



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
CURSO DE BACHARELADO EM BIOLOGIA**



**RAFAELA VASQUES DOS SANTOS OLIVEIRA**

**USO DE FUNGOS E BACTÉRIAS COMO AGENTES DE  
BIOCONTROLE NO MANEJO DAS PODRIDÕES RADICULARES  
NA MANDIOCULTURA: ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E  
VALIDAÇÃO DO POTENCIAL ANTAGÔNICO**

Cruz das Almas – BA  
Dezembro de 2022

RAFAELA VASQUES DOS SANTOS OLIVEIRA

**USO DE FUNGOS E BACTÉRIAS COMO AGENTES DE  
BIOCONTROLE NO MANEJO DAS PODRIDÕES RADICULARES  
NA MANDIOCULTURA: ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E  
VALIDAÇÃO DO POTENCIAL ANTAGÔNICO**

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado como requisito para obtenção do grau de Bacharel em Biologia ao curso de Bacharelado em Biologia, da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias Ambientais e Biológicas.

**Orientador (a):** Dra. Patrícia Luz Ribeiro  
**Coorientador:** Dr. Saulo Alves Santos de Oliveira

Cruz das Almas – BA  
Dezembro de 2022

# TERMO DE APROVAÇÃO DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Rafaela Vasques dos Santos Oliveira

Uso de fungos e bactérias agentes de biocontrole no manejo das  
podridões radiculares na mandiocultura: isolamento,  
caracterização e validação do potencial antagônico

## BANCA EXAMINADORA



Documento assinado digitalmente  
PATRICIA LUZ RIBEIRO  
Data: 16/12/2022 16:50:46-0300  
Verifique em <https://verificador.itl.br>

---

Profa. Dra. Patrícia Luz Ribeiro  
orientadora

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB)



Documento assinado digitalmente  
MARCIA LUCIANA CAZETTA  
Data: 26/12/2022 09:44:14-0300  
Verifique em <https://verificador.itl.br>

---

Profa. Dra. Márcia Luciana Cazetta  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB)



Documento assinado digitalmente  
MARIA SELMA ALVES SILVA DIAMANTINO  
Data: 18/12/2022 00:38:34-0300  
Verifique em <https://verificador.itl.br>

---

Prof. Dra. Maria Selma Alves Silva Diamantino  
EMBRAPA/CNPMP

CRUZ DAS ALMAS

Dezembro de 2022.

*“Que todos os nossos esforços estejam sempre focados no desafio à impossibilidade. Todas as grandes conquistas humanas vieram daquilo que parecia impossível”.*

(Charles Chaplin)

OLIVEIRA, Rafaela Vasques dos Santos. **Uso de fungos e bactérias como agentes de biocontrole no manejo das podridões radiculares na mandiocultura: isolamento, caracterização e validação do potencial antagônico**. 2022. 46p. Orientador(a): Patrícia Luz Ribeiro / Coorientador: Saulo Alves Santos de Oliveira. Monografia (Graduação em Bacharelado em Biologia) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, BA, dezembro de 2022.

## RESUMO

A cultura da mandioca, além da sua importância na segurança alimentar, também tem uma gama de utilizações industriais que lhe confere um enorme potencial para estimular o desenvolvimento e aumentar os rendimentos produtivos. Entretanto, um dos estresses bióticos mais limitantes desta cultura são as podridões radiculares, um complexo de doenças provocadas por fungos que causa alto impacto econômico. Assim, diante da escassez de variedades resistentes, dos danos e da baixa eficiência do controle químico, faz-se necessária a busca por vias alternativas para o manejo destas doenças. Nesse sentido o objetivo deste trabalho foi isolar e caracterizar microrganismos como agentes de controle biológico da rizosfera e rizoplane da cultura da mandioca (*Manihot esculenta*), testando o potencial antagonista *in vitro* dos isolados contra fitopatógenos causadores de podridões na própria cultura. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Mandioca e Fruticultura. Realizaram-se coletas de solos e raízes de mandioca em 6 locais da cidade de Cruz das Almas Bahia, onde a plantação de mandioca se manteve consecutiva por um longo tempo, afim de isolar microrganismos de grupos específicos, como *Trichoderma*, bactérias produtoras de endósporos e actinobactérias, com potencial biocontrolador. Para tanto, fez-se uso de meios seletivos e do processo de diluição seriada. Seguido de caracterização morfológica e testes de patogenicidade humana (37 °C) e em planta, com folha destacada de mandioca (BRS Formosa) e por fim, pareamentos *in vitro* do tipo “duplo” e “quatro pontos” para validação do potencial antagônico dos isolados obtidos contra fitopatógenos causadores de podridões radiculares. Foi realizada análises estatísticas de variância (ANOVA) e teste de Scott-Knott à 5% de probabilidade por meio do software estatístico R 4.0.4 (R CORE DEVELOPMENT TEAM, 2020). Uma significativa quantidade de 117 isolados foi obtida, sendo 1,71% pertencentes ao grupo de *Trichoderma* spp., 53,85% ao grupo das actinobactérias e 44,44% pertencentes ao grupo de *Bacillus* spp. 98,3% dos isolados apresentaram crescimento a 37 °C. Dentre o total, 11 isolados foram testados quanto possível patogenicidade em plantas e potencial antagônico *in vitro*, onde nenhum deles apresentou caracteres patogênicos em folha destacada e 5 deles apresentaram potenciais de inibição significativos para os grupos de doença testados, sendo eles: *Trichoderma* (TRI-FC30 e TRI-FT41), com médias acima de 50% de inibição, Actinobactérias (ACT-FP52, ACT-FE70) com médias de 61,12% e 50% de inibição e *Bacillus* BAC-FC99 com 37,5% de inibição para podridão seca e 11,1% para podridão negra. Os resultados preliminares deste trabalho indicam que *Trichoderma*, *Bacillus* e actinobactérias, tem potencial antagônico/inibitório contra patógenos causadores das podridões radiculares da mandioca. O microbioma da mandioca tem potencial para a obtenção de microrganismos com valor biotecnológico no campo do controle biológico de doenças.

**Palavras chaves:** Potencial inibitório; controle biológico; doenças fúngicas, *Manihot esculenta*.

OLIVEIRA, Rafaela Vasques dos Santos. **Use of fungi and bacteria as biocontrol agents in the management of root rot in cassava: isolation, characterization and validation of the antagonistic potential.** 2022. 46p. Orientador(a): Patrícia Luz Ribeiro / Coorientador: Saulo Alves Santos de Oliveira. Monografia (Graduação em Bacharelado em Biologia) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, BA, dezembro de 2022.

#### ABSTRACT

The cassava crop, in addition to its importance in food security, also has a range of industrial uses that give it enormous potential to stimulate development and increase production yields. However, one of the most limiting biotic stresses for this crop is root rot, a complex of diseases caused by fungi that cause a high economic impact. Thus, given the scarcity of resistant varieties, damage and the low efficiency of chemical control, it is necessary to search for alternative ways to manage these diseases. In this sense, the objective of this work was to isolate and characterize microorganisms as agents of biological control of the rhizosphere and rhizoplane of cassava (*Manihot esculenta*) culture, testing the *in vitro* antagonistic potential of the isolates against phytopathogens that cause rot in the culture itself. The experiments were carried out at the Phytopathology Laboratory of Embrapa Cassava and Fruticulture. Soils and cassava roots were collected in 6 locations in the city of Cruz das Almas Bahia, where the cassava plantation was maintained consecutively for a long time, in order to isolate microorganisms from specific groups, such as *Trichoderma*, endospore-producing bacteria and actinobacteria, with biocontrol potential. For this purpose, selective media and the serial dilution process were used. Followed by morphological characterization and human (37 °C) and plant pathogenicity tests, with detached cassava leaf (BRS Formosa) and finally, *in vitro* pairings of the “double” and “four points” type to validate the antagonistic potential of the isolates obtained against phytopathogens that cause root rot. Statistical analysis of variance (ANOVA) and Scott-Knott test at 5% probability were performed using the statistical software R 4.0.4 (R CORE DEVELOPMENT TEAM, 2020). A significant amount of 117 isolates was obtained, with 1.71% belonging to the *Trichoderma* spp. group, 53.85% to the actinobacteria group and 44.44% belonging to the *Bacillus* spp. group. 98.3% of the isolates grew at 37 °C. Of the total, 11 isolates were tested for possible pathogenicity in plants and antagonistic potential *in vitro*, where none of them showed pathogenic characters in detached leaves and 5 of them showed significant inhibition potentials for the tested disease groups, namely: *Trichoderma* (TRI-FC30 and TRI-FT41), with averages above 50% inhibition, Actinobacteria (ACT-FP52, ACT-FE70) with averages of 61.12% and 50% inhibition and *Bacillus* BAC-FC99 with 37.5% inhibition for dry rot and 11.1% for black rot. The preliminary results of this work indicate that *Trichoderma*, *Bacillus* and actinobacteria have antagonistic/inhibitory potential against pathogens that cause cassava root rot. The cassava microbiome has the potential to obtain microorganisms with biotechnological value in the field of biological disease control.

**Keywords:** Inhibitory potential; biological control; fungal diseases, *Manihot esculenta*.

## LISTA DE ABREVIACÕES

UFRB – Universidade Federal do recôncavo da Bahia

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Agricultura e Pecuária

CNPMF – Centro Nacional de Pesquisa em Mandioca e Fruticultura

LABFITO – Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Mandioca e Fruticultura

BDA – Batata ágar dextrose

BAG – Banco Ativo de Germoplasma

UFC – Unidade formadora de colônia

NL – Nutriente Líquido

ADE – Água destilada esterilizada

PV – Propriedade privada

BOD – “Body Oxygen Demand”

TRI – *Trichoderma* spp.

ACT – Actinobactérias

BAC – *Bacillus* spp.

RZP – Rizoplano

RZF – Rizosfera

OD – Densidade ótica

## LISTA DE FIGURAS

**FIGURA 1** -Localização da cidade de Cruz das Almas e pontos aproximados de coleta de material. 20

**FIGURA 2** - Esquema mostrando o padrão utilizado para nomenclatura genérica dos novos isolados obtidos.24

**FIGURA 3** - Assepsia de material vegetal (A). Secagem das folhas (B). Câmara úmida em gerbox para indução de esporulação (C). 25

**FIGURA 3** - Esquema modelo para pareamento *in vitro*, tipo “quatro pontos” (A) e pareamento duplo (B). 27

**FIGURA 4** - Distribuição total dos isolados obtidos por grupo de microrganismos, em plantações de mandioca em 6 locais da cidade de Cruz das Almas, Bahia.29

**FIGURA 5** - Aspectos morfológicos de *Trichoderma* spp., isolado TRI-FC3030

**FIGURA 6** - Aspectos morfológicos de *Trichoderma* spp., isolado TRI-FT41 31

**FIGURA 7** - Estriamento em placas, de isolados de Actinobactérias obtidos da rizosfera de *Manihot esculenta*, na cidade de Cruz das Almas, Bahia.34

**FIGURA 8** - Estriamento em placas, de isolados de *Bacillus* spp. obtidos do rizoplano e rizosfera de *Manihot esculenta*, na cidade de Cruz das Almas, Bahia. 35

**FIGURA 9** - Resultado do teste de patogenicidade em planta de isolados de *Trichoderma* spp., com folha destacada de *Manihot esculenta* (BRS Formosa), em câmara úmida (gerbox).36

**FIGURA 10** - Potencial antagônico de isolados de *Trichoderma* spp. na inibição *in vitro* de patógenos causadores de podridão radicular seca (FM09, C. CITRUS) e negra (SYM 02, COLO 3) da mandioca. Scott Knott ( $p < 0,05$ ) 37

**FIGURA 11** - Pareamentos *in vitro* de *Trichoderma* spp. 38

**FIGURA 12** - Potencial antagônico de isolados de actinobactérias na inibição *in vitro* de patógenos causadores de podridão radicular seca (C. CITRUS) e negra (COLO 3) da mandioca. Scott-Knott ( $p < 0,05$ ). 38



**FIGURA 13** - Potencial antagônico de isolados de *Bacillus* spp. na inibição *in vitro* de patógenos causadores de podridão radicular seca (C. CITRUS) e negra (COLO 3) da mandioca. Scott Knott ( $p < 0,05$ ). 39

**FIGURA 14** - Pareamento *in vitro* dos melhores tratamentos de actinobactérias e *Bacillus* spp. na inibição de patógenos causadores de podridão radicular seca (C. CITRUS) e negra (COLO 3) da mandioca. 40

### LISTA DE QUADROS

**QUADRO 1** - Microrganismos esperados e seus respectivos meios seletivos. 22

**QUADRO 2** - Microrganismos utilizados em experimento de pareamento *in vitro*. 26

**QUADRO 3** - Lista de gêneros e cores que podem ser encontrados em actinobactérias produtoras de pigmentos carotenoides. 32

**QUADRO 4** - Possíveis gêneros de actinobactérias dos isolados obtidos, em função da coloração das colônias segundo Romero et al. (2012) 33

## SUMÁRIO

|  |            |
|--|------------|
| <b>RESUMO .....</b>  | <b>II</b>  |
| <b>ABSTRACT .....</b>  | <b>III</b> |
| <b>LISTA DE ABREVIACÕES .....</b>  | <b>IV</b>  |
| <b>LISTA DE TABELAS.....</b>   | <b>V</b>   |
| <b>LISTA DE QUADROS .....</b>  | <b>VI</b>  |
| <b>1 INTRODUÇÃO .....</b>  | <b>11</b>  |
| <b>2 REVISÃO BIBLIOGRAFICA.....</b>  | <b>13</b>  |
| 2.1 Cultura da mandioca .....  | 13         |
| 2.2 Podridões radiculares .....  | 15         |
| 2.3 Controle biológico de doenças de plantas .....   | 17         |
| <b>3 METODOLOGIA .....</b>   | <b>20</b>  |
| 3.1 Coleta de material.....  | 20         |
| 3.2 Isolamento de fungos e bactérias biocontroladoras – diluição seriada e meios seletivos ..... | 21         |
| 3.3 Caracterização morfológica.....  | 23         |
| 3.4 Preservação dos isolados e identificação da coleção microbiológica .....                     | 23         |
| 3.5 Teste de patogenicidade humana (37°C).....   | 24         |
| 3.6 Teste de patogenicidade em planta – indução de doença em câmara úmida com folha destacada .. | 24         |
| 3.7 Pareamento in vitro tipo “duplo” e “quatro pontos” – validação do potencial antagonico ..... | 26         |
| 3.8 Análises estatísticas .....  | 28         |
| <b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>  | <b>28</b>  |
| 4.1 Diversidade e caracterização morfológica dos isolados .....                                  | 28         |
| 4.1.1 <i>Trichoderma</i> spp. ....   | 29         |
| 4.1.2 Actinobactérias .....  | 31         |
| 4.1.3 <i>Bacillus</i> spp. ....  | 34         |
| 4.2 Patogenicidade humana.....   | 35         |
| 4.3 Patogenicidade em planta.....  | 36         |
| 4.4 Validação do potencial antagonico de fungos e bactérias rizósfericas .....                   | 37         |
| <b>5 CONCLUSÃO .....</b>   | <b>41</b>  |
| <b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>  | <b>42</b>  |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS .....</b>  | <b>43</b>  |

## 1. INTRODUÇÃO

A planta popularmente conhecida como mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), é uma espécie arbustiva distribuída em mais de 100 países tropicais e subtropicais pelo mundo devido à sua fácil adaptação a condições marginais de clima e solo (FAO, 2013). Pertence à família Euphorbiaceae, que tem como principal característica a presença de substâncias laticíferas, sendo *M. esculenta* a primeira espécie dentro do gênero que foi cultivada para fins comerciais (SECCO, 2005; MATTOS et al., 2006; FIALHO, 2011).

