbiology 142, 3425–3436.

Ramarathnam, R., Bo, S., Chen, Y., Fernando, D.W.G., Xuewen, G., De Kievit, T. 2007. Molecular and biochemical detection of fengycin and bacillomycin D-producing *Bacillus* spp., antagonistic to fungal pathogens of canola and wheat. Canadian Journal of Microbiology 53, 901-911.

Ramesha, R., Phadke, G. S. 2012. Rhizosphere and endophytic bacteria for the suppression of eggplant wilt caused by *Ralstonia solanacearum*. Crop Protection 37, 35-41..

Recep, K., Fikretin, S., Erkol, D., Cafer, E. 2009. Biological control of the potato dry rot caused by *Fusarium* species using PGPR strains. Biological Control 50, 194–198.

Riley, M., Abe, T., Arnaud, M. B., Berlyn, M. K., Blattner, F. R., Chaudhuri, R. R., Glasner, J. D., Horiuchi, T., Keseler, I. M., Kosuge, T., Mori, H., Perna, N. T., Plunkett, G. R. D., Rudd, K. E., Serres, M. H., Thomas, G. H., Thomson, N. R., Wishart, D., Wanner, B. L. 2005. *Escherichia coli* K-12: a cooperatively developed annotation snapshot. Nucleic Acids Research, v.34, n.1, p.1-9.

Roberts, W. K., Selitrennikoff, C. P. 1988. Plant and bacterial chitinases differ in antifungal activity. Journal of General Microbiology 134, 169-176.

Ryu, C. M., Farag, M. A., Hu, C. H., Reddy, M. S., Wei, H. X., Pare, P. W., Kloepper, J. W. 2003. Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. Proceedings of the National Academy of Sciences 100, 4927–4932.

Ryu, C. M.; Farag, M. A.; Hu, C. H.; Reddy, M. S.; Kloepper, J. W.; Pare, P. W. Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis*, *Plant Physiology* 134, 1017-1026.

Sá, J. O. 2009. Patogênese de *Aspergillus niger* e biocontrole da podridão vermelha do sisal por *Trichoderma* spp.. Cruz das Almas, 2009. 65 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias). UFRB.

Santos, P. O. 2011. Espécies de *Aspergillus* associadas à podridão vermelha do caule do sisal. Cruz das Almas, 2011. 67p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola), UFRB.

Sundaramoorthy, S., Raguchander, T., Ragupathi, N., Samiyappan, R. 2012. Combinatorial effect of endophytic and plant growth promoting rhizobacteria against wilt disease of *Capsicum annum* L. caused by *Fusarium solani*. *Biological Control* 60, 59-67.

Sharma, S., Varshney, K. 2012. Chemical analysis of agave sisalana juice for its possible utilization. *Acta Chimica and Pharmaceutica Indica* 2, n.1, 60-66.

Soares, A. C. F.; Salomão, M. S.; Almeida, N. de S.; Perez, J. O.; Garrido, M. da S. 2006. *Aspergillus niger* como agente causal de manchas foliares e podridão do pseudocaule do sisal. In: XXXIX Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Salvador, Anais... BA.

Suinaga, F. A.; Silva, O. R. R. F.; Coutinho, W. M. Cultivo de sisal na região Semiárida do Nordeste Brasileiro. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2006. 44 p. (Sistemas de Produção, 5).

Teather, R. N., Wood, P. J. 1982. Use of congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Applied and Environmental Microbiology* 43, 777-780.

Tenorio-Salgado, S., Tinoco, R., Vazquez-Duhalt, R., Caballero-Mellado, J., Perez-Rueda, E. 2013. Identification of volatile compounds produced by the bacterium *Burkholderia tropica* that inhibit the growth of fungal pathogens. *Bioengineered* 4, n.4, 236-243.

Tjamos, S. E., Flemetakis, E., Paplomatas, E. J., Katinakis, P. 2005. Induction of resistance to *Verticillium dahliae* in *Arabidopsis thaliana* by the biocontrol agent K-165 and pathogenesis-related proteins gene expression. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 18, 555-561.

Touchon, M., Hoede, C., Tenailon, O., Barbe, V., Baeriswy. S., Bidet, P. Bingen, E., Bonacorsi, S. Bouchier, C., Bouvet, O, Calteau, A., Chiapello, H., Clermont, O., Cruveiller, S., Danchin, A., Diard, M., Dossat, C., Karoui, M. E., Frapy, E., Garry, L., Ghigo, J. M., Gilles, A. M., Johnson, J. L., Lescat, M., Mangenot, S., Martinez-Jéhanne, V., Matic I., Nassif, X., Oztas, S., Petit, M. A., Pichon, C., Rouy, Z., Ruf, C. S., Schneider, D., Turret, J., Vacherie, B., Vallenet,

D.; Médigue, C., Rocha, E. P., Denamur E. 2009. Organised genome dynamics in the *Escherichia coli* species results in highly diverse adaptive paths. *Plos Genetics* 5, n.1.

Turner, S., Pryer, K. M., Miao, V. P. W., Palmer, J. D. 1999. Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 46, p.327–338.

