



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

CAROLINE LOPES DAMASCENO

**POTENCIAL DE *Penicillium citrinum* PARA O CONTROLE DE
Aspergillus niger, AGENTE CAUSAL DA PODRIDÃO
VERMELHA DO SISAL**

CRUZ DAS ALMAS

2012

CAROLINE LOPES DAMASCENO

**POTENCIAL DE *Penicillium citrinum* PARA O CONTROLE DE
Aspergillus niger, AGENTE CAUSAL DA PODRIDÃO
VERMELHA DO SISAL**

Monografia apresentada ao curso de graduação Bacharelado em Biologia, da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como requisito parcial a obtenção do título de Bacharel em Biologia

Orientadora: Dra. Ana Cristina Fermino Soares

Co-orientador: Jefferson Oliveira de Sá

(Doutorando – PPG ciências Agrárias)

CRUZ DAS ALMAS – BA

2012

FICHA CATALOGRÁFICA

D155 Damasceno, Caroline Lopes.
Potencial de *Penicillium citrinum* para o controle de *Aspergillus niger*, agente causal da podridão vermelha do sisal / Caroline Lopes Damasceno. _ Cruz das Almas, BA, 2012.
69f.; il.
Orientadora: Ana Cristina Fermino Soares.
Coorientador: Jefferson Oliveira de Sá.

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

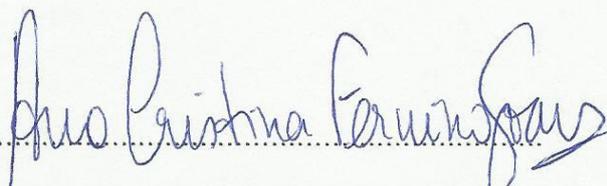
1.Sisal – Cultura. 2.Controle biológico – microorganismo.
I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II. Título.

CDD: 633.577

**POTENCIAL DE *Penicillium citrinum* PARA O CONTROLE DE
Aspergillus niger, AGENTE CAUSAL DA PODRIDÃO VERMELHA DO
SISAL**

CAROLINE LOPES DAMASCENO

BANCA EXAMINADORA

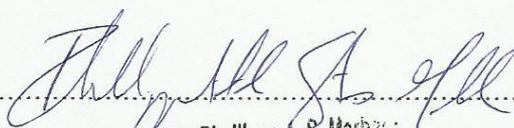


PROFa. Dra. ANA CRISTINA FERMINO SOARES

(Orientadora)



Dra. ÉLIDA BARBOSA CORRÊA



PROF. Dr. PHELLIPPE A. S. MARBACH
CCAAB, UFRB
MAT. SIAPE 164675:

Cruz das Almas, 03 de março de 2012.

Conceito final : Aprovada

À minha família, em especial aos meus exemplos de vida, minha mãe Maria, meu pai Damasceno e minha Dinda Josene.

Aos meus queridos irmãos, Daline, Ygor e Iago.

Ao meu companheiro, amigo e namorado André Lordelo.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, pela oportunidade.

À minha orientadora Prof^a Dr^a Ana Cristina Fermino Soares, por sua amizade, compreensão, por ter acreditado em meu potencial e por me ajudar na concretização deste projeto. Obrigada por contribuir para o meu desenvolvimento acadêmico e pessoal.

Ao meu co-orientador Jefferson Oliveira de Sá, por todo empenho, amizade, dedicação e colaboração dispensados a mim durante todos estes anos. Agradeço imensamente por todos os ensinamentos transmitidos a mim, que certamente foram muito relevantes para meu crescimento como discente e como ser humano.

Aos meus colegas de laboratório, Ana Cláudia, Cristiano, Rafael, por toda ajuda prestada, pela excelente convivência e por toda a amizade.

Aos técnicos do laboratório de microbiologia, em especial à minha querida Zozilene (Lene), que com toda paciência me ajudou a dar os primeiros passos. A Carolina Yamamoto (“mamãe”), a Vitória, Luana e aos demais técnicos, por toda contribuição.

A todo pessoal do laboratório, estagiários, mestrandos e doutorandos.

À mestranda Fenícia Brito, pela contribuição quanto à análise filogenética.

A todos os professores do curso de ciências biológicas pelos ensinamentos.