Acredita-se que o centro de origem e domesticação dessa espécie tenha sido no Brasil central (Neotrópico), tendo em vista dados paleontológicos e riqueza de parentes silvestres (MATTOS et al., 2006). A cultura da mandioca desempenha um papel muito importante no cenário socioeconômico mundial, principalmente em países em desenvolvimento, uma vez que suas partes podem ser usadas em diversos segmentos, desde o alimentício (humano e animal) até os com maior tecnologia empregada, caso das indústrias químicas e afins (FAGUNDES, 2009).

Apesar da grande rusticidade da mandioca e adaptabilidade às condições marginais, esta cultura pode ser atacada por diversas pragas e doenças. Dentre as doenças de origens fúngicas que atacam essa cultura, as podridões radiculares ganham destaque, seja pela complexidade sintomatológica ou pela variedade etiológica, uma vez que representam um enorme impacto na produção das raízes tuberosas, parte de maior interesse econômico (TREMACOLDI, 2016). As podridões radiculares podem ser divididas em três grupos de acordo com a sintomatologia apresentada: (i) podridão seca, causada principalmente por fungos do gênero *Fusarium*, (ii) podridão negra, causada por fungos de gêneros como *Lasiodiplodia* e *Neoscytalidium* e (iii) podridão mole, incitada por *Phytophthora* spp. (FUKUDA, 1991; MATTOS et al., 2006; VILAS BOAS, 2015a). Com base no trabalho de Vilas Boas et al. (2015b), no recôncavo da Bahia os patógenos mais frequentes foram os causadores de podridões seca e negra.

O controle destas doenças é extremamente complexo, pois tem como agentes causais, fungos habitantes do solo, capazes de colonizar não só as raízes como também suas hastes, que é a principal estrutura propagativa da mandioca (MATTOS, 2006; BELLÉ, 2018). Além de serem produtores de estruturas de resistência (escleródios e clamidósporos), que aumentam a permanência destes patógenos no solo e reduzem a eficiência do controle químico

(BELLÉ, 2018; CORREIA, 2018; LEITE, 2018). Essas características, em conjunto, favorecem a colonização e perpetuação em novos ambientes.

São utilizadas diferentes técnicas de manejo nas podridões radiculares, sendo o uso de variedades resistentes a forma mais adequada para o controle, pois ainda pode oferecer de forma conjunta o aumento de produtividade. Existem mais de 4 mil variedades de *M. esculenta* conhecidas, porém poucas dessas apresentam um grau de resistência considerável às podridões radiculares e ainda assim não possuem resistência completa, que por sua vez, gera a necessidade de buscar vias alternativas para o controle da doença, que sejam usadas em conjunto com variedades resistentes (MATTOS et al., 2006; FUKUDA et al., 2006).

Uma área da fitopatologia que tem ganhado destaque para controle de doenças causadas por fitopatógenos, é o controle biológico, que consiste no uso de um ou mais organismos antagonistas ou estimuladores de resistência na planta, que acarretem a redução da quantidade e da viabilidade de um organismo patogênico ou da atividade determinante da doença provocada por um patógeno (BLUM, 2006). Diversos trabalhos têm sido desenvolvidos com controle biológico aplicado na podridão radicular por ser uma estratégia eco-eficiente, como exemplo espécies dos gêneros *Bacillus* e *Trichoderma*, que estão entre as bactérias e fungos mais utilizados, respectivamente, desempenhando uma forma promissora de controle de doenças em plantas (BETTIOL, 2009). Além destes, trabalhos recentes trazem resultados positivos no controle biológico, com uso de organismos do grupo das metilobactérias, actinobactérias, serendipita e pseudomonas.

Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi isolar e caracterizar microrganismos como agentes de controle biológico da rizosfera e rizoplano da cultura da mandioca (*Manihot esculenta*), testando o potencial antagonista *in vitro* dos isolados contra fitopatógenos causadores de podridões na própria cultura, e assim, contribuir para o desenvolvimento de medidas eco-eficientes no manejo das podridões radiculares na mandioca.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRAFICA

### 2.1. Cultura da mandioca

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) pertence à ordem Malpighiales, família Euphorbiaceae e gênero *Manihot*, acredita-se que o centro de origem e domesticação dessa espécie tenha sido no Brasil central, tendo em vista dados paleontológicos e riqueza de parentes silvestres (MATTOS et al., 2006). A cultura da mandioca desempenha um papel muito importante no cenário socioeconômico mundial principalmente em países em desenvolvimento, uma vez que todas as suas partes são usadas em diversos segmentos, desde o alimentício (humana e animal) até os com maior tecnologia empregada, caso das indústrias químicas e afins (FAGUNDES, 2009).

Segundo a Organização das Nações unidas para Agricultura e a Alimentação (FAO), a produção mundial de mandioca para 2018 foi de 277,8 milhões de toneladas, tendo como maiores produtores: Nigéria, Tailândia, Congo, Gana, Brasil, e Indonésia, com produtividade total equivalente a 63,2% da produção mundial. Já no Brasil, segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2022) a área plantada no ano de 2021 ficou em torno de 1,23 milhões hectares, com produção de 18,49 milhões de toneladas e produtividade média de 15,3 t/há, com produção média de 18,23 milhões t/ha. em 2022. Os principais estados brasileiros na produção de mandioca por região, são respectivamente: Pará (3,8 t/ha), Paraná (3,3t/ha), São Paulo (1,3 t/ha), Mato Grosso do Sul (0,97 t/ha) e Bahia (0,96 t/ha) (IBGE, 2022).

O processo de domesticação, seleção e conservação da mandioca no passar do tempo (muitas vezes pelos próprios produtores), acarretou em uma diversificação muito grande de variedades dentro da espécie *M. esculenta*, ou seja, uma grande variedade genética, que se explica também pela facilidade de polinização cruzada, a deiscência abrupta dos frutos e sua alta heteroziguidade, sendo conhecidas mais de 4 mil variedades, mantidas em coleções e bancos de germoplasma (MATTOS et al., 2006; FUKUDA et al., 2006).

A mandioca possui uma ampla variação fenotípica, devido à grande diversidade de variedades (variabilidade genética) dentro da espécie junto à influência das condições edafoclimáticas (TOMICICH et al., 2008; HOFFMAN, 2004). A altura da planta pode variar de 2 a 4 metros assim como o ângulo (horizontal ou ereta), ponto e quantidade de ramificações, as suas folhas podem variar em formato dos lóbulos (obovada, elíptica, lanceolada, linear, obovada-lanceolada, pendurada e arqueada) e até mesmo quantidade (de três a ocasionalmente

onze), assim como as suas raízes que podem variar de 4 a 20 e ter formato cilíndrico, cônico, fusiforme ou cilindro-cônico (TOMICCH et al., 2008; EKANAYAKE et al., 1997).

Apesar da grande rusticidade da mandioca e adaptabilidade às condições marginais, esta cultura pode ser atacada por diversas pragas e doenças. As pragas da cultura da mandioca são causadas principalmente por insetos e ácaros como exemplo: (i) o mandarová, lagarta que causa severo desfolhamento sendo uma das pragas mais importantes desta cultura, (ii) ácaros, que atacam as folhas succionando o conteúdo celular (“ácaro verde”, “ácaro rajado”) (iii) percevejo de renda, de hábito sugador, podendo em casos severos ocasionar desfolhamento, (iv) mosca-branca, sugadoras de seiva e vetor de vírus, (v) mosca do broto, as larvas depositadas pela fêmea perfuram o tecido causando exsudação e morte do broto, (vi) brocas das hastes, ocasionada por larvas que são depositadas no interior do caule, (vii) cupins, atacando as manivas armazenadas pela parte seca, podendo destruí-las totalmente e (viii) formigas, que em grandes populações causam desfolhamento severos (GOMES; SOUZA, 2003a).

As doenças que atingem a cultura da mandioca podem ter diferentes agentes causais, seja ele de origem virótica, como o Mosaico Africano da mandioca (ACMV), Mosaico das Nervuras, Mosaico Comum, doença das estrias marrons CBSD ou associações de complexos fitoplasma-vírus como é o exemplo da doença couro-de-sapo (*cassava frogsin disease*, CFSD), ou somente por fitoplasma, ocasionando o superbrotamento, de origem bacteriana, como a bacteriose causada por *Xanthomonas phaseoli* pv. *Manihotis* (*Xpm*), (TREMACOLDI, 2016; MATTOS et al., 2006; GOMES, 2003). A cultura da mandioca pode ser atingida ainda por microrganismos fúngicos, como exemplo a antracnose (*Colletotrichum gloesporioides*), superalongamento (*Sphaceloma manihoticula*), ferrugem (*Uromyces manihotis*) e podridões radiculares (TREMACOLDI, 2016; GOMES, 2003). As podridões radiculares ganham destaque dentre as doenças da mandioca pela diversidade de agentes causais, variedade sintomatológica, complexidade e impactos socioeconômicos.

## 2.2. Podridões radiculares

As podridões radiculares têm destaque dentre as patologias de causas bióticas que acometem a cultura de mandioca, uma doença que causa forte impacto econômico e social, havendo relatos de perdas próximas a 100% das raízes tuberosas, principalmente quando as cultivares são estabelecidas em solos com má drenagem e acúmulo d’água (TREMACOLDI, 2016). As podridões radiculares se caracterizam principalmente pelo apodrecimento das raízes,

mas outros sintomas também podem ser observados como estrangulamento da haste junto ao solo e murcha, além do amarelecimento das folhas das plantas afetadas, apesar de haver particularidades a depender do tipo de podridão (MATTOS et al., 2006). Essa patologia tem como agente causal espécies fúngicas habitantes do solo distribuídas por gêneros como: *Fusarium* spp., *Lasiodiplodia* spp. e *Neoscytalidium* spp. (FUKUDA, 1991; MATTOS et al., 2006; VILAS BOAS, 2015) e pode ser dividida em grupos de acordo com sua sintomatologia: podridão seca, negra e mole.

A podridão radicular seca está mais associada com áreas de solo ácido, arenoso e que passam por estresses hídricos e tem como agente causal espécies do gênero *Fusarium*. As raras lesões necróticas apresentadas em suas raízes são secundárias, o principal ataque é nos tecidos vasculares causando infecções e obstruindo esses tecidos, dificultando a livre circulação da seiva floemática e xilemática, o que causa amarelecimento e murcha da parte aérea e, conseqüentemente, provoca podridão indireta de consistência seca e coloração marrom clara nas raízes (GOMES, 2003; LOPES, 2018).

O gênero *Fusarium* apresenta como aspectos morfológicos micélio cotonoso com coloração que pode variar entre branco, rosa, roxo ou amarelo, a depender da espécie, seus conidióforos podem ser simples ou ramificados, longos e estreitos ou largos e curtos ou agrupados em esporodóquios, já seus conídios podem ser macroconídios fusiformes, com um ou mais septos e presença de célula pé ou microconídios ovóides de zero a três septos (LESLIE & SUMMEREL, 2006). Dentre este gênero se destaca a espécie *Fusarium solani* (Albuquerque) como frequente causadora da podridão radicular seca em mandioca, que inclusive é uma das poucas deste gênero que produz clamidósporos (LOPES, 2018).

A podridão radicular negra também está associada com solos que passam por estresses hídricos, tem como agente causal fungos fitopatogênicos da família Botryosphaeriaceae, como exemplo os gêneros *Lasiodiplodia* e *Neoscytalidium* (PHILIPS et al., 2013). Estes fungos são conhecidos por serem endofíticos ou oportunistas, permanecendo latentes dentro do hospedeiro até que o mesmo passe por algum estresse, levando ao surgimento de lesões necróticas secas e amarronzadas nas raízes e caule das plantas e com o passar do tempo, tornam-se negras. Esta coloração está relacionada com a produção de estruturas reprodutivas do fitopatógeno na casca, em estágio mais avançado pode haver amarelecimento e queda das folhas, e possivelmente, ocasionando morte da planta (LOPES, 2018).

O primeiro relato na literatura que designa as espécies *Lasiodiplodia euphorbicola* (MACHADO et al., 2014), *L. pseudotheobomae* (CARDOSO et al., 2008) e *Neoscytalidium hyalinum*, pertencentes à família Botryosphaeriaceae, como agentes causais de podridão radicular em mandioca no Brasil foi descrita por Machado et al. (2014), utilizando recursos moleculares além dos morfológicos, que possibilitaram chegar a resultados mais certos na identificação. Erros na identificação podem acontecer quando se utiliza apenas de aspectos morfológicos, já que diferentes espécies podem apresentar caracteres fenotípicos extremamente parecidos, havendo pequenas particularidades em condições muito específicas, como exemplo, espécies de *Scytalidium* que foram transferidas para o gênero *Neoscytalidium*, pois diferem na produção de conídios e pertencem a diferentes ordens de Ascomycota (MACHADO et al., 2014; VILAS BOAS et al, 2017).

Aigbe (2009) alerta ainda para a importância de estudos direcionados a patógenos menores da podridão radicular da mandioca na Nigéria, para além dos principais e mais conhecidos e conseqüentemente mais estudados (*Lasiodiplodia theobromae* e *Fusarium solani*), considerando a importância da cultura da mandioca no país e a possibilidade de patógenos que hoje estão em menores incidência, em um futuro próximo acabarem se tornando importantes.