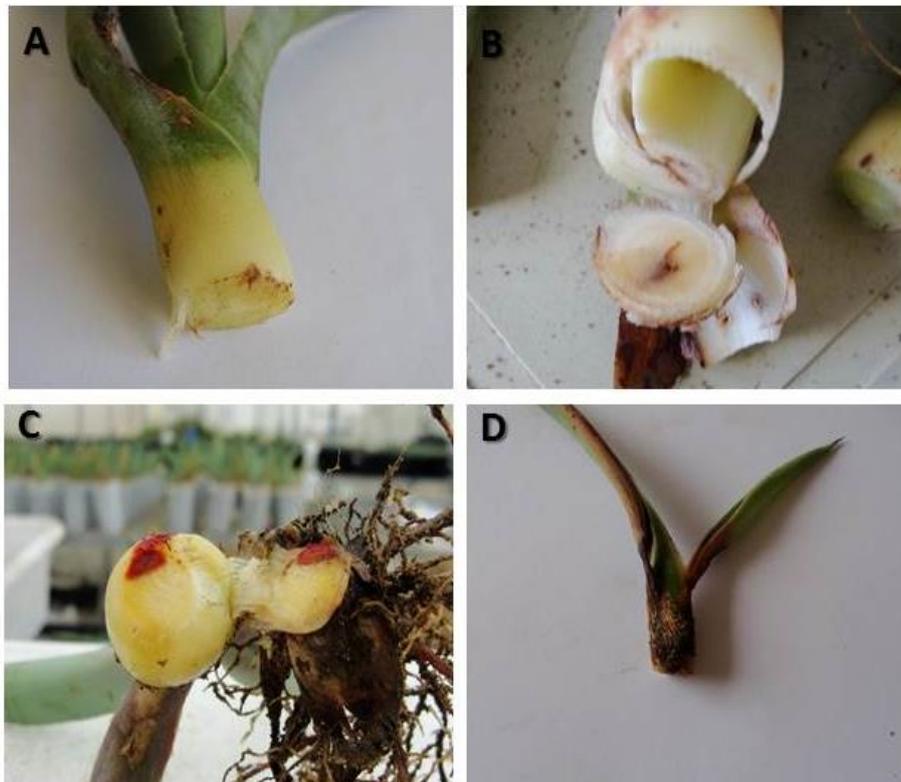
Williams, G. E., Asher, M.J.C. 1996. Selection of rhizobacteria for the control of *Pythium ultimum* and *Aphanomyces cochlioides* on sugar-beet seedlings. *Crop Protection*, v.15, p.479-486.

Vasiliauskas, R., Lygis, V., Thor, M.; Stenlid, J. 2004. Impact of biological (Rotstop) and chemical (urea) treatments on fungal community structure in freshly cut *Picea abies* stumps. *Biological Control*, n. 31, p. 405-413.

Versalovic, J., Schneider, M., Debruijn, F. J., Lupski, J. R. 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular and Cellular Biology*, New Jersey, v.5, p.25-40.

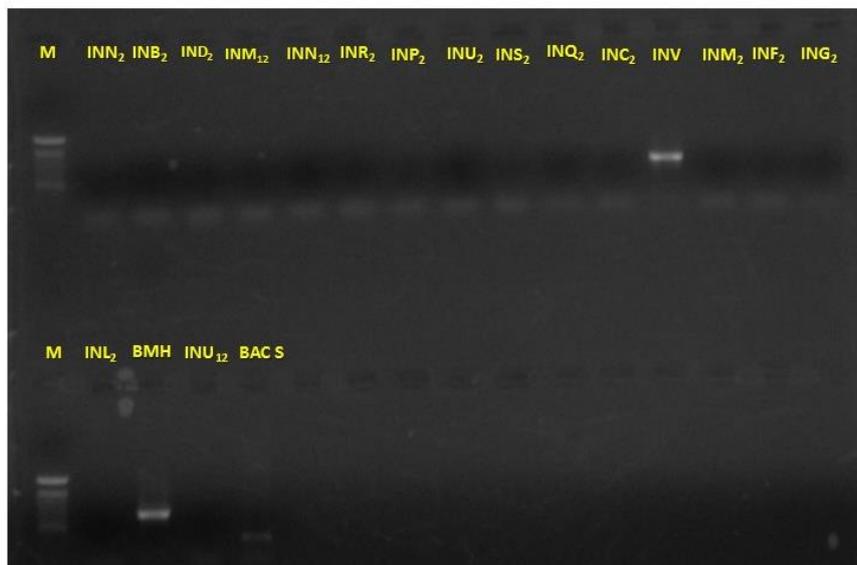
Yang, W. et. al., 2012. Evaluation of biological control agents against *Ralstonia* wilt on ginger. *Biological Control*, v. 62, n. p. 144-151.