Aos colegas do curso de ciências Biológicas, turma de 2007, pela amizade e convívio.

Às minhas amigas e companheiras de residência, Érika, Mara, Paty e Thay, por todos esses anos de amizade e ótima convivência.

Aos meus pais, Damasceno e Maria, pela vida, pelo exemplo de dedicação, por todo incentivo, amor e carinho; e por me ensinaram que para viver é preciso ser perseverante e não desistir diante dos obstáculos.

À minha dinda, Josene, por todo o seu entusiasmo, apoio e por me mostrar que uma das maiores virtudes do ser humano é a humildade.

A toda minha família, minha base e alegria.

Aos meus irmãos, Daline, Ygor e Iago, pela convivência e pelos ensinamentos que me ajudaram a melhorar enquanto pessoa.

Ao meu estimado companheiro, André, pelo incentivo, paciência, amor, carinho e por estar ao meu lado, me entusiasmando em todos os momentos.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho e para minha formação acadêmica e pessoal, meus sinceros agradecimentos.

E por último, mas não menos importante agradeço a Deus, que sempre está ao meu lado me fortalecendo nos momentos difíceis.

“Se eu pudesse deixar algum presente a você, deixaria aceso o sentimento de amar a vida dos seres humanos. A consciência de aprender tudo o que foi ensinado pelo tempo a fora. Lembraria os erros que foram cometidos para que não mais se repetissem. A capacidade de escolher novos rumos. Deixaria para você se pudesse, o respeito àquilo que é indispensável. Além do pão, o trabalho. Além do trabalho, a ação. E, quando tudo mais faltasse, um segredo: O de buscar no interior de si mesmo a resposta e a força para encontrar a saída.”

(Mahatma Gandhi)

RESUMO

A produção de sisal (*Agave sisalana* Perrine) para extração da fibra representa um importante segmento econômico para a região Nordeste do Brasil. Entretanto problemas como a podridão vermelha do sisal, causada pelo fungo *Aspergillus niger*, têm provocado o declínio desta cultura. Dentre as estratégias de controle de doenças de plantas, o controle biológico com o uso de micro-organismos antagonistas vem sendo apontado como um método viável. No presente trabalho, avaliou-se o potencial de *Penicillium citrinum*, obtido de plantas de sisal da região semiárida da Bahia, para o controle da podridão vermelha do sisal. *Penicillium citrinum* foi identificado por meio de técnicas morfológicas e moleculares. Testes de antagonismo nos meios de cultura CYA e BDA demonstraram que *P. citrinum* inibe o crescimento micelial de *A. niger*, apresentando a maior porcentagem de inibição (65,76%) no meio CYA, quando o patógeno foi introduzido 72 horas após a incubação do meio com *P. citrinum*. Em testes *in vitro*, com discos de caule de sisal, foram observados melhores índices de inibição do patógeno em intervalos de aplicação entre os fungos maiores que 48 horas. *P. citrinum* coloniza os tecidos internos de raiz e caule de sisal em aproximadamente cinco dias, após a inoculação. Este fungo não é patogênico ao sisal e controla em até 100% a podridão vermelha em mudas de sisal, quando inoculado na planta em intervalos de pelo menos 24 horas antes da inoculação do patógeno. *A. niger* apresentou baixa capacidade de sobrevivência em solos da região sisaleira, enquanto que a população de *P. citrinum* demonstrou ser mais estável nessas condições e também eficiente em reduzir a população de *A. niger* no solo. Os metabólitos de *P. citrinum* foram eficientes na inibição da germinação de esporos de *A. niger*. Em meio de cultivo BDA, a dosagem de 75% de metabólitos em meio de cultura proporcionou maior redução do crescimento micelial de *A. niger*. Concluiu-se que, *P. citrinum* apresenta potencial para o controle da podridão vermelha do sisal.

Palavras – chave: Controle biológico, *Agave sisalana*, antagonismo.