Segundo Lopes (2018) as medidas de controle contra a podridão radicular envolvem práticas culturais, biológicas e químicas, além do uso integrado de cultivares tolerantes/resistentes, que englobam, por exemplo: uso de manivas recém coletadas e sadias, plantio em camalhões, rotação de cultura com arroz, milho ou sorgo, em solos argilosos iniciar o plantio após o início da estação chuvosa, evitar plantio em locais onde a doença já foi detectada, tratamento químico com epoxiconazol e piraclostrobina (*Lasiodiplodia* spp.), controle biológico (microrganismos antagonistas) e supressividade do solo.

O uso de variedades que apresentem resistência genética contra fitopatógenos consiste na melhor alternativa para solução de tais problemas fitossanitários, em alguns casos sendo a única alternativa viável, pois contribui com incrementos significativos de produtividade, sem custos adicionais, fator que facilita sua adoção principalmente pelos produtores de baixa renda (MATTOS et al., 2006). As cultivares BRS-Poti, Maranhense e BRS Kiriris tem apresentado boa tolerância/resistência à podridão mole e seca, levando em consideração as condições ambientais e manejo nas culturas, outras variedades também são citadas como resistentes, como exemplo a Osso Duro Clone 148/02, Mãe Joana, Embrapa8,



Bibiana, Cedinha, Zolhudinha, BRS Aramaris e Maranhense, para regiões Norte e Nordeste (MATTOS et al., 2006; TREMACOLDI, 2016).

Apesar do conhecimento sobre a melhor alternativa para combate à doença e a busca por formas de manejo mais sustentáveis para se chegar a métodos ambientalmente adequados, viáveis e eficientes de controle, existem poucas variedades que oferecem um grau considerável de resistência, e mesmo estas, não possuem resistência completa (imunidade), sendo necessário o uso integrado dessas variedades resistentes com vias alternativas sustentáveis para controle, como o controle biológico.

### **2.3. Controle biológico de doenças de plantas**

O manejo de pragas e doenças de plantas, por meio do controle biológico, se baseia na ocorrência de interações antagônicas entre praga/patógeno e o agente de biocontrole, ou mesmo de forma indireta por meio da indução de resistência ou promoção de crescimento em plantas. Os mecanismos básicos de ação antagônica são: antibiose (compostos antimicrobianos como amônia e enzimas hidrolíticas), parasitismo, competição, indução de resistência, hipovirulência, predação e promoção de crescimento (solubilização de minerais, fixação de nitrogênio, produção de sideróforos) (LOPES, 2018; MOTA, 2017).

O biocontrole enfrenta alguns dilemas, a extração *in vivo* desses agentes não é uma tarefa fácil, tirando-o do meio natural e cessando as interrelações existentes com a planta, de maneira que nem todos os microrganismos, sejam eles do solo rizósferico, rizoplano ou filoplano, são cultiváveis em laboratório. Além disso, busca-se ainda atender alguns critérios: (i)ter baixo custo de produção, (ii)selecionar organismos que possam ser produzidos em larga escala, (iii) e que tenham viabilidade e eficiência por um longo período de tempo (MOTA, 2017).

As bactérias rizomáticas coexistem com as raízes das plantas, podendo impactar de forma direta ou indireta, atuam de forma positiva nas plantas, como promotoras de crescimento ou no biocontrole de patógenos, tendo uma utilização maior do que bactérias do filoplano, visto que suas condições são mais favoráveis em aspectos nutritivos, umidade e temperatura (SOUZA, 2015 b; MOTA, 2017).

O processo de seleção de microrganismos potenciais para controle biológico acontece de forma sistematizada, existindo particularidades na forma como cada autor a descreve na literatura. Mota e colaboradores (2017) realizaram um trabalho acerca da determinação e validação de critérios pra seleção de bactérias que atuem no controle biológico, onde foram analisados parâmetros de produção de tipos de compostos com base na origem de isolamento, intensidade da produção de compostos pelo tempo de reação, produção de cada composto em relação ao nicho de isolamento, para então determinar a capacidade dos isolados na produção de compostos relacionados ao biocontrole e/ou promoção do crescimento, o que permitiu determinar aqueles que teriam melhor eficiência (o isolado que produz mais compostos).

Entre os microrganismos com alto potencial para o desenvolvimento de agentes de biocontrole - usando sistemas de produção *in vitro* – estão bactérias e fungos. No combate de doenças de plantas, *Bacillus subtilis* e *Trichoderma* spp. estão entre as bactérias e fungos mais utilizados respectivamente (BETTIOL E MORANDI, 2009).

*Trichoderma* tem se destacado no aspecto de bioprotetor, por atuar como antagonista de alguns fitopatógenos de importância econômica e também por promover o crescimento e florescimento de plantas por meio da solubilização de micronutrientes insolúveis no solo e proporcionando maior absorção e translocação de minerais pouco disponíveis (BLUM, 2006; JUNGUES et al., 2016)

Há relatos da eficácia de *Trichoderma* no controle de *Macrophomina phaseolina* (podridão do carvão em soja), *Fusarium* spp. (podridões radiculares) *Rhizoctonia*, *Armillaria* spp., entre outros (KHALILI, 2016; GRIOLETTI JÚNIOR et al., 2000). Devido aos vários mecanismos empregados por suas espécies, este gênero possui uma gama de espécies que tem destaque no controle biológico de patógenos radiculares, que o torna um dos principais fungos antagonistas a esses organismos patogênicos (SADFI et al., 2009).

Stefanello (2016) avaliou o potencial de 23 isolados de *Trichoderma* em controlar podridão radicular na mandioca causada por *Fusarium* e *Phytophthora*, e sua atuação na promoção do crescimento da planta, por testes *in vitro* de pareamento de culturas, produção de compostos antimicrobianos e avaliação em campo com plantio de manivas pulverizadas com suspensão de esporos de seis isolados, com resultados de até 100 % de inibição por compostos não voláteis produzidos por *Trichoderma* e aumento da produtividades com uso de *T. harzianum*.

A avaliação de microrganismos para controle biológico, assim como sua eventual produção, comumente passa por processos laboratoriais *in vitro*, para posterior aplicação *in situ*. Diversas técnicas podem ser empregadas para mensurar essa eficácia antagonista: (i) método de cultura dupla, (ii) sobrecamada, (iii) teste de produção de metabólitos voláteis, (iv) teste de hiperparasitismo, dentre outras (KHALILI, 2016; SOUZA, 2015)

Em um trabalho realizado por Nascimento e colaboradores (2016) foi feito o isolamento, identificação molecular e avaliação de *Bacillus* spp. no controle de *Magnaporthe oryzae* (fungo de arroz), comparando quatro métodos de avaliação de potencial antagonista, dentre eles: “central listra”, “o ponto”, “círculo” e “três listras”. Segundo os autores, dos doze isolados bacterianos obtidos e identificados, tiveram destaque o *Bacillus methylophilus* B41, B31 e B22, no controle de *M. oryzae*, com até 67,55% de inibição, e o método que obteve melhores resultados foi o “círculo”, que proporcionou maior inibição do crescimento de micélio.

Hridya et al. (2012) trouxe em seu trabalho, dados referentes aos efeitos de agentes de biocontrole (*Trichoderma* spp. e *Pseudomonas fluorescens*) e biofertilizantes (*Azospirillum*, fungos micorrízicos vesiculares-arbusculares (VAM) e bactérias solubilizantes de fósforo (PSB)) na podridão radicular (*Phytophthora palmivora* / podridão mole), avaliando produção, índice de colheita e absorção de nutrientes na mandioca, com experimentos em campo na Índia, comparando com resultados de aplicação/associação de fertilizantes químicos (NPK). Esse trabalho apresentou resultados evidenciando a redução da incidência de podridão radicular em 98,85 a 100% com uso combinado de agentes de biocontrole e biofertilizantes, aumento no rendimento da raiz em 33,79% com aplicação de *Trichoderma* e *Azospirillum*, índices de colheitas mais altos com aplicação de *Trichoderma* e VAM e captação maior de nitrogênio pela planta com inoculação de *Azospirillum*.

Este trabalho, assim como tantos outros que vem sendo realizados e ganhando espaço nos trabalhos de pesquisa científica, só confirma o potencial do controle biológico no manejo das podridões radiculares na mandioca, seja pelo controle de fitopatógeno, indução de resistência ou promoção de crescimento na planta e a importância de que se tenham mais estudos voltados para essa área, sendo considerada por muitos como o manejo do futuro, pela sua efervescência de produtos, benefícios e tecnologias sustentáveis.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Coleta de material

Todas as coletas e execução experimental foram realizadas na Embrapa Mandioca e Fruticultura (CNPMPF) e no Laboratório de Fitopatologia (LABFITO-CNPMPF), Cruz das Almas, Bahia. Foram coletadas amostras de solo da rizosfera e rizoplano em 6 locais, na cidade de Cruz das Almas onde a plantação se manteve ativa por um longo período: Candeal (região onde está instalado o Banco Ativo de Germoplasma de Mandioca - BAG Mandioca), Area 2 e PP1 (áreas experimentais da EMBRAPA e UFRB respectivamente) e três propriedades privadas, Fabrica de Beijú Dois Irmãos, Sitio de Dete e região “Três Bocas”. Para coleta de solo rizósferico, em cada ponto de coleta, foi feita uma cova de 20 cm de profundidade há uma distância de 20 cm da haste principal da planta escolhida, onde foi retirado 100 gramas de solo em 10 subamostras para conferir representatividade amostral de cada localidade. À obtenção de material do rizoplano, também se seguiram coletas de 10 subamostras em cada localidade, onde foram coletados fragmentos radiculares (raízes adventícias e pelos absorventes) das plantas e ambas as amostras foram encaminhadas para o LABFITO.



**Figura 1:** Localização da cidade de Cruz das Almas e pontos aproximados de coleta de material. Local 1: Fabrica de Beijú Dois Irmãos; Local 2: Área 2; Local 3: Candeal; Local 4: PP1; Local 5: Três Bocas; Local 6: Sitio de Dete. Fonte: Adaptado de Wikipédia, 2020 e Google Maps.

#### 3.2. Isolamento de fungos e bactérias biocontroladoras – Diluição seriada e meios seletivos

Este trabalho teve por objetivo isolar microrganismos pré-estabelecidos, onde foram utilizados meios de cultura específicos para cada grupo, ambas as informações estão descritas no Quadro 1.

**Quadro 1:** Microrganismos esperados e seus respectivos meios seletivos para obtenção.

| MICROORGANISMOS ESPERADOS | MEIOS SELETIVOS              | COMPOSIÇÃO  |
|---------------------------|------------------------------|---|
| <i>Trichoderma</i>        | MARTIN<br>(com modificações) | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1 g/L<br>MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 0,5 g/L<br>Peptona 5 g/L<br>Rosa de Bengala 0,033 g/L<br>Dextrose 10 g/L<br>Agar 15 g/L<br><br>Suplementado com:<br>Estreptomicina 100 mg/L   |
| <i>Bacillus</i>           | Nutriente ágar               | Extrato de carne 1,5 g/L<br>Extrato de levedura 1,5 g/L<br>Peptona 5 g/L<br>NaCl 5 g/L<br>Ágar bacteriológico 15 g/L<br>Água destilada 1 L<br><br>Suplementado com:<br>Tebuconazole 100 mg/L  |
| <i>Actinobactérias</i>    | Amido Caseína Agar           | K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2 g/L<br>MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 0,05 g/L<br>KNO <sub>3</sub> 2 g/L<br>NaCl 2 g/L<br>FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 0,01 g/L<br>CaCO <sub>3</sub> 0,02 g/L<br>Caseína 2 g/L<br>Amido 10 g/L<br>Agar 18 g/L<br><br>Suplementado com:<br>Tebuconazole 100 mg /L<br>Ciclohexamida 100 mg/L<br>Estreptomicina 100 mg/L |

Ambas as amostras (rizosfera e rizoplano) passaram pelo processo de diluição seriada variando de 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-7</sup>. Para o material de solo rizósferico, 10 gramas de solo foram adicionadas em um béquer com 90 ml de água destilada estéril e posta em agitador durante 15 minutos, para primeira dissolução e destorroamento do solo; nas posteriores diluições foram utilizados tubos de ensaio contendo 9 ml de água destilada estéril, onde obrigatoriamente 1 ml da diluição atual foi passada para a seguinte (seguido de agitação em agitador portátil), conseguindo-se partir de uma solução densa para soluções cada vez mais diluídas, obtendo

assim as diluições seriadas conforme Dhingra e Sinclair (1985). O mesmo processo se aplicou para o material radicular do rizoplano, entretanto, a primeira dissolução foi realizada com cloreto de magnésio (solução salina), para facilitar o desprendimento dos microrganismos fortemente aderidos a raiz de interesse.

Em seguida, foi feito o plaqueamento, onde 1 microlitro de cada diluição foi adicionada com auxílio de pipeta, em placas de Petri contendo meios de culturas seletivos e homogeneizados com auxílio de alça de Drigalsky, posteriormente vedadas e armazenadas em BOD à 25 °C para fungos e 29°C para bactérias, com fotoperíodo de 12 horas, onde foram acompanhadas até a visualização de crescimento fúngico e bacteriano. Em específico, para a obtenção de bactérias formadoras de endósporos, grupo ao qual o gênero *Bacillus* pertence, anteriormente ao plaqueamento no meio correspondente (nutriente ágar), as diluições foram submetidas ao banho maria, a 80°C, durante 10 minutos, para provocar um estresse e induzir a produção de estruturas de resistência pelos microrganismos que possuem essa característica e concomitante eliminação dos demais microrganismos.

Os meios seletivos utilizados foram correspondentes aos 3 grupos de microrganismos que almejou-se encontrar neste trabalho e que estão descritos no Quadro 1. O esquema fatorial se constituiu de 12 fontes amostrais (6 locais x 2 tipos de amostra) x 3 tipos de meios seletivos x 4 diluições, com 3 repetições, dando o total de 432 placas.