ANEXO A: Escala de notas utilizada para avaliar a severidade da podridão vermelha do sisal em mudas



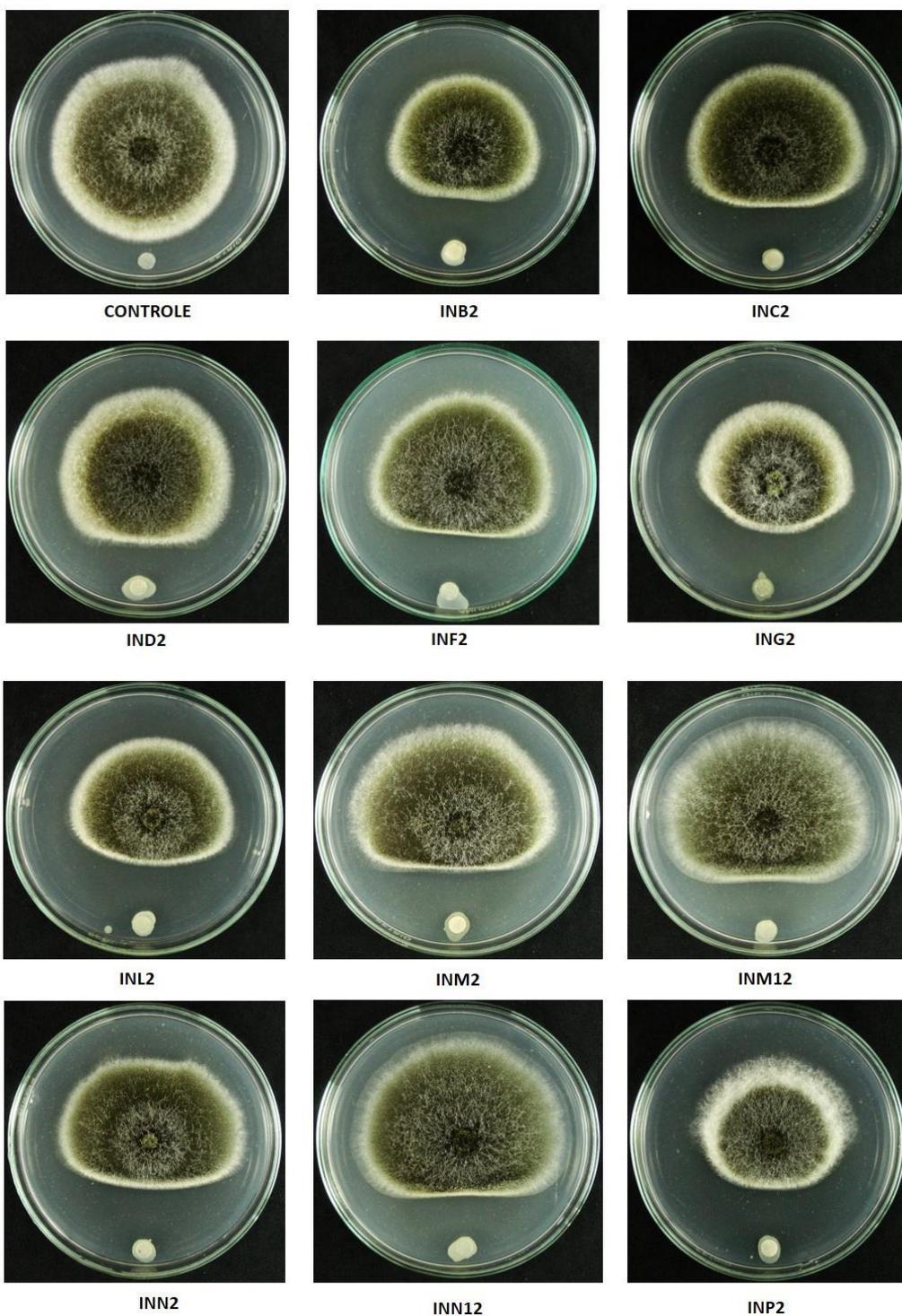
Escala de nota utilizada para avaliar a severidade da podridão vermelha do em sisal mudas. (A) Nota 0 – Planta sadia; (B) Nota 1 – Sintoma inicial, percebe-se o escurecimento dos tecidos internos do caule; (C) Nota 2 – Vermelhidão dos tecidos internos do caule; (D) Nota 3 – Planta morta. (Sá, 2009).