ABSTRACT

Sisal (*Agave sisalana* Perrine) production for fiber extraction represents an important economic sector for the Northeastern region of Brazil. However, problems such as sisal red rot disease, caused by *Aspergillus niger*, have caused a decline of this crop. Amongst the strategies for plant disease control, biological control with the use of antagonistic micro-organisms has been pointed out as a viable method. In this study, the potential of *Penicillium citrinum* isolated from sisal plants of the semiarid region of Bahia State, in Brazil, was evaluated for control of sisal red rot disease. *Penicillium citrinum* was identified by using morphological and molecular techniques. Tests of antagonism in CYA and PDA culture media showed that *P. citrinum* inhibits mycelium growth of *A. niger*, showing the highest percentage of inhibition (65.76%) on CYA medium, when the pathogen was introduced 72 hours after incubation of CYA medium with *P. citrinum*. In vitro tests with sisal stem tissue discs, demonstrated highest pathogen inhibition rates for time intervals of fungal inoculation greater than 48 hours. *P. citrinum* colonizes internal sisal root and stem tissue approximately five days after inoculation. This fungus is not pathogenic to sisal plants and can control up to 100% sisal red rot disease, when inoculated in plants, at least 24 hours before pathogen inoculation. *A. niger* showed poor ability to survive in soils from sisal plantations, while the population of *P. citrinum* appeared to be more stable under these conditions, and also, was shown to be effective in reducing the population of *A. niger* in soil. The metabolites of *P. citrinum* were effective in inhibiting spore germination of *A. niger*. In PDA culture medium, 75% of medium with fungal metabolites provided the greatest reduction rate of *A. niger* mycelium growth. It is concluded that *P. citrinum* presents the potential to control sisal red rot disease.

Keywords: Biological control, *Agave sisalana*, antagonism.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Território do Sisal na Bahia..... p.21
- Figura 2.** Plantas de sisal com podridão vermelha. (A) Sintomas externos- amarelecimento e murcha das folhas; (B e C) Sintomas internos- descoloração avermelhada dos tecidos do caule e base das folhas..... p.23
- Figura 3.** *Aspergillus niger* (A) Conidióforo de *A. niger*; (B) Cultura de *A. niger* em placa de Petri com meio de cultivo Ágar Batata Dextrose..... p. 23
- Figura 4.** *Penicillium citrinum* (A) Estruturas de *Penicillium* sp.; (B) Cultivo em placa de Petri com meio de cultivo BDA..... p.26
- Figura 5.** Esquema de pareamento entre *Aspergillus niger* e *Penicillium citrinum* em placa de Petri..... p.30
- Figura 6.** Escala de notas: (A) Planta sadia nota 0; (B) Sintoma inicial nota 1; (C) Sintoma avançado nota 2 e (D) Planta morta nota 3..... p. 32
- Figura 7.** Colônia de *P. citrinum*, cultivada em meio CYA, a 25° C. (A) Colônias em três pontos equidistantes da placa, (B) Colônia, mostrando presença de exsudatos e (C) Reverso da colônia, amarelado..... p.37
- Figura 8.** Micrografia do isolado de *Penicillium citrinum*..... p.38
- Figura 9.** Árvore filogenética, gerada por meio do método de Neighbor – Joining, usando o modelo de Jukes-Cantor. A seta indica o isolado de *Penicillium* spp., DA- Dikaria, Ascomycota..... p.39
- Figura 10.** Estimativas de divergência evolutiva entre as seqüências, mostrando o número de substituições de bases por sítio entre as seqüências..... p.40
- Figura 11.** Curva de regressão do antagonismo de *Penicillium citrinum* a *Aspergillus niger*, pareados em diferentes intervalos de tempo em meio de cultura CYA, avaliados aos 0, 3, 6, 9, 12 dias. T0h - intervalo de 0 horas entre *Penicillium citrinum* e *Aspergillus niger*; T24h - intervalo de 24 horas; T48h - intervalo de 48 horas; T72h - intervalo de 72 horas. C0h, C24h, C48h, C72h - Controles negativos (somente *Aspergillus niger*)..... p.42
- Figura 12.** Pareamento de culturas de *Aspergillus niger* (colônia negra) e *Penicillium citrinum* (colônia esverdeada), em meio de cultura p.43

CYA, com variação do intervalo de tempo entre a repicagem do *Penicillium citrinum* e do *Aspergillus niger*. (A) Controle; (B) Tratamento 0 horas; (C) Tratamento 24 horas; (D) Tratamento 48 horas; (E) Tratamento 72 horas.....