Após o crescimento dos microrganismos nas placas com meio seletivo por um período mínimo de incubação, foi observado o crescimento das colônias de diferentes características visuais, usando o morfotipo como diferenciação, pelas diluições estabelecidas e a partir destas, foi feito de fato, o isolamento para outras placas contendo meio de cultura de enriquecimento, para a obtenção de placas contendo apenas um tipo de cultura com colônias puras. Para as bactérias esse processo foi realizado com auxílio de alça bacteriológica, onde foi extraída uma pequena quantidade de cada inoculo/colônia, seguido de estriamento por esgotamento nas placas de Petri contendo meio de enriquecimento nutriente ágar, visando a multiplicação de cada organismo. Já para os fungos, uma pequena parte do crescimento micelial foi retirada com auxílio de bisturi e também isoladas em placas contendo meio de enriquecimento Batata Dextrose Agar (BDA) e mantidas em BOD, para testes seguintes. Ao fim desta etapa, esses microrganismos passaram por caracterização e testes posteriores.

### **3.3. Caracterização morfológica**

As características morfológicas das colônias foram listadas dentro do conjunto de caracteres culturais para o grupo de fungos e bactérias. Para as bactérias foram descritos aspectos acerca do tipo de: elevação, borda, cor, aspecto, forma, textura, diâmetro e tempo de crescimento, além de aspectos microscópicos. A caracterização morfológica para os fungos, foi realizada com base na cor, tipo da colônia, tipo e tamanho de esporos. Foram utilizadas chaves taxonômicas e literaturas especializadas para descrição e identificação das estruturas fúngicas e bacterianas, utilizando microscópio ótico. Foi realizada a identificação genérica dos isolados e aqueles que não apresentaram características condizentes com os grupos de interesse, foram descartados.

### **3.4. Preservação dos isolados e identificação da coleção microbiológica**

As bactérias foram conservadas mantidas em água destilada esterilizada (MARIANO & SOUZA, 2016) e em meio nutriente líquido (5 g de peptona; 5 g de cloreto de sódio; 1,5 g de Extrato de carne; 1,5 g extrato de levedura; água destilada [q.s.p] 1L) com glicerol 30%. Já os fungos foram conservados por meio do método Castellani. Para o método de conservação em água destilada esterilizada (ADE), os isolados foram repicados em tubos criogênicos de 2 mL contendo ADE e incubados por 24h, a 25 °C em BOD. Após este período, os tubos foram armazenados a -20 °C. Já para o método de conservação em meio líquido com glicerol a 30 %, os isolados foram repicados em tubos de 2 mL contendo meio caldo nutriente e incubados por 24 h, a 25 °C em BOD. Após a incubação, os tubos foram centrifugados a 7.000 rpm por 5 minutos para precipitar as bactérias. O sobrenadante foi descartado e substituído por 1 mL de solução salina de MgCl a 10 mM para resuspender e lavar o precipitado. Feito isso, realizou-se uma nova centrifugação a 5.000 rpm por 5 minutos com posterior descarte do sobrenadante e adição de 1 mL de caldo Nutriente com 30 % de glicerol. Os tubos foram então armazenados a -80 °C em ultrafreezer.

A nomenclatura genérica dos isolados seguiu um padrão lógico acerca das informações referentes ao grupo pertencente, tipo de amostra e local de coleta, configurando ao final um epíteto único para cada isolado, como está sendo mostrado na Figura 2. As amostras foram devidamente identificadas e armazenadas em caixas, também identificadas, para compor a coleção microbiológica do LABFITO. A identificação padrão (código) utilizada na CNPMF será inserido posteriormente.



**Figura 2:** Esquema mostrando o padrão utilizado para nomenclatura genérica dos novos isolados obtidos. Fonte: Rafaela Oliveira, 2022.

### 3.5. Teste de patogenicidade humana (37°C)

Uma vez que se obteve o conjunto de isolados ~~ereseidos~~ e a coleção microbiológica formada, estes foram submetidos à teste de patogenicidade humana, que consistiu em incubá-los em BOD com a mesma temperatura corpórea média humana (37 °C), com fotoperíodo de 12 horas, durante 24 horas.

### 3.6. Teste de patogenicidade em planta – Indução de doença em câmara úmida com folha destacada

Este teste foi realizado de forma simultânea com os testes de pareamento *in vitro*. Pela questão do tempo, foi escolhida uma porção representativa da quantidade de isolados totais, tendo como critério a diversidade morfológica, para seguir com os testes posteriores, que foram elencados no Quadro 2. Utilizou-se folhas destacadas de mudas de mandioca (variedade BRS Formosa), com o mesmo estágio de maturação e com boa sanidade (sem sintomas ou sinais de patógenos), provenientes do viveiro de câmara térmica da CNPMF, que pelas elevadas temperaturas e condições internas controladas, contêm ao máximo a incidência e desenvolvimento de doenças nas mudas, garantindo a boa sanidade das folhas coletadas (2 cm de pecíolo).

Inicialmente foi feita a assepsia das folhas seguindo protocolo de ALFENAS & MÁFIA (2007), onde as folhas foram imersas em álcool a 70%, por 30 segundos, afim de



quebrar a tensão superficial e tornar a superfície da folha facilmente molhável, passando diretamente para solução de hipoclorito de sódio a 1%, durante 1,5 minutos, seguindo-se a transferência para duas porções consecutivas de em água destilada esterilizada (Figura 2).

Para averiguar a possível patogenicidade dos isolados, o experimento se dividiu em: T0= Testemunha absoluta (folhas inoculadas apenas com discos de BDA/NL); T1= Testemunha positiva (folhas inoculadas com fungo/bactéria verdadeiramente patogênica) e T2= Folhas inoculadas com isolados, possíveis biocontroladores de *Trichoderma*, *Bacillus* e Actinobactérias, com duas repetições por tratamento.



**Figura 3:** Assepsia de material vegetal (A). Secagem das folhas (B). Câmara úmida em gerbox para indução de esporulação (C). Fonte: Rafaela Oliveira, 2022.

A montagem da câmara úmida foi feita em câmara de fluxo, realizada em caixas Gerbox devidamente esterilizadas, assim como todos seus outros componentes. As folhas destacadas com aproximadamente 2 cm de pecíolo, foram colocadas dentro da Gerbox forradas com uma porção de papel cartolina. Foi feita uma perfuração em cada uma das três nervuras principais de cada folha, com auxílio de um palito de madeira e em seguida, sobrepostos com os discos de micélio/BDA. Para teste das bactérias, o palito de madeira foi embebido em suspensão bacteriana dos isolados a serem testados, anteriormente a perfuração (ALFENAS & MÁFIA, 2007).

Para manter a umidade, foram dispostos pequenos chumaços de algodão embebidos com ADE dentro das caixas, que foram vedadas e acondicionadas em temperatura ambiente até o período de avaliação (7 dias). A avaliação deste experimento se condicionou a aspectos apenas qualitativos, à presença ou ausência de doença, tendo nota I = Presença de

doença/microrganismo patogênico e nota 0 = Ausência de doença/microrganismo não patogênico, observando caracteres como, necrose, murcha e queima.

### 3.7. Pareamento *in vitro* tipo “duplo” e “quatro pontos” – Validação do potencial antagônico

Para avaliação do potencial biocontrolador dos isolados encontrados contra a podridão radicular foi realizado pareamento *in vitro* por confronto direto do tipo “duplo” (para fungos) e “quatro pontos” (para bactérias) (MARIANO & SILVEIRA, 2005) com 4 isolados fitopatogênicos de espécies que compreendem o gênero *Fusarium* (*F. oxysporum*, *F. equiseti*), causadora da podridão seca, família Botryosphaeriaceae (*Lasiodiplodia theobromae* e *Neoscytalidium dimidiatum*) causadora de podridão negra na mandioca (Quadro 2).

**Quadro 2:** Microrganismos utilizados em experimento de pareamento *in vitro*. Fonte: Rafaela Oliveira, 2022.

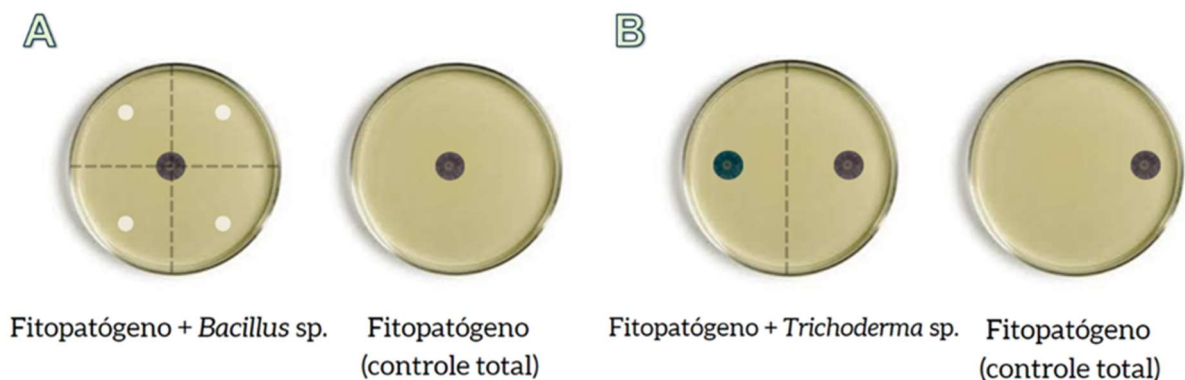
|                              |   | Espécies                         | Isolados                     |
|------------------------------|---|----------------------------------|------------------------------|
| <b>FITOPATÓGENOS</b>         | <b>Podridão Negra</b>                       | <i>Lasiodiplodia theobromae</i>  | COLO 3 (CBPPR1002)*          |
|                              |   | <i>Neoscytalidium dimidiatum</i> | SYM 02 (CBPPR1001)*          |
|                              | <b>Podridão Seca</b>                        | <i>Fusarium equiseti</i>         | C. CITRUS (CBPPR0031)*       |
|                              |   | <i>Fusarium oxysporum</i>        | FM 09 (CBPPR0003)*           |
| <b>AGENTES DE BIOCONTROL</b> | <b><i>Trichoderma spp.</i></b><br>(Fungo)   | <i>Trichoderma sp.</i>           | FC30, FT41                   |
|                              | <b><i>Bacillus spp.</i></b><br>(Bactéria)   | <i>Bacillus sp.</i>              | FC99, PB36, PB122, PB140     |
|                              | <b><i>Actinobactérias</i></b><br>(Bactéria) | –                                | FE70, FP52, FM61, FA18, FA20 |

\* Código de acesso dos isolados depositados na base de dados do GenBank.

O experimento iniciou-se com a reativação dos fitopatogênicos e, para o pareamento com cada tipo de agente de biocontrole, seguiram-se metodologias distintas. Para *Bacillus* houve o preparo da suspensão bacteriana com a multiplicação de seus isolados em meio nutriente líquido em agitação constante por 24 horas, calibração em espectrofotômetro para densidade óptica de 0,8 e, então, a montagem do pareamento do tipo “quatro pontos”. Devido

há um erro experimental, apenas o isolado BAC-FC99, foi inoculado com densidade óptica inferior aos demais, com OD de 0,2. Já para *Trichoderma* houve a multiplicação dos seus isolados em meio BDA e quando crescidos, foi realizado o pareamento duplo. Ambos os pareamentos foram incubados em B.O.D. a  $\pm 25$  °C com fotoperíodo de 12 horas e quando as placas do controle atingiram seu crescimento total o experimento foi avaliado e os dados gerados passaram por análises estatísticas.

O arranjo experimental foi o delineamento inteiramente casualizado (4 fitopatógenos x 11 antagonistas x 10 repetições). Na Figura 3A está sendo mostrado o modelo para o pareamento do tipo quatro pontos, que foi utilizado para *Bacillus* e actinobactérias, onde um disco de 5 mm de diâmetro do fitopatígeno é disposto no centro da placa contendo meio BDA e é inoculado 3  $\mu$ L de suspensão bacteriana em quatro discos de papel filtro posicionados de maneira equidistante. A Figura 3B mostra o modelo para o pareamento duplo, utilizado para *Trichoderma*, onde tanto o fitopatígeno quanto o agente de biocontrole são posicionados em bordas opostas da placa de Petri, também com discos de micélios fúngicos de 5 mm de diâmetro. Como controle absoluto/total foram consideradas placas contendo apenas discos fúngicos dos fitopatógenos, representadas pelas placas da direita de cada imagem.



**Figura 3:** Esquema modelo para pareamento in vitro, tipo “quatro pontos” (A) e pareamento duplo (B).

A avaliação ocorre quando o controle absoluto atinge seu crescimento completo, sendo feita a medida do crescimento micelial dos fitopatógenos de todas as repetições com auxílio de régua milimetrada, e então, a redução da área de crescimento micelial é convertida em potencial inibitório dos agentes de biocontrole, através de fórmulas pré-estabelecidas:  $PI\% = (D1 - D2) / D1 \times 100$  (para bactérias) e  $PI\% = ((C - T) / C) \times 100$  (para fungos), onde “D1” e “D2”,

representam a medida do diâmetro (um e dois) e “C” e “T”, representam o crescimento radial do micélio na ausência do antagonista e o crescimento radial do micélio na presença do antagonista, respectivamente

### 3.8. Análises estatísticas

A matriz de dados geradas pelo teste de potencial antagônico (tópico 3.7.), foi submetida a análises estatísticas de variância (ANOVA) e as médias, quando significativas, foram agrupadas através do teste de Scott-Knott à 5% de probabilidade, utilizando o pacote “Laercio” por meio do software estatístico R 4.0.4 (R CORE DEVELOPMENT TEAM, 2020).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

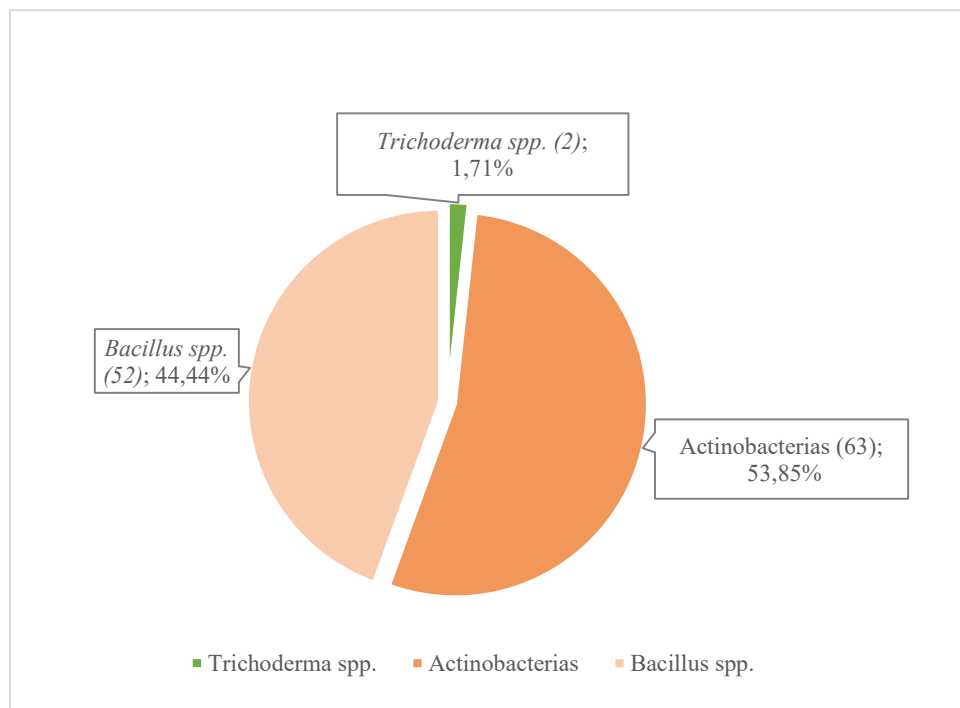
### 4.1. Diversidade e caracterização morfológica dos isolados

Após a realização do isolamento e pré-seleção com base em caracteres morfológicos, obteve-se o total de 117 isolados, distribuídos entre os grupos de microrganismos, sendo 2 pertencentes ao grupo de *Trichoderma* spp., 63 ao grupo das actinobactérias e 52 pertencentes ao grupo de *Bacillus* spp. (Figura 4).