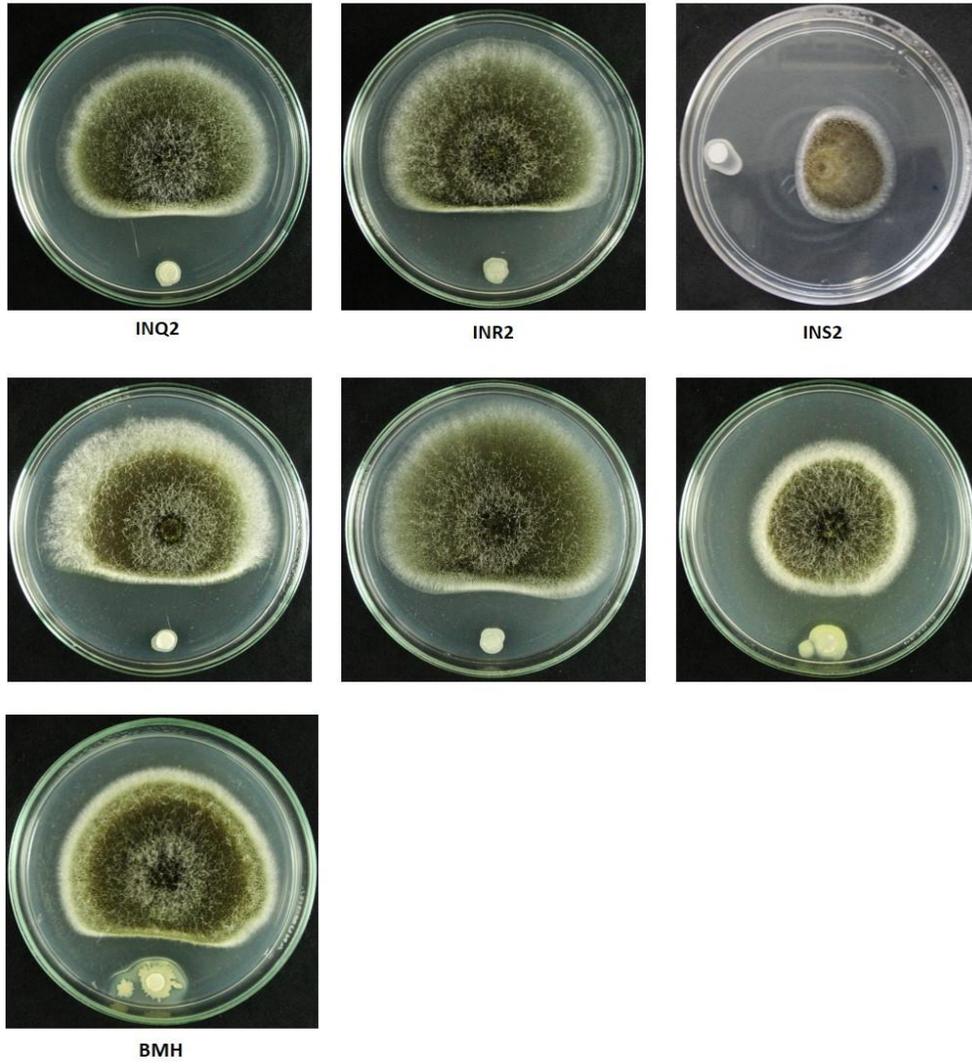
ANEXO B: PRESENÇA DE GENES ENVOLVIDOS COM BIOSÍNTESE DE ANTIBIÓTICOS



Detecção por meio de PCR em gel de agarose do fragmento correspondente ao gene (*bamC*) envolvido com a biossíntese de Bacilomicina. (M) – Marcador molecular (DNA Ladder);

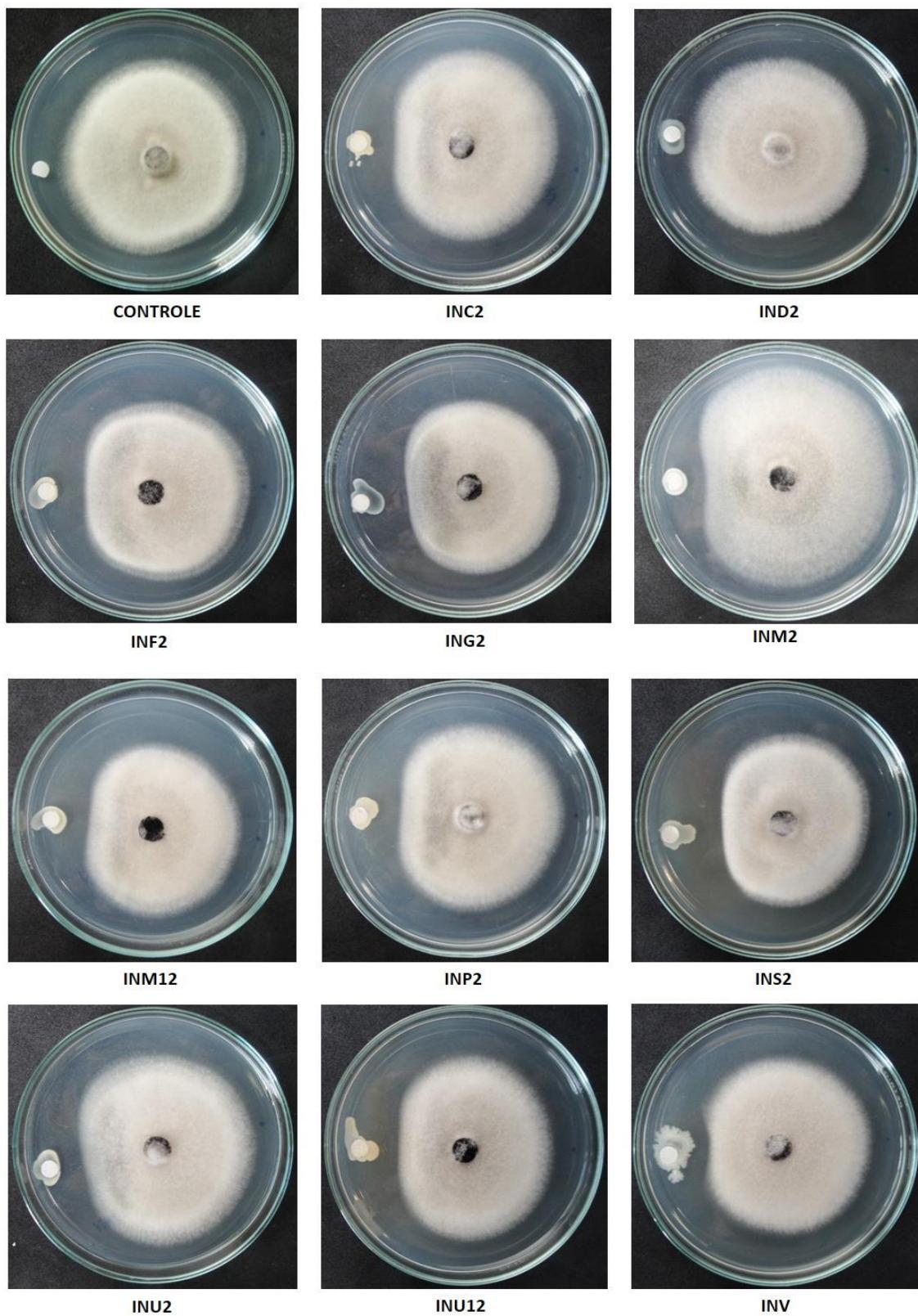
ANEXO C: ANTAGONISMO DE CEPAS DE BACTÉRIAS CONTRA O FUNGO
Aspergillus niger