- Figura 13.** Curva de regressão do antagonismo de *Penicillium citrinum* a *Aspergillus niger*, pareados em diferentes intervalos de tempo em meio de cultura BDA, avaliados aos 0, 3, 6, 9, 12, 15 e 18 dias. T0h - intervalo de 0 horas entre *Penicillium citrinum* e *Aspergillus niger*; T24h - intervalo de 24 horas; 48h - intervalo de 48 horas; T72h - intervalo de 72 horas. C0h, C24h, C48h, C72h - Controles negativos (somente *Aspergillus niger*)..... p.44
- Figura 14.** Pareamento de culturas de *Aspergillus niger* (colônia negra) e *Penicillium citrinum* (colônia esverdeada), em meio de cultura BDA, com variação do intervalo de tempo entre a repicagem do *Penicillium citrinum* e do *Aspergillus niger*. (A) Controle; (B) Tratamento 0 - 0 horas; (C) Tratamento 1 - 24 horas; (D) Tratamento 2 - 48 horas; (E) Tratamento 3 - 72 horas. Após 18 dias da repicagem..... p.45
- Figura 15.** Efeito do antagonismo entre *Penicillium citrinum* e *Aspergillus niger* em discos de caule de sisal em diferentes intervalos entre a inoculação com os fungos (A) Tratamento 0 - 0 horas; (B) Tratamento 1 - 24 horas; (C) Tratamento 2 - 48 horas; (D) Tratamento 3 - 72 horas; (E) Controle positivo; (F) Controle negativo..... p.48
- Figura 16.** Teste de colonização de sisal **(A)** Crescimento de *Penicillium citrinum* após cinco dias de semeio em placas de Petri com BDA salino de raízes desinfestadas, coletadas de mudas de sisal inoculadas com *P. citrinum*; **(B)** Crescimento de *P. citrinum* após cinco dias de semeio de fragmentos de caule desinfestados, coletados de mudas de sisal inoculadas com *P. citrinum*.; **(C)** e **(D)** Controles de raiz e caule..... p.49
- Figura 17.** Frequência de colonização por *Penicillium citrinum* em fragmentos de raízes e pedaços de caule de sisal desinfestados 5 e 10 dias após a sua aplicação. Controle (água destilada) Raiz e Caule inoculados por *Penicillium citrinum*. Médias seguidas pela mesma letra entre os tratamentos não diferem entre si pelo teste F a 5% de probabilidade..... p.50
- Figura 18.** Comparação entre caule de sisal **(A)** inoculado com *Penicillium citrinum* e **(B)** tratamento controle..... p.51
- Figura 19.** Avaliação de mudas de sisal inoculadas com *Penicillium citrinum* e *Aspergillus niger* em diferentes intervalos de tempo por meio de escalas de notas: 0-Planta sadia; 1- Sintoma p.52

inicial; 2-Sintoma avançado; 3-Planta morta. Médias seguidas pela mesma letra diferem entre si pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis a 5% de probabilidade.....

- Figura 20.** Representação dos solos da região semiárida. **(A)** Município de Ourolândia **(B)** Valente **(C)** Barrocas **(D)** Mirangaba..... p.53
- Figura 21.** Sobrevivência de *Aspergillus niger* em diferentes solos de diferentes municípios. Solo 1: Ourolândia; Solo 2: Valente; Solo 3: Barrocas e Solo 4: Mirangaba..... p.54
- Figura 22.** Sobrevivência de *Penicillium. citrinum* em diferentes solos de diferentes municípios. Solo 1: Ourolândia; Solo 2: Valente; Solo 3: Barrocas e Solo 4: Mirangaba..... p.55
- Figura 23.** Comparação da sobrevivência de *A. niger*, em solos de diferentes municípios, quando inoculado junto ao *P. citrinum* e na ausência deste. Solo 1: Ourolândia, Solo 2: Valente; Solo 3: Barrocas; Solo 4 : Mirangaba..... p.56
- Figura 24.** Inibição da germinação de esporos de *Aspergillus niger* por metabólitos de *Penicillium citrinum* (A) Tratamento controle mostrando esporos germinados, (B) Tratamento com metabólitos indicando inibição da germinação dos esporos..... p.57
- Figura 25.** Inibição da germinação de esporos de *Aspergillus niger* por metabólitos de *Penicillium citrinum*. **T0:** Tratamento controle e **T1:** Tratamento com metabólitos de *P. citrinum*. Médias seguidas de mesma letra entre os tratamentos não diferem entre si pelo teste F a 5% de probabilidade..... p.58
- Figura 26.** Crescimento micelial de *A. niger*, medido por meio do índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM). CT – Controle apenas meio BDA; CT1 – Controle do tratamento 1 (meio BDA acrescido de 75% de meio CYA líquido); CT2- Controle do tratamento 2 (meio BDA acrescido de 50% de meio CYA); CT3 - Controle do tratamento 2 (meio BDA acrescido de 25% de meio CYA); T1 – meio de cultura com 75% de metabólitos de *P. citrinum*; T2- 50% de metabólitos e T3 –25% de metabólitos. Médias seguidas de mesma letra, entre tratamentos, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade..... p.59
- Figura 27.** Inibição de crescimento micelial de *A. niger*. (A) Controle meio BDA; (B) Controle tratamento 1; (C) Controle tratamento 2; (D) Controle tratamento 3; (E) Tratamento 1- 75% de metabólitos de *P. citrinum*; (F) Tratamento 2 – 50% de metabólitos; (G) Tratamento 3 - 25% de metabólitos..... p.59