A distribuição dos isolados, não ocorreu de forma homogênea entre o tipo de amostra (rizoplano e rizosfera) e local de coleta. Do número total de isolados houve uma distribuição de 51 (44%) provenientes das amostras de rizoplano e 66 (56%) da rizosfera. Dentre os 6 locais de coleta ocorreu a seguinte diversidade: L1/Fábrica de Beijú Dois Irmãos (TRI:0: ACT:9; BAC:18), conferindo 23% do número total de isolados, L2/Área 2 (TRI:0: ACT:12; BAC:33), conferindo 38,5% do número total de isolados, L3/Candeal (TRI:1: ACT:7; BAC:1), conferindo 7,7% do número total de isolados, L4/PPI (TRI:0: ACT:17; BAC:0), conferindo 14,5% do número total de isolados, L5/Três Bocas (TRI:1; ACT:8; BAC:0), conferindo 7,7% do número total de isolados, L6/Sítio de Dete (TRI:0: ACT:10; BAC:0), conferindo 8,5% do número total de isolados.

Sendo o local 2 (Área 2) o que apresentou maior quantidade de isolados, com alta variedade dentro do mesmo grupo, porém ainda assim, não foi unicamente mais diverso pois,

segundo Wilson (1988), diversidade se caracteriza como a variabilidade entre os seres vivos de todas as origens, incluindo a variedade genética dentro das populações e espécies, podendo variar ainda, de acordo com as diferentes regiões ecológicas. Sendo assim, o local 3 (Candeal) também diverso em relação aos tipos de grupos de microrganismos rizosféricos obtidos, estudados neste trabalho. Fato este, que pode ser atribuído à própria diversidade do local e presença ou ausência dos microrganismos em diferentes micro-habitats.



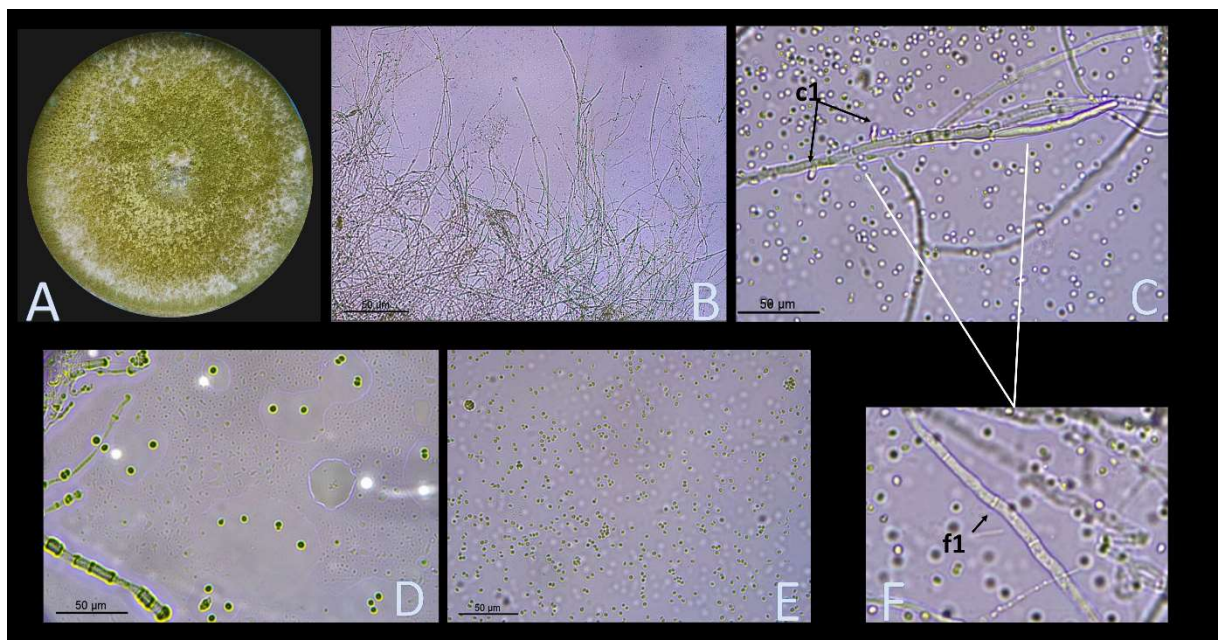
**Figura 4:** Distribuição total dos isolados por grupo de microrganismos em plantações de mandioca em 6 locais da cidade de Cruz das Almas, Bahia.

#### 4.1.1. *Trichoderma* spp.

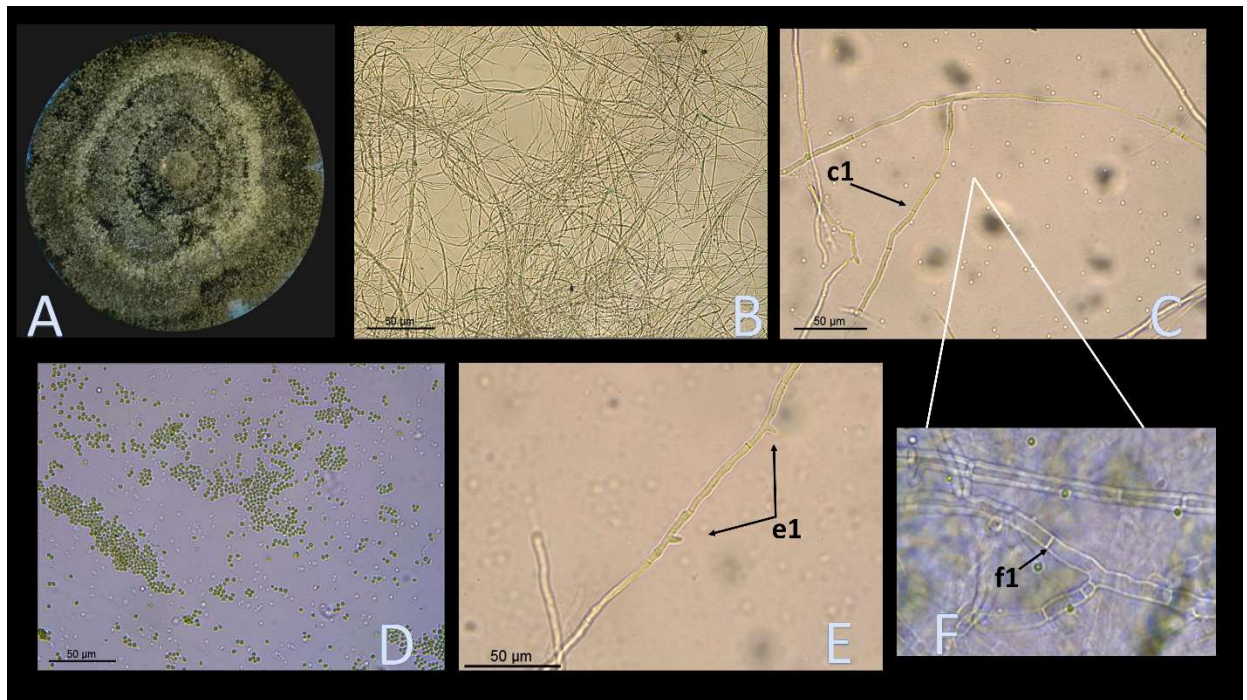
Obteve-se o total de dois isolados de *Trichoderma* ao final dos isolamentos (Figura 4), sendo os dois provenientes da rizosfera, sendo eles: TRI-FC30 e TRI-FT41. As características macroscópicas se diferenciaram em aspectos de tonalidade, arranjo do micélio e densidade esporulativa, já as características microscópicas acerca do crescimento micelial e formato de conídios (esporos) foram bem similares, ambos, de acordo com o que é descrito na literatura para o gênero *Trichoderma* spp.

As colônias do *Trichoderma* sp. são de rápido crescimento micelial esbranquiçado, com conídios formados a partir de células conidiógenas, contidas ou não em estruturas especializadas (os conidióforos), ou por fragmentação do talo micelial (KRUGER e BACCHI, 1995). Os conidióforos são frequentemente agregados, muito ramificados e formam tufos, podendo ser irregularmente verticilados ou dobrados, com alongamentos de hifas estéreis, sendo fiáldes (em forma de balão) ou obovoíde, em cachos terminais pequenos (WILLIAMS et al, 1983). Os conídios são majoritariamente verdes, às vezes hialina, com paredes lisas ou ásperas, com possíveis alongamentos de hifas estéreis, conídios estes, que dão a cor esverdeada característica do gênero (Figura 5a e 6a) (MYCOLOGY ONLINE, 2010).

Os isolados obtidos, TRI-FC30 e TRI-FT41, apresentaram características morfológicas de acordo com o que é descrito na literatura, não foram observadas estruturas especializadas (conidióforos) nas lâminas confeccionadas, em ambos isolados. Seus esporos tem tamanho em torno de 3  $\mu\text{m}$  e apresentaram uma densidade muito maior para o isolado TRI-FT41, caracterizando-o como um microrganismo de boa multiplicação e desenvolvimento. As lâminas microscópicas que evidenciam essas características, são apresentadas na Figura 5 e 6.



**Figura 5:** Aspectos morfológicos de *Trichoderma* spp., isolado TRI-FC30. Crescimento micelial em placa (A). Aglomerado de hifas (B). Micélio septado (C) com frutificações (c1). Conídios esféricos (D e E) (3 $\mu\text{m}$ ). Micélio (F). Septo (f1). Fonte: Rafaela Oliveira, 2022.



**Figura 6:** Aspectos morfológicos de *Trichoderma* spp., isolado TRI-FT41. Crescimento micelial em placa (A). Aglomerado de hifas (B). Micélio septado (C). Conídios esféricos (D) (3µm). Micélio (E) com frutificações (e1). Micélio (F). Septo (f1). Fonte: Rafaela Oliveira, 2022. com frutificações (c1)

#### 4.1.2. Actinobactérias

Obteve-se o total de 63 isolados de actinobactérias ao final dos isolamentos (Figura 4), sendo todos proveniente da rizosfera, não tendo sido obtidos isolados de actinobactérias do rizoplano. As características macroscópicas se diferenciaram em aspectos de cor, forma, textura, borda e elevação.

Nas avaliações fenotípicas, em relação à estrutura morfológica das colônias, observou-se que: a coloração dos isolados se distribuiu entre as cores amarela sólida, com 11 isolados (17,19%), amarelo translúcido com 5 (7,81%), branco sólido 22 (34,38%), branco translúcido 8 (12,5%), verde sólido 5 (7,8%), bege/rosa sólido 12 (18,75%) e vermelho sólido com 1 isolado (1,5%). Em relação a textura, 49 (77,78%) apresentaram-se brilhantes e 14 (22,22%) foscas. Para forma, 61 (96,83%) apresentaram-se circulares e apenas 2 (3,17%)

rizoides. Quanto à borda, 54 (85,71%) apresentaram-se lisas e 9 (14,29%) onduladas. E, por fim, em relação a sua elevação, 39 (63,93%) apresentaram-se convexas e 22 (36%) planas.

Os aspectos morfológicos, estão de acordo com o que é descrito na literatura para o grupo de actinobactérias (Quadro 3 e Figura 7), principalmente às actinobactérias produtoras de pigmentos carotenoides, que de forma deslumbrante apresentam uma grande variedade em sua coloração, com cores atípicas e intensas, variando entre os tons de amarelo intenso, verde e vermelho (ROMERO et al., 2012). O Quadro 3 apresenta uma relação entre gêneros e cores de colônias de actinobactérias.