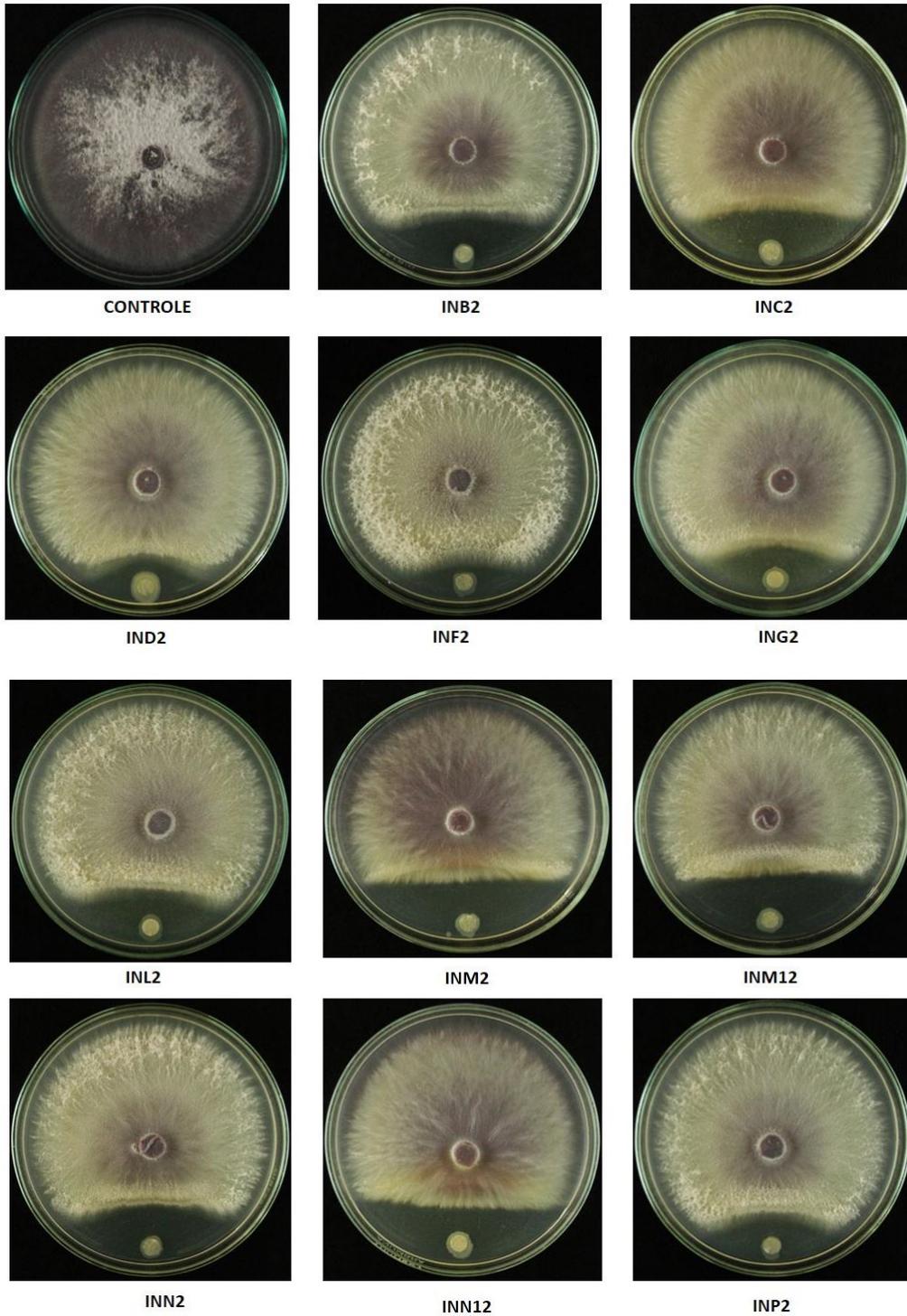
Antagonismo de cepas bacterianas contra *Aspergillus niger* (Isolado 131).