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Porcentagem de inibição de *Penicillium citrinum* ao crescimento da colônia de *Aspegillus niger* em placa de Petri, repicados em diferentes intervalos de tempo e em dois meios de cultivo: Czapek Yest Agar (CYA) e Ágar Batata Dextrose (BDA).....p.41
- Tabela 2.** Equações de regressão do crescimento micelial de *A. niger*, em resposta ao pareamento entre *A. niger* e *P. citrinum* em meio CYA..... p.43
- Tabela 3.** Equações de regressão do crescimento micelial de *A. niger*, em resposta ao pareamento entre *A. niger* e *P. citrinum* em meio BDA..... p.45
- Tabela 4.** Diferença observada na área abaixo da curva de crescimento micelial de *Aspergillus niger*, quando pareado com *Penicillium citrinum* em diferentes intervalo de tempo.....p.46
- Tabela 5.** Quantificação de esporos de *Penicillium citrinum*, após incubação em tratamento com metabólitos..... p.60

LISTA DE QUADROS

- Quadro1.** Características químicas das amostras de solo coletadas nos municípios de Ourolândia (S1 Arenoso), Valente (S2 Médio-arenoso), Barrocas (S3 Médio-arenoso) e Mirangaba (S4 Argiloso). As análises foram realizadas pelo Departamento de Ciências do Solo da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, USP..... p.33

SUMÁRIO

Resumo

Abstract

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de quadros

INTRODUÇÃO.....	17
JUSTIFICATIVA.....	18
OBJETIVO GERAL E ESPECÍFICO.....	19
REVISÃO DE LITERATURA.....	19
1. Sisal.....	19
2. Podridão Vermelha do Sisal	22
3. Controle Biológico.....	24
4. Gênero <i>Penicillium</i> no controle biológico de doenças de plantas...	26
MATERIAL E MÉTODOS.....	27
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
CONCLUSÃO.....	60
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61

Anexos

INTRODUÇÃO

O cultivo do sisal (*Agave sisalana* Perrine) representa importante segmento econômico para o Nordeste brasileiro, com geração de renda e emprego em regiões do semiárido. O Brasil é o maior produtor mundial, sendo a região nordeste a única produtora nacional. Os estados produtores de sisal no Brasil são: Paraíba, Rio Grande do Norte e a Bahia, sendo o estado da Bahia responsável por aproximadamente 94% da produção nacional (SINDIFIBRAS, 2010; ADAB, 2010).

O desempenho da cultura do sisal, em estados como a Bahia e Paraíba, vem sofrendo queda de área plantada e produtividade, a podridão vermelha do caule de sisal constitui um dos fatores responsáveis pelo declínio desta cultura.

Esta patologia inviabiliza o desfibramento das folhas e causa a morte das plantas, ocasionando a destruição de extensas áreas de plantio de sisal. A prevalência desta doença na região semiárida da Bahia é de 100% e a incidência média varia de 5 a 35%, nas regiões de cultivo (ABREU, 2010). Dentre os sintomas característicos da doença tem-se o escurecimento dos tecidos internos do caule, que evolui para uma descoloração avermelhada dos tecidos e apodrecimento do caule. As plantas murcham e as folhas tornam-se amareladas. Devido ao apodrecimento do caule, a planta morre e tomba (LIMA, 1998).