**Quadro 3:** Lista de gêneros e cores que podem ser encontrados em actinobactérias produtoras de pigmentos carotenoides. Fonte: ROMERO et al. (2012)

| <b>Cor básica</b>          | <b>Tonalidade</b>  | <b>Gêneros</b>   |
|----------------------------|--------------------|--|
| <b>Amarelo</b>             | Amarelo-pálido     | <i>Actinoplanes, Agrococcus, Arsenicococcus, Cellulomonas, Socorria, Microbacterium, Rhodococcus, Serinicoccus, Streptomyces</i> |
|                            | Amarelo intenso    | <i>Rhodococcus</i>   |
|                            | Amarelo laranja    | <i>Microcella, Rhodococcus</i>   |
|                            | Amarelo-esverdeado | <i>Kocuria, Leifsonia, Microbacterium, Rhodococcus</i>   |
| <b>Rosa/Bege</b>           |                    | <i>Arthrobacter, Gordonia</i>  |
| <b>Laranja-avermelhado</b> |                    | <i>Blastococcus, Dietzia, Microcella, Micromonospora, Nocardia, Rhodococcus, Salinibacterium, Streptomyces, Verrucosispora</i>   |

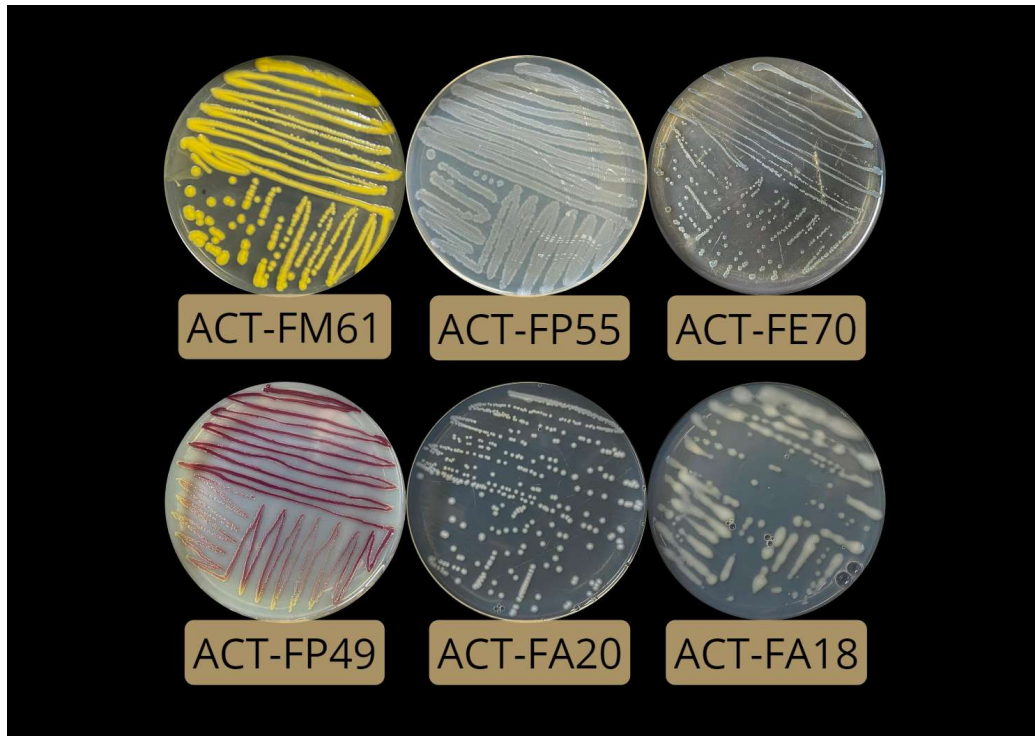
Fonte: ROMERO et al. (2012)

Baseado em aspectos de coloração, a identificação generica dos isolados, quanto aos possíveis gêneros pertencentes, foi descrita no Quadro 4.



**Quadro 4:** Possíveis gêneros de actinobactérias dos isolados obtidos, em função da coloração das colônias segundo Romero et al. (2012)

| <b>Cepas</b>   | <b>Cores da colônia</b> | <b>Prováveis Gêneros</b>   |
|--|-------------------------|--|
| <b>FB03, FA11, FA19, FA21, FM66</b>  | Amarelo-pálido          | <i>Actinoplanes, Agrococcus, Arsenicococcus, Cellulomonas, Socorria, Microbacterium, Rhodococcus, Serinicoccus, Streptomyces</i> |
| <b>FB01, FB04, FB05, FB06, FA12, FA13, FA15, FA16, FA18, FA20, FC31, FA33, FA34, FC35, FC36, FP41, FP43, FP44, FP46, FP47, FP48, FP51, FP52, FP53, FP54, FP57, FM60, FM65, FE74, FE75, FE79,</b> | Branco/creme            | <i>Actinoplanes, Agrococcus, Arsenicococcus, Cellulomonas, Kocuria, Microbacterium, Rhodococcus, Serinicoccus, Streptomyces</i>  |
| <b>FB02, FB07, FB08, FA10, FA14, FA17, FC30, FP45, FM61, FM62, FM67</b>  | Amarelo intenso         | <i>Rhodococcus</i>   |
| <b>FP42, FP49, FP50, FP52, FE70</b>  | Verde solido            | <i>Kocuria, Leifsonia, Microbacterium, Rhodococcus</i>   |
| <b>FB09, FC37, FP40, FP56, FM63, FM64, FE71, FE72, FE73, FE76, FE77, FE78</b>  | Rosa/Bege               | <i>Arthrobacter, Gordonia</i>  |
| <b>FP49</b>  | Laranja-avermelhado     | <i>Blastococcus, Dietzia, Microcella, Micromonospora, Nocardia, Rhodococcus, Salinibacterium, Streptomyces, Verrucosipora</i>    |



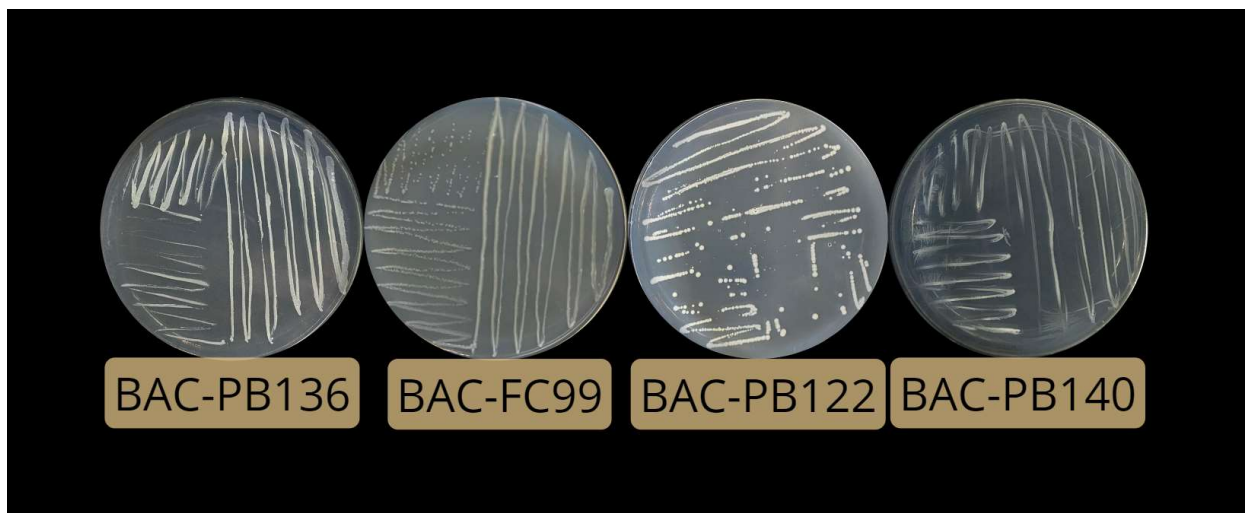
**Figura 7:** Estriamento em placas de isolados de actinobactérias obtidos da rizosfera de *Manihot esculenta*, na cidade de Cruz das Almas, Bahia.

#### 4.1.3. *Bacillus* spp.

Dentre os 52 isolados de bactérias baciliformes (Figura 4), praticamente sua totalidade, 51 (98,08%) foi proveniente do rizoplano, enquanto apenas 1 (1,92%) foi proveniente da rizosfera (isolado FC99). As características macroscópicas se diferenciaram em aspectos de cor, forma, textura, borda e elevação.

A coloração dos isolados se distribuiu entre as cores amarelo translúcido, com 10 isolados (19,23%), branco sólido 21 (40,38%), branco translúcido 12 (23,08%) e bege sólido com 9 isolados (17,31%). Em relação a textura, 47 (90,38%) apresentaram-se brilhantes e 5 (9,62%) foscas. Para a forma, 49 (94,23%) apresentaram-se circulares e apenas 3 (5,77%) rizoides. Quanto à borda, 27 (51,92%) apresentaram-se onduladas e 25 (48,08%) lisas. E, por fim, em relação a sua elevação, obteve-se a mesma proporção, 26 (50%) apresentaram-se convexas e 26 (50%) planas. Em relação ao tamanho das colônias, variaram de 0,5 mm a 4 mm.

As características fenotípicas observadas nos isolados assemelham-se a características dos gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Clostridium* (CARDOSO & ANDREOTE 2016; GOMES, 2013, 2015; LAWSON et al., 2016; OREM, 2018). Os aspectos morfológicos, estão de acordo com o que é descrito na literatura para o grupo de bactérias baciliformes (Figura 8), família Bacillaceae, que foram selecionadas, a partir da exposição das amostras à altas temperaturas (80 °C), induzindo-as a produzirem estruturas de resistência, os endósporos bacterianos, ponto característico do grupo ao qual *Bacillus* spp. pertence, e ocasionando a eliminação das demais bactérias que não apresentam essa característica (MARIANO, 2016; GORDON, 1981). A distinção entre o gênero *Bacillus* e os demais gêneros da família ao qual pertencem (todos produtores de endósporos), consiste nas suas características relacionadas a sua natureza aeróbica estrita ou facultativa, o formato baciliforme e a produção de catalase (GORDON, 1981; CLAUS & BERKELEY, 1986).



**Figura 8:** Estriamento em placas de isolados de *Bacillus* spp. obtidos do rizoplano e rizosfera de *Manihot esculenta*, na cidade de Cruz das Almas, Bahia.

#### 4.2. Patogenicidade humana

Dos 117 isolados submetidos ao teste, 98,3% (115) apresentaram crescimento a 37 °C, com exceção dos isolados, BAC-PB124 e BAC-PB136, que representam apenas 1,7% do total. O teste de incubação a 37 °C, é um indicativo preliminar dos vários testes que, em conjunto, designam a patogenicidade humana de uma cepa bacteriana ou fúngica, como por exemplo, inoculação em hemoculturas, meios a base de sangue animal ou ágar infusão de cérebro-coração (BHI), práticas que não são muito difundidas no Brasil, além de testes

bioquímicos específicos (ANVISA, 2013). Dessa forma, não se pode atribuir de forma assertiva, esta característica aos isolados obtidos.

Segundo Cardoso (2016), microrganismos habitantes da camada superficial do solo, apresentam uma considerável tolerância à amplitude térmica, tendo a capacidade de manter suas atividades vitais e metabólicas em temperaturas com significativo intervalo de diferença, mesmo não sendo consideradas como termofílicas. A temperatura nos primeiros 80 cm superficiais do solo pode chegar a 60 °C, dependendo de fatores como tipo de solo, clima, pluviosidade regional e nível de cobertura do solo (CHERLINKA, 2021). Fatos estes, que corroboram com a termo tolerância apresentada e crescimento dos isolados a temperatura de 37 °C.

#### 4.3. Patogenicidade em planta

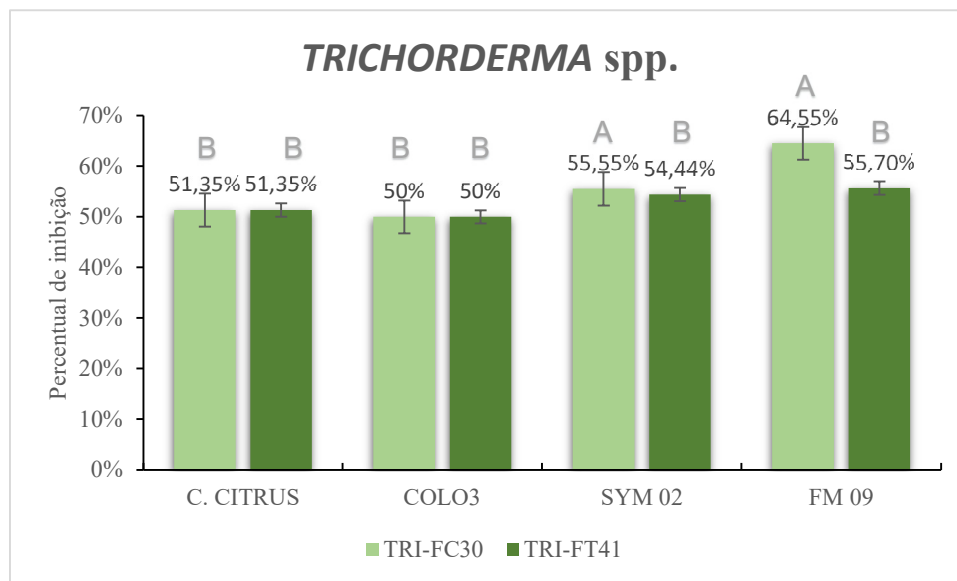
Dos 11 isolados avaliados neste teste, nenhum apresentou patogenicidade à mandioca em folha destacada, em câmara úmida (gerbox), como necrose, queima e apodrecimento até o 7º dia. Após este período, é natural que a planta comece a apresentar alguma dessas características. Visto que a folha teve seu sistema de fluidos e processo fotossintético interrompido, junto ao estresse provocado pelo processo laboral, é esperado que após alguns dias, a folha apresente exsudação, perda de turgescência e empretecimento da folha, como pode ser observado em alguns pontos específicos dos tratamentos T2 (Figura 9).



**Figura 9:** Resultado do teste de patogenicidade em folhas destacadas de plantas de *Manihot esculenta* da variedade (BRS Formosa) com isolados de *Trichoderma* spp., em câmara úmida (gerbox). T0 = controle absoluto (A). T1= controle positivo, isolado patogênico (*Lasiodiplodia theobromae*/colo 3) (B). T2= isolado TRI-FC30 (C). T4= isolado TRI-FT41 (D).

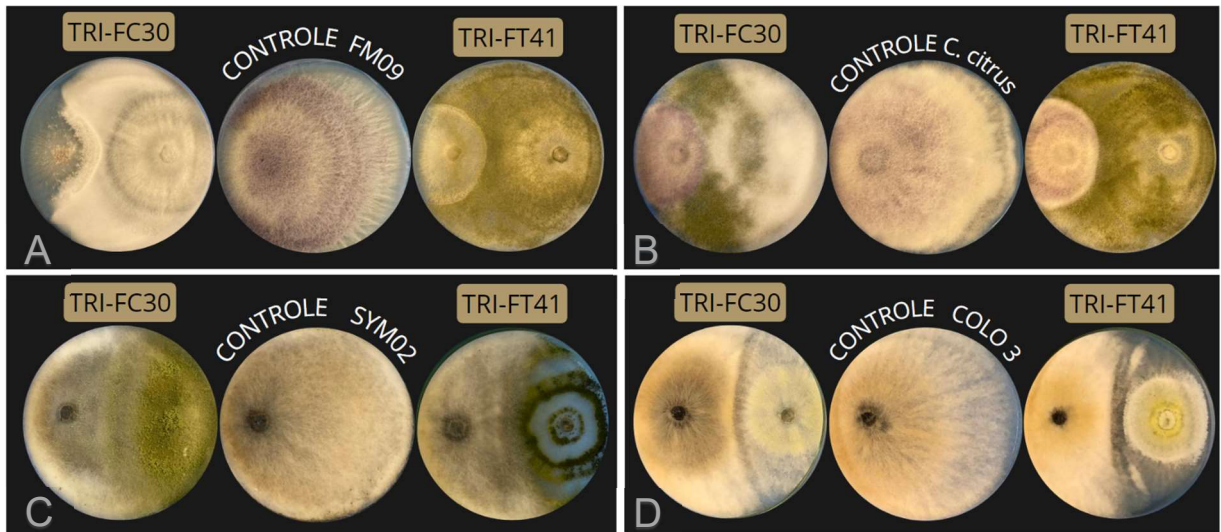
#### 4.4. Validação do potencial antagônico de fungos e bactérias rizósfericas

Para melhor entendimento, os resultados foram separados por grupos de agentes de biocontrole. Os isolados de *Trichoderma* spp. apresentaram percentuais de inibição acima de 50% para todos isolados fitopatogênicos testados, de ambos grupos de doença, não havendo diferença estatística entre eles, com exceção do tratamento TRI-FC30 que se sobressaiu para SYM02 e FM09, com 55,55% e 64,55% de inibição respectivamente (Figura 10).