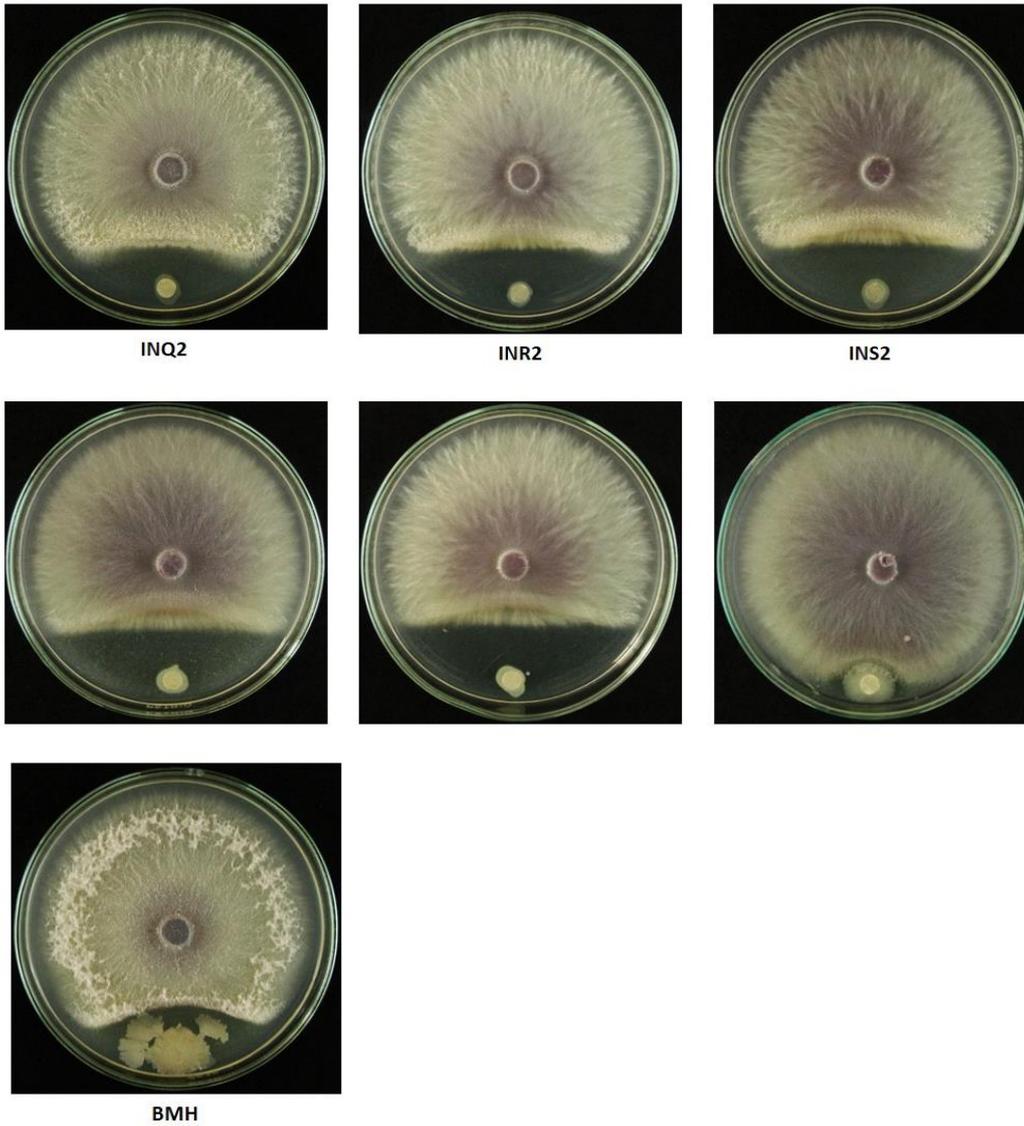
ANEXO D: ANTAGONISMO DE CEPAS DE BACTÉRIAS CONTRA O FUNGO *Colletotrichum* sp.



Antagonismo de cepas bacterianas contra *Colletotrichum* sp.