O agente causal da podridão vermelha do sisal é o *Aspergillus niger*, um fungo mitosporico e saprófita ou parasita fraco. Este micro-organismo está naturalmente presente no solo, fato que dificulta seu controle por métodos mais usuais como o uso de agrotóxicos.

Assim, o controle biológico, por meio da introdução de micro-organismos antagonistas para o controle de patógenos veiculados ao solo, tem demonstrado ser uma alternativa viável e de baixo custo para a redução da população e do potencial de inóculo do patógeno, com conseqüente redução da incidência da doença (MICHEREFF, 2008).

Experimentos realizados no laboratório de Microbiologia Agrícola da UFRB têm demonstrado a inibição de *A. niger* por fungos como *Penicillium citrinum*, sugerindo assim, que este micro-organismo é um provável agente antagônico a este patógeno do sisal e potencial agente de controle biológico (Dados não publicados).

JUSTIFICATIVA

O sisal constitui-se em uma das poucas alternativas de produção agrícola em regiões do Nordeste brasileiro, nas quais o clima limita as possibilidades agrícolas. Sendo cultivado em larga escala pela agricultura familiar, o sisal tem uma enorme importância econômica e social, sendo a cadeia produtiva do sisal fundamental para evitar o êxodo rural nas regiões semiáridas. Considerando toda a cadeia produtiva gerada pela agaveicultura, a qual surge desde a manutenção de lavouras, extração da fibra até o beneficiamento desta, tal planta tem garantido a sobrevivência de um contingente aproximado de 800 mil pessoas, nas regiões em que é cultivada (CNA, 2010).

Embora seja uma atividade econômica relevante, a cultura sisaleira vem sofrendo um declínio contínuo ao longo dos últimos anos, com reduções significativas em área cultivada e produtividade do sisal. Além de fatores como: baixo índice de aproveitamento da planta de sisal (a fibra que é a parte extraída e comercializada representa apenas 4% da planta), a concorrência com as fibras sintéticas, problemas com o beneficiamento e comercialização da fibra, falta de tecnologia adequada para produção, problemas fitossanitários, como a podridão vermelha representa um dos principais fatores responsáveis pela queda na produção e área plantada de sisal (ALVES et al., 2004).

A podridão vermelha, doença que tem ameaçado a sustentabilidade da agaveicultura, pois apresenta grande capacidade destrutiva por causar a morte da planta e tornar as folhas inadequadas para o desfibramento. A definição de meios de combate a esta doença faz-se imprescindível para tornar possível a continuidade do cultivo de sisal. Neste sentido, o uso de micro-organismos antagonistas como *Penicillium citrinum*, para o controle biológico desta doença é uma alternativa promissora para a região semiárida do Nordeste brasileiro.

OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial de *Penicillium citrinum* para o controle da podridão vermelha do sisal.

OBJETIVO ESPECÍFICO

1. Estudar o antagonismo de *Penicillium citrinum* à *Aspergillus niger* por meio de ensaios *in vitro*;
2. Estudar o potencial de controle da podridão vermelha do sisal com *P. citrinum* em mudas de sisal, em condições de casa de vegetação;
3. Realizar teste de patogenicidade de *P. citrinum* em mudas de sisal;
4. Avaliar a sobrevivência e desenvolvimento populacional de *A. niger* e *P. citrinum* em solos do semiárido baiano;
5. Avaliar a supressão no solo de *A. niger* por *P. citrinum*;
6. Avaliar a eficiência dos metabólitos secundários de *P. citrinum* no controle de *A. niger*.

REVISÃO DE LITERATURA

1. Sisal

O sisal (*Agave sisalana* Perrine) é uma monocotiledônea, da série *Liliflorea*, família *Agavaceae*, subfamília *Agavoidea*, gênero *Agave*, subgênero *Euagave* (MEDINA, 1954). Planta nativa, provavelmente da península de Yucatan, México, esta *Agave* foi introduzida no Brasil por volta de 1903, pelo Comendador Horácio Urpia Júnior, difundindo-se inicialmente no estado da Paraíba e somente no final da década de 30 na Bahia (SUINAGA, SILVA e COUTINHO, 2008).