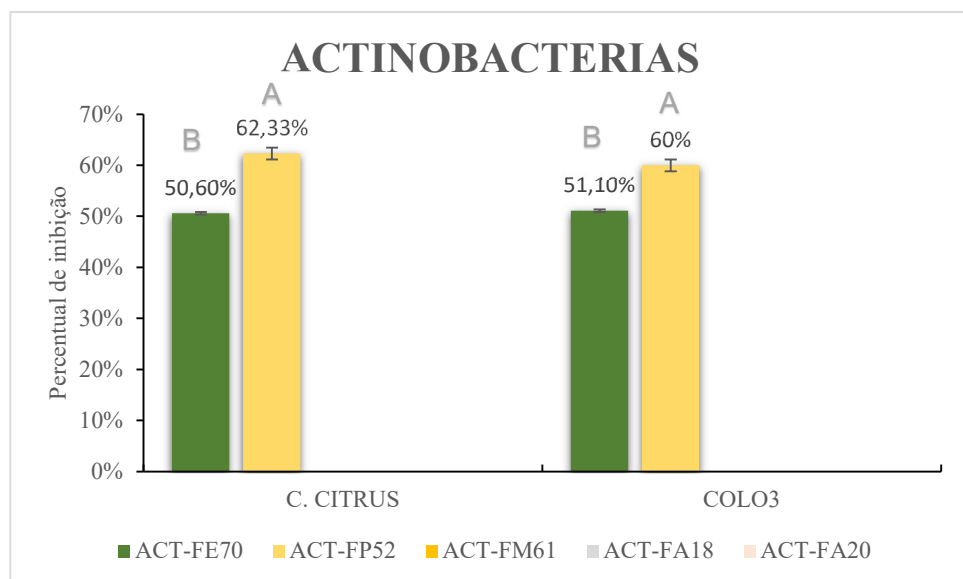
**Figura 10:** Potencial antagônico de isolados de *Trichoderma* na inibição *in vitro* de patógenos causadores de podridão radicular seca (FM09, C. CITRUS) e negra (SYM 02, COLO 3) da mandioca. Scott Knott ( $p < 0,05$ ).

Os mecanismos antagônicos relacionados ao *Trichoderma* são, principalmente, competição onde há um crescimento predominante, que suprime a área micelial do fitopatógeno, caracterizando a competição por espaço e nutrientes, que acredita-se ser o mecanismo principal adotado pelos isolados testados. Também pode ocorrer micoparasitismo, onde o *Trichoderma* infesta diretamente o fitopatógeno, conferindo uma relação não simbiótica de parasitismo com o mesmo, entretanto, não foi observado este comportamento pelos isolados testados. Além da liberação de compostos antibióticos, que pode ser um mecanismo secundário utilizado pelos isolados, já que em alguns tratamentos foi observado um pequeno halo de inibição (Figura 11) (HARMAN, 2004; MELO, 1998; STADNIK & BETTIOL, 2000)



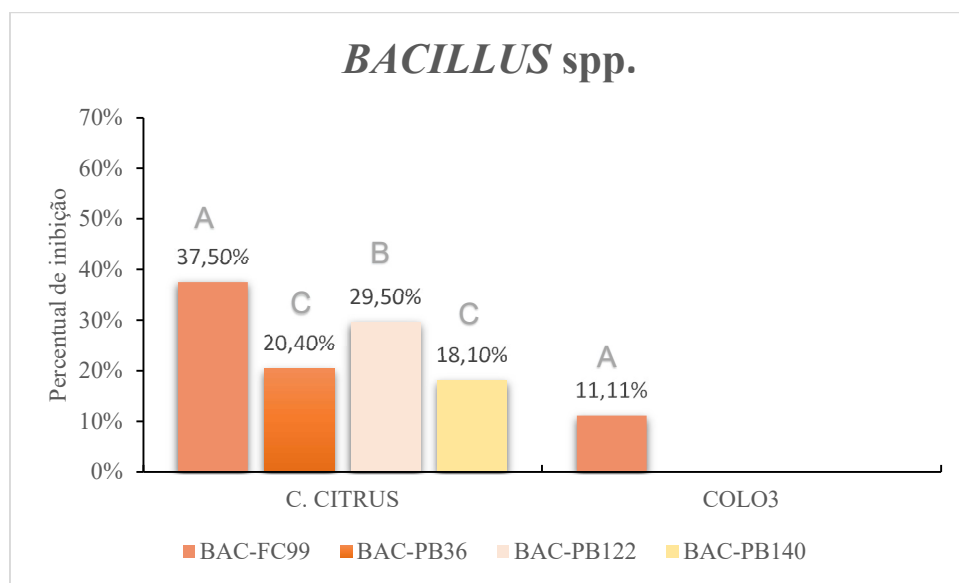
**Figura 11:** Pareamentos *in vitro* de *Trichoderma* spp. versus *F. Oxysporum* (FM 09) tratado com FC30 e FC41 (A). *F. equiseti* (C. CITRUS) tratado com FC30 e FC41 (B). *N. dimidiatum* (SYM 02) tratado com FC30 e FC41 (C). *L. theobromae* (COLO 3) tratado com FC30 e FC41 (D).

Os isolados de actinobactérias se comportaram de forma semelhante em ambos os grupos de doença e diferiram estatisticamente entre si. Os isolados ACT-FM61, ACT-FA18 e ACT-FA20 não apresentaram nenhum potencial de inibição para ambos os grupos de doença. Houve destaque para os tratamentos FE70 e FP52 que obtiveram alto potencial de inibição, com médias de 50% e 61,12%, respectivamente, em ambos os grupos de podridões radiculares (Figuras 12 e 14).



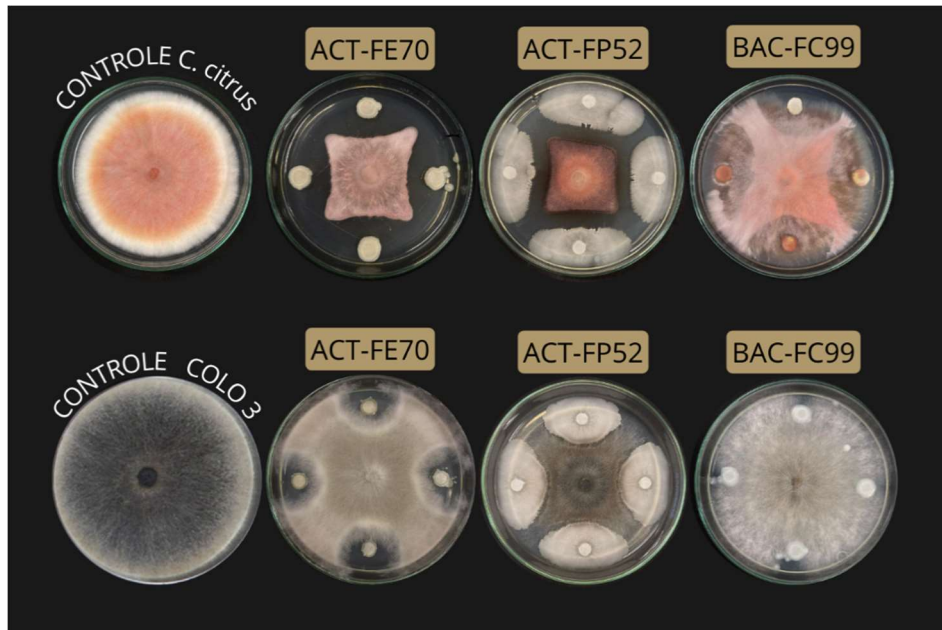
**Figura 12:** Potencial antagonístico de isolados de actinobactérias na inibição *in vitro* de patógenos causadores de podridão radicular seca (C. CITRUS) e negra (COLO 3) da mandioca. Scott Knott ( $p < 0,05$ ).

Já para *Bacillus* os isolados se comportaram de forma diferente para os grupos de doença. Os isolados BAC-PB122, BAC-PB36, e BAC-PB140 não apresentaram nenhum potencial de inibição para podridão negra, enquanto apresentaram inibição baixa para podridão seca, com médias de 29,5%, 20,4% e 18,1%, respectivamente (Figura 13). O isolado BAC-FC99 desempenhou inibição média para podridão seca, com 37,5% e foi o único dos isolados de *Bacillus* que apresentou algum teor de inibição para podridão negra, com percentual de 11,1%, mesmo sendo inoculado com a densidade óptica inferior a todas as outras cepas bacterianas (0,8), com OD de 0,2 e, ainda assim, apresentou teor de inibição (Figuras 13 e 14). O isolado FC99 deve ser reavaliado para melhores conclusões.



**Figura 13:** Potencial antagonístico de isolados de *Bacillus* spp. na inibição *in vitro* de patógenos causadores de podridão radicular seca (C. CITRUS) e negra (COLO 3) da mandioca. Scott Knott ( $p < 0,05$ ). Fonte: Rafaela Oliveira, 2022.

Os pareamentos que apresentaram halo de inibição entre o agente de biocontrole e fungo fitopatogênico, como por exemplo ACT-FP52 e ACT-FE70, provavelmente dispõem dos mecanismos de antibiose por liberação de metabolitos secundários, possivelmente compostos voláteis. Devido à baixa concentração utilizada, em específico, para o isolado BAC-FC99, não foi possível supor quais seriam seus mecanismos de antagonismo, além da competição por espaço e nutrientes (Figura 14).



**Figura 14:** Pareamento *in vitro* dos melhores tratamentos de actinobactérias e *Bacillus* spp. na inibição de patógenos causadores de podridão radicular seca (*C. CITRUS*) e negra (*COLO 3*) da mandioca. Fonte: Rafaela Oliveira, 2022.

Comparando os resultados dos três grupos de agentes de biocontrole, com base nos isolados testados, o uso de *Trichoderma* e actinobactérias na supressão de patógenos *in vitro*; foi mais eficiente do que os isolados de *Bacillus*.

Ainda assim, aqueles que não apresentaram potencial antagônico na supressão direta de fitopatógenos associados à podridão radicular da mandioca, possivelmente podem apresentar perante fitopatógenos de outras culturas, ou ainda podem apresentar potencial na promoção de crescimento e indução de resistência de plantas (MELO & AZEVEDO, 1998; BETTIOL, 2009).

Os percentuais de inibição relativamente mais baixos para espécies causadoras de podridão negra, principalmente com uso *Bacillus*, em relação ao grupo *Fusarium*, podem ser correlacionados com a agressividade e uma possível severidade da doença. Santana & Oliveira (2017) realizaram estudos sobre agressividade dos patógenos causadores da podridão negra, os mesmos utilizados neste trabalho (*COLO3* e *SYM02*), em comparação com isolados do grupo *Fusarium*, com inoculação em folhas destacadas, onde concluiu-se que os isolados causadores de podridão negra mencionados acima, foram mais agressivos, com 32 e 22% de média de área lesionada, respectivamente. Porém, apesar dos números mais baixos para a família Botryosphaeriaceae, todos os isolados de fitopatógenos de ambos os grupos de doença,



apresentaram alguma redução de crescimento com uso de *Bacillus*, *Trichoderma* e actinobactérias.

Apesar dos resultados inferiores, sobre o potencial antagônico de *Bacillus* neste trabalho, entre os microrganismos com alto potencial para a desenvolvimento de agentes de biocontrole - usando sistemas de produção *in vitro* - *Bacillus* está entre as bactérias mais utilizadas no combate de doenças de plantas de diversas culturas, pois possui diversos mecanismos antagônicos, desde antibiose, competição, promoção de crescimento, indução de resistência na planta etc. Além disso, por se tratar de uma bactéria rizósferica produtora de estruturas de resistência, aumenta ainda mais a possibilidade de bom desenvolvimento em aplicação no solo e supressão de patógenos (BETIOL, 2009). Além de atender à alguns requisitos existentes no biocontrole, como baixo custo de produção, ser produzido em larga escala e ter viabilidade e eficiência por um longo período, o mesmo se aplica para actinobactérias (MOTA, 2017).

Aspectos semelhantes são descritos para *Trichoderma*, sendo um dos gêneros fúngicos mais utilizados no controle biológico, com linhas de pesquisas se aprofundando cada vez mais também na promoção de crescimento em plantas, além da inibição direta de patógenos. Os resultados apresentados corroboram para o que vem sendo descrito na literatura. (AUER, 2013; LEWIS, 2001; MONTE, 2001; SILVA, 2007)

Testes *in vitro*, fornecem uma excelente base preliminar e são um forte indicativo para possíveis projeções do que será visto em campo. Porém, não podem ser definitivos, pois não comportam todas as variáveis existentes no meio natural, meio esse, que é o foco principal de utilização de manejos a base de bioinsumos.

## 5. CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho indicam que os isolados de *Trichoderma*, *Bacillus* e actinobactérias tem potencial antagônico/inibitório contra patógenos causadores das podridões radiculares da mandioca e podem ser agentes de controle biológico promissores no manejo destas doenças.

Cinco isolados apresentaram potencial antagônico para ambos os grupos de doença: *Trichoderma* (TRI-FC30 e TRI-FT41), Actinobactérias (ACT-FE70, ACT-FB52) e *Bacillus* BAC-FC99.

O microbioma da mandioca tem potencial para a obtenção de microrganismos com valor biotecnológico no campo do controle biológico de doenças.