ANEXO E: ANTAGONISMO DE CEPAS DE BACTÉRIAS CONTRA O FUNGO
Fusarium oxysporum* fs. *cubense





Antagonismo de cepas bacterianas contra *Fusarium oxysporum* fs. *Cubense*

ANEXO F: ANTAGONISMO DE CEPAS DE BACTÉRIAS CONTRA O FUNGO***Moniliophthora perniciosa***

CONTROLE



INB2



INC2



IND2



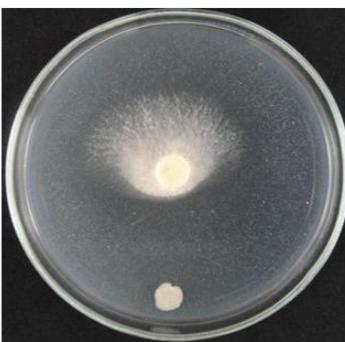
INF2



ING2



INL2



INM2



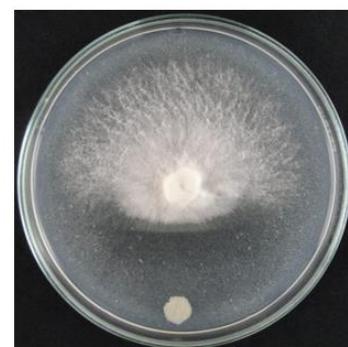
INM12



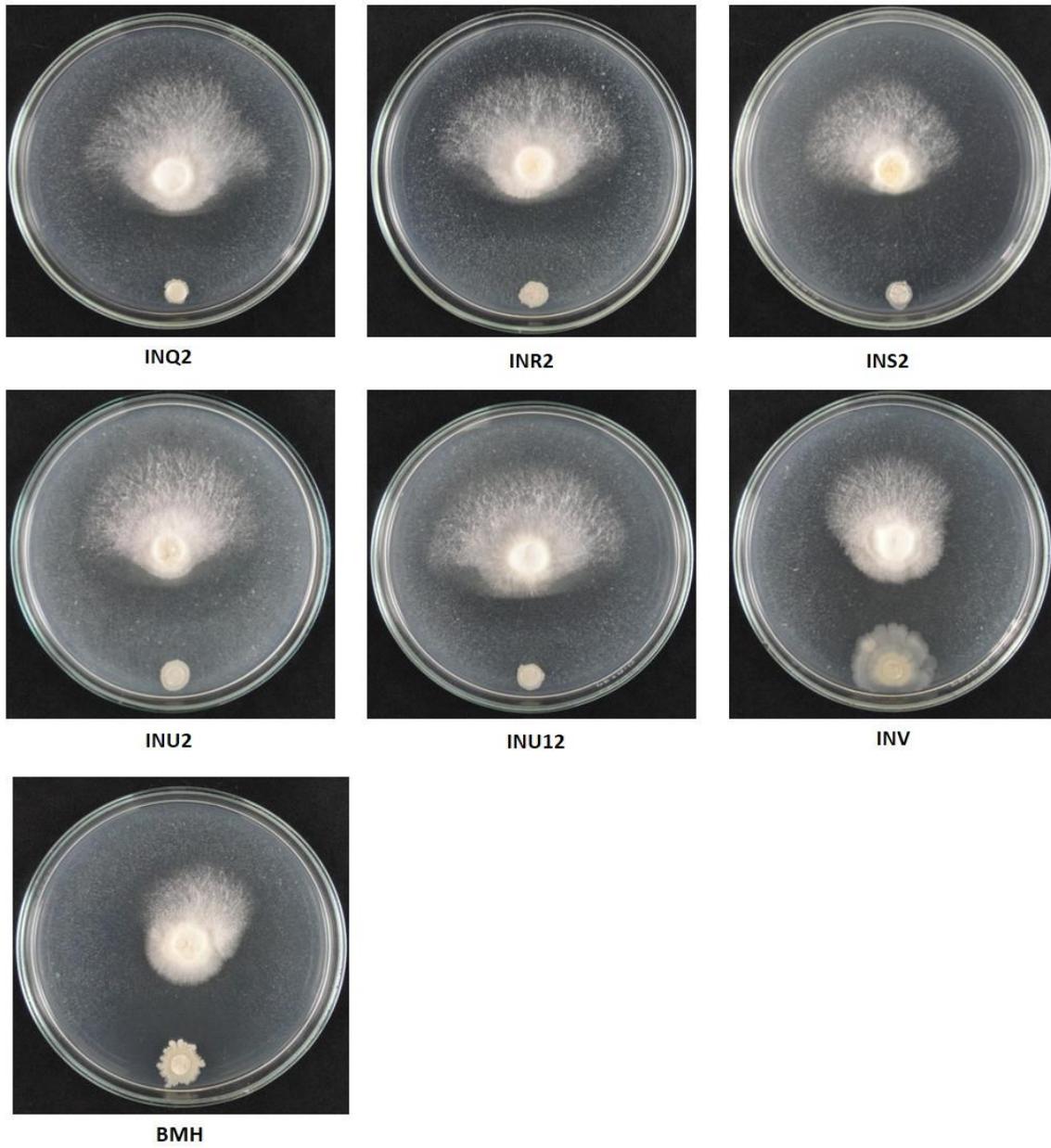
INN2



INN12



INP2

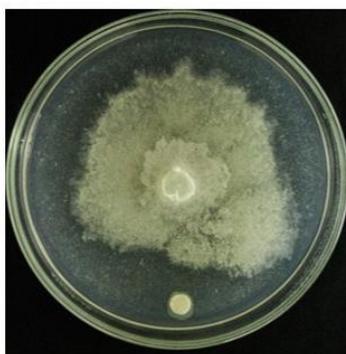


Antagonismo de cepas bacterianas contra *Moniliophthora perniciosa*

ANEXO G: ANTAGONI-SMO DE CEPAS DE BACTÉRIAS CONTRA *Phytophthora palmivora*



CONTROLE



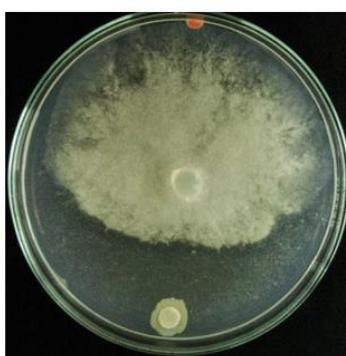
INB2



INC2



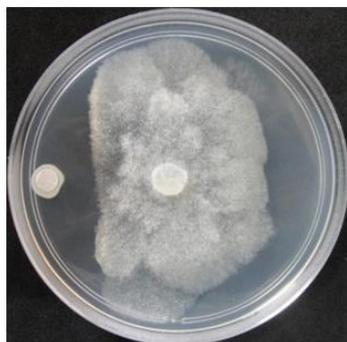
IND2



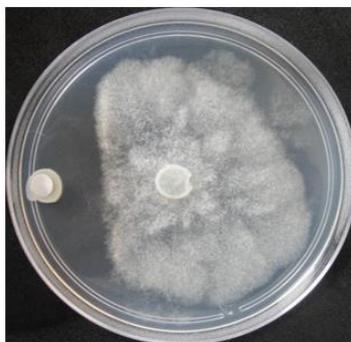
INF2



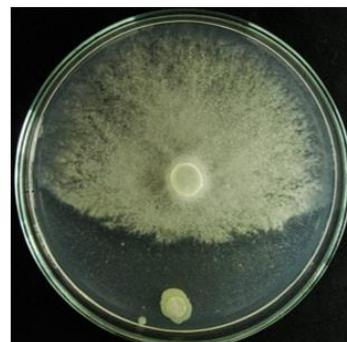
ING2



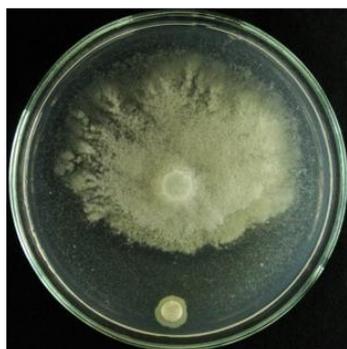
INL2



INM2



INM12



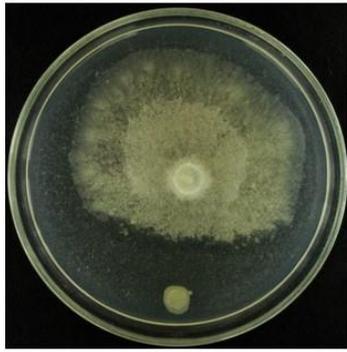
INN2



INN12



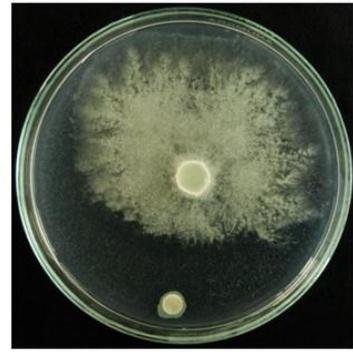
INP2



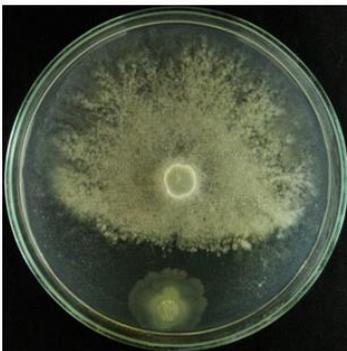
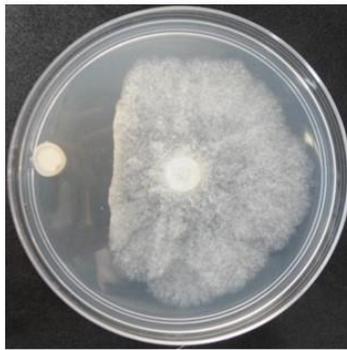
INQ2



INR2



INS2



BMH

Antagonismo de cepas bacterianas contra *Phytophthora palmivora*

**ANEXO H: ENSAIO DE BIOCONTROLE EM CONDIÇÕES DE CAMPO
UTILIZANDO 18 ISOLADOS BACTERIANOS – JACOBINA, BAHIA, BRASIL.**



INM2



INB2



INF2



INU12



INR2



INS2



ING2



IND2



INV



INM12



INU2



INN12



INP2



INL2



INQ2



BMH

**INN2****INC****Tratamento Água****Tratamento Aspergillus**

Efeito antagonista dos isolados INB₂, INC₂, IND₂, INF₂, INL₂, ING₂, INM₂, INM₁₂, INN₂, INN₁₂, INP₂, INQ₂, INR₂, INS₂, INU₂, INU₁₂, INV e BMH em campo.