## **6. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Não se pôde chegar a conclusões sólidas sobre as hipóteses levantadas neste trabalho, com relação a melhor efetividade de microrganismos rizósfericos isolados da mandioca, para uso na própria cultura, no controle de doenças, referentes ao uso de microrganismos provenientes de outras culturas, pois, deve-se realizar os testes de potencial de inibição com o restante da coleção adquirida. Ainda assim, aqueles que não apresentaram alto potencial de inibição, não devem ser desconsiderados, pois a antibiose direta não é o único mecanismo de controle biológico, este, pode acontecer de maneira indireta através da indução de resistência na planta e promoção de crescimento. Testes futuros devem adicionar a planta como variável, para confirmar a interação positiva entre, planta-patógeno-agente de biocontrole.

## RERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde**. Módulo 8: Detecção e identificação de fungos de importância médica /Agência Nacional de Vigilância Sanitária– Brasília: Anvisa, 2013.
- AIGBE, S. O.; REMISON, S.U. Minor root pathogens of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) in Nigeria. **Department of Crop Science**, Ambrose Alli University, Ekpoma, Nigeria, 2009.
- ALFENAS, A. C.; MÁFIA, R. G. **Métodos em Fitopatologia**, Editora UFV, Viçosa, MG. 2007, 382p.
- AUER, C. G. **Seleção de antagonistas para o controle de *Cylindrocladium spathulatum*, agente causal da pinta-preta em erva-mate**. 2013. Dissertação (mestrado em engenharia florestal). Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Agrárias, Paraná, 2013.
- BELLÉ, R. B.; FONTANA, D. C. **Patógenos De Solo: Principais doenças vasculares e radiculares e formas de controle**. Goiânia: Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer, v.15 n.28; 2018.
- BETTIOL, W. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009.
- BLUM, L.E.B. **Fitopatologia: O estudo das doenças de Plantas**. 1º Ed. Brasília: Otimismo, 2006.
- CARDOSO, E. J. B. N.; ANDREOTE, F. D. **Microbiologia do Solo**. 2ª ed. Piracicaba: ESALQ, 2016.
- CARDOSO, J. E.; VIDAL, J. C.; SANTOS, A. A.; FREIRE, F. C. O.; VIANA, F. M. P. First report of black branch dieback of cashew caused by *Lasiodiplodia theobromae* in Brasil. **Plant Disease**, St. Paul, MN, v. 86, n. 5, p. 558, 2002.
- CHERLINKA, V. Temperatura Do Solo: Fator De Desenvolvimento. **Eos Data Analytics**, 2021.
- CORREIA, K. C.; MICHEREFF, S. J. **Fundamentos e desafios do manejo de doenças radiculares causadas por fungos**. 1º ed. Recife: EDUFRPE, 2018.
- CLAUS, D.; Berkeley, Genus *Bacillus* Cohn, 1872. Em: Sneath, PHA, Mair, NS, Sharpe, ME e Holt. JG, Eds., **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, The Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1986.
- DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. **Métodos Básicos de Fitopatologia**. 2ª ed. Boca Raton: 2019.
- EKANAYAKE, I.J.; OSIRU, D.S.O.; PORTO, M.C.M. Morphology of cassava. Ibadan: **International Institute of Tropical Agriculture - IITA**, 1997.
- FAGUNDES, L.K. **Desenvolvimento, crescimento e produtividade da mandioca em função de datas de plantio**. 2009. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009.
- FAO - Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura. **Produzir mais com menos/ Mandioca/ Um guia para intensificação sustentável da produção - informe de política**. 2013.
- FIALHO, J. F.; VIEIRA, E. A. **Mandioca no Cerrado: orientações técnicas**. Embrapa Cerrados, 2011.
- FRITSCHÉ, Y.; LOPES, M.E.; SELOSSE, M.A.; STEFENON, V.M.; GUERRA, M.P. *Serendipita restingae* sp. nov. (Sebacinales): an orchid mycorrhizal agaricomycete with wide host range. **Springer Mycorrhiza**, 2020.

FUKUDA, C. **Podridão das Raízes da Mandioca**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, Mandioca em Foco, 1991.

FUKUDA, W.M.G.; FUKUDA, C.; DIAS, M.C.; XAVIER, J.J.B.N.; FIALHO, J.F. Variedades. In: SOUZA, L.S.; FARIAS, A.R.N.; MATTOS, P.L.P.; FUKUDA, W.M.G. **Aspectos socioeconômicos e agrônômicos da mandioca**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006.

GARDES, M.; BRUNS, T.D. (1993) ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. **Molecular Ecology** 2:113–118.

GOMES, J. C.; LEAL E. C. **Cultivo da Mandioca para a Região dos Tabuleiros Costeiros**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura tropical, 2003.

GOMES, M. J. P. **Gênero *Bacillus* spp.** 2013. Disponível em: <[http://www.ufrgs.br/labacvet/files/Gênero Bacillus 4-2013-1 versão 2013.pdf](http://www.ufrgs.br/labacvet/files/Gênero_Bacillus_4-2013-1_versão_2013.pdf)>.

GOMES, M. J. P. **Gênero *Pseudomonas* spp.** 2015. Disponível em: <[http://www.ufrgs.br/labacvet/files/Gênero Pseudomonas e Burkholderia 4-2015\\_1.pdf](http://www.ufrgs.br/labacvet/files/Gênero_Pseudomonas_e_Burkholderia_4-2015_1.pdf)>.

GORDON, R. E. One hundred and seven years of the genus *Bacillus*. The Aerobic Endospore Forming Bacteria, 1981.

GRIGOLETTI JÚNIO R, A.; SANTOS, A. F.; AUER, C. G. Perspectivas do uso do controle biológico contra doenças florestais. **Revista Floresta**, 2000.

HARMAN, G.E.; HOWELL, C.R.; VITERBO, A.; CHET, I. e LORITO, M. - *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews Microbiology**. 2004.

HRIDYA, A. C. et al. Effect of biocontrol agents and biofertilizers on root rot, yield, harvest. **Archives of Agronomy and Soil Science**, University of Saskatchewan Library, 2012.

HOFFEMAN, A. Maçã produção: Cap. 4, Fatores edafoclimáticas. **Frutas do Brasil**, Brasília, Embrapa Informação Tecnológica, 2004.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1618#resultado>

JAMES B. S.; ONKAR D. D. **Métodos básicos de fitopatologia**. 2ª edição. Boca Raton: CRC Press, 1995.

JUNGES, E.; MUNIZ, M.F.; MEZZOMO, R.; BASTOS, B.; MACHADO R.T. *Trichoderma* spp. na Produção de Mudanças de Espécies Florestais— **Floresta e ambiente**, 2016.

KHALILI, E.; JAVED, M. A.; HUYOP, F.; RAYATPANAH, S.; JAMSHID, S.; WAHAB, R. A. Avaliação de isolados de *Trichoderma* como potencial agente de controle biológico contra a doença da podridão do carvão da soja causada por *Macrophomina phaseolina*, **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, 2016.

KRUGER, T.L.; BACCHI, L.M.A. **Fungos**. In: Filho, A.B.; Kimati, H.; Amorim, L.; Rezende, J.A.M., Camargo, L.E.A. -Manual de Fitopatologia. 3 ed. São Paulo, Agronômica Ceres, 1995.

LAWSON, P.A.; CITRON, DM.; TYRELL, K.L.; FINEGOLD, S.M. 2016. Reclassification of *Clostridium difficile* as *Clostridioides difficile* (Hall and O'Toole 1935) Prévot 1938. *Anaerobes*,

- LEITE, I. C. H. L.; LOPES, U. P. **Controle químico de patógenos radiculares**. 1. ed. Recife: EDUFRPE, 2018.
- LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. *The Fusarium laboratory manual*. **Blackwell**, Ames, 2006.
- LEWIS, J.A.; LUMSDEN, R.D. Biocontrol of damping-off of greenhouse-grown crops caused by *R. solani* with formulation of *Trichoderma* spp. **Crop Protection**, v.20, p.49-56, 2001.
- LIMA, J.S.; MOREIRA, R.C.; CARDOSO, J.E.; MARTINS, M.V.V.; VIANA, F.M.P. Cultural, morphological and pathogenic characterization of *Lasiodiplodia theobromae* associated with tropical fruit plants. **Summa Phytopathologica**, 2013.
- LOPES, U. P.; MICHEREFF, S. J. **Desafios do Manejo de Doenças Radiculares Causadas por Fungos**. 1. ed. Recife: EDUFRPE, 2018.
- MARIANO, R.L.R.; SILVEIRA, E.B. **Manual de Práticas em Fitobacteriologia**. Recife: UFRPE, 2005.
- MARIANO, R. de L. R.; SOUZA, E. B. de S. **Manual de práticas em fitobacteriologia**. EDUFRPE, 2016, p. 1-234.
- MATTOS, P.L.P.; FARIAS, A.R.N.; FILHO, J.R.F. **Mandioca: o produtor pergunta, a Embrapa responde**. Brasília-DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2006.
- MELO, I.S. **Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos**. In: Melo, I.S. e Azevedo, J.L. (Ed.) - *Controle Biológico*, v.1. Jaguariúna, Embrapa, 1998. p.17-60
- MOTA, M. S.; GOMES, C. B.; SOUZA JUNIOR, I. T.; MOURA, A. B. **Seleção bacteriana para controle biológico de doenças de plantas: determinação e validação de critérios**. São Paulo: Braz. J. Microbiol, 2017.
- MONTE, E. Understanding *Trichoderma*: between biotechnology and microbial ecology. **International of Microbiology**, v.4, p.1-4, 2001.
- MYCOLOGY ONLINE. Disponível em: <  
[http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal\\_Descriptions/Hyphomycetes\\_\(hyaline\)/Trichoderma/](http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Hyphomycetes_(hyaline)/Trichoderma/)>  
 Acesso em: dezembro de 2022.
- NASCIMENTO, I. O.; RODRIGUES, A. A. C.; MORAES, F. H.; SOUZA, F. A.; CORSI, M. C. F.; CATARINO, A. M. Isolation, identification and in vitro evaluation of *Bacillus* spp. in control of *Magnaporthe oryzae* comparing evaluation methods. **Academic Journals: African Journal of Agricultural Research**, 2016.
- OREM, J. C. **Diversidades funcional e filogenética de Bactérias aeróbias formadoras de endósporos isoladas de solo**. 2018. Tese (doutorado em Biologia Microbiana). Brasília-DF: Universidade de Brasília, 2018.
- PHILLIPS, A. J. L.; ALVES, A.; ABDOLLAHZADEH, J.; SLIPPERS, B.; WINGFIELD, M. J.; GROENEWALD, J. Z.; CROUS, P. W. The Botryosphaeriaceae: genera and species known from culture. **Studies in Mycology**, v. 7. 2013.
- ROMERO, F.; FERNÁNDEZ-CHIMENO, R. I.; DE LA FUENTE, J. L.; BARREDO, J.L. Selection and taxonomic identification of carotenoid-producing marine Actinomycetes. Microbial carotenoids

from bacteria and microalgae: methods and protocols. **Methods in Molecular Biology**. v. 892, p. 13-20, 2012.

SADFI-Z OUAOUI, N.; HANNACHI, I.; ROUAISSI, M; HAJLAOUI, M. R.; RUBIO, M. B.; MONTE, E; BOUDABOUS, A.; HE RMOSA, M. R. Biodiversity of *Trichoderma* strains in Tunisia., **Canadian Journal of Microbiology**. 2009.

SANTANA, M.P.; OLIVEIRA, S.A.S. **Agressividade de fungos causadores de podridão radicular negra e seca da mandioca**. In: 11ª jornada científica, 2017, Cruz das Almas. Resumos. Cruz das Almas: Centro Nacional de Mandioca e Fruticultura, 2017.

SECCO, R.S. **Flora da reserva Ducke, Amazonas, Brasil: Euphorbiaceae - Parte I**. Belém-PA: Museu Paraense Emílio Goeldi, Departamento de Botânica, 2005.

SILVA, J.B.T.; MELLO, S.C.M. Utilização de *Trichoderma* no Controle de Fungos Fitopatogênicos. Brasília: **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, 2007.

STEFANELLO, L. **Produtividade e controle de podridão radicular na cultura da mandioca (*Manihot esculenta*) com uso de *Trichoderma* spp.** 2016. Dissertação (Mestrado). Marechal Cândido Rondon, 2016.

SOUZA, L. S.; FIALHO, J. F. Cultivo da Mandioca para a Região do Cerrado/Pragas. **Embrapa Mandioca e Fruticultura**, Cruz das Almas, 2003 (a).

SOUZA, R. D; MENDONCA, E. A. F.; SOARES, M. A. Atividade antagônica a microrganismos patogênicos por bactérias endofíticas isoladas de *Echinodorus scaber* Rataj. **Summa Phytopathol**, Botucatu, 2015 (b).

MACHADO A. R.; PINHO D. B.; OLIVEIRA S. A. S.; PEREIRA O. L. New occurrences of Botryosphaeriaceae causing black root rot of cassava in Brasil. **Tropical Plant Pathology**, v. 39, p. 464-470, 2014.

MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Controle biológico**. volume 1. Jaguariúna, SP:EMBRAPA, 1998.

STADNIK, M.J. E BETTIOL, W. **Controle biológico de oídeos**. In: Melo, I.S. Azevedo, J.L. (Ed.) - Controle biológico. v.3. Jaguariúna, Embrapa Meio Ambiente, 2000. p. 95–112

TOMICH, R. G. P. [et al.]. Etnovarietades de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) cultivadas em assentamentos rurais, MS. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, **Embrapa pantanal**, Corumbá, 2008.

TREMACOLDI, C.R. **Cultura da Mandioca: Manejo das principais doenças da cultura da mandioca no estado do Pará**. Brasília-DF: Embrapa Amazônia Oriental, 2016.

a VILAS BOAS, S.A.; OLIVEIRA, S.A.S.; HOHENFELD, C.S.; SANTOS, V.S.; OLIVEIRA, E.J. **Identificação de acessos de mandioca com resistência múltipla à podridão radicular**. 16º CONGRESSO BRASILEIRO DE MANDIOCA, Foz do Iguaçu-PR, 2015.

b VILAS BOAS, S. A. **Identificação de fontes de resistência e espécies de fungos e oomicetos causadores de podridão radicular em mandioca**. 2015. Dissertação (Mestrado Ciências Agrárias) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas-BA, 2015.

WILSON, E. O. Biodiversity. Washington, D.C.: **National Academy Press**, 1988.

WILLIAMS, M. A. J. International Mycological Institute, Department of Microbiology, University of Leicester, PO Box 138, **Medical Sciences Building**, University Road: 1983.