Dentre as características da planta pode-se citar: epiderme cutinizada, redução de estômatos, folhas rígidas, carnosas, suculentas e lisas, verde-lustrosas e pontiagudas, as quais crescem em torno de um bulbo central e podem atingir 1,5 metros de comprimento (MEDINA, 1954). O sisal é uma planta monocárpica e

floresce apenas uma vez, ao fim de seu ciclo vegetativo, emitindo o pendão, que os agricultores denominam de flecha (ALVES et al., 2004). Esta planta apresenta metabolismo fotossintético do tipo CAM (Metabolismo Ácido das Crassuláceas), seus estômatos abrem-se à noite, de forma a reduzir a perda de água por transpiração (BELTRÃO, 2006). Tais características tornam o sisal uma espécie semi-xerófila, adaptada à região semiárida, além de conferir uma barreira natural contra a infecção por micro-organismos, o que a torna resistente ao ataque de um grande número de pragas e doenças (SOUZA, 2010; COUTINHO et al., 2006).

No que tange as condições relevantes para o desenvolvimento do sisal, estão altitude entre 200 a 800 metros acima do nível do mar, temperatura média em torno de 20 a 28°C, precipitação pluvial entre 600 e 1.500 mm/ano e solos silicosos, sílico-argilosos, permeáveis, de fertilidade média, com pH em torno de 5,0 a 8,0 (SILVA, 1999; PROSSIGA, 2004).

As folhas de sisal dão origem a principal fibra dura produzida no mundo, a qual possui uma vasta gama de utilidades, como por exemplo, na confecção de: artesanatos, vassouras, sacos, bolsas, chapéus, barbantes, cordas, capachos e tapetes, bem como na fabricação de celulose para a produção de papel Kraft (de alta resistência) e outros tipos de papel fino (para cigarro, filtro, papel dielétrico, absorvente higiênico, fralda etc). Futuramente a fibra de sisal deverá ser utilizada na indústria automotiva, de móveis, de eletrodomésticos e geotêxteis (ALVES et al., 2004).

A agaveicultura é responsável por uma cadeia de serviços, a qual abrange desde a manutenção das lavouras, extração e processamento da fibra do sisal para o beneficiamento, até as atividades de industrialização de diversos produtos para uso com fins artesanais (SÁ, 2009).

O Brasil é o maior exportador de sisal do mundo, apresentando uma produção anual de aproximadamente 235 mil toneladas, que corresponde a mais de 50% da safra mundial (IBGE, 2011). A produção brasileira de sisal concentra-se na região Nordeste, em municípios dos estados da Bahia, Paraíba, Rio Grande do Norte e Ceará. Em 2011, no segundo bimestre, as exportações baianas do segmento de sisal e derivados tiveram um aumento de 13,7% em relação ao mesmo período do ano anterior, chegando aos US\$ 43 milhões (SEI, 2011).

A cultura do sisal é importante para a economia brasileira, por causa de sua capacidade de geração de renda em regiões semiáridas, nas quais o clima limita as

alternativas de produção econômica, sendo esta, uma planta adaptada às condições ambientais dessas regiões (ADAB, 2010). Tal cultura é um fator importante de sobrevivência para a população rural dessas áreas, pois necessita de grande volume de mão de obra, desde o processo produtivo até o beneficiamento e assim abre um mercado de trabalho que envolve aproximadamente 800 mil pessoas (CNA, 2010).

A região sisaleira comporta uma população de aproximadamente de 570.720 habitantes, dos quais 337.480 vivem na área rural, o que corresponde a 59,13% do total (PORTAL DA CIDADANIA, 2011).

No semiárido baiano, o território do sisal abrange uma área de 21.256,50 km², sendo composto por municípios, tais como: Araci, Candeal, Cansanção, Itiúba, Monte Santo, Nordestina, Queimadas, Quijingue, Serrinha, Teofilândia, Valente, Barrocas, Biritinga, Conceição do Coité, Ichu, Lamarão, Retirolândia, Santa Luz, São Domingos e Tucano (Figura 1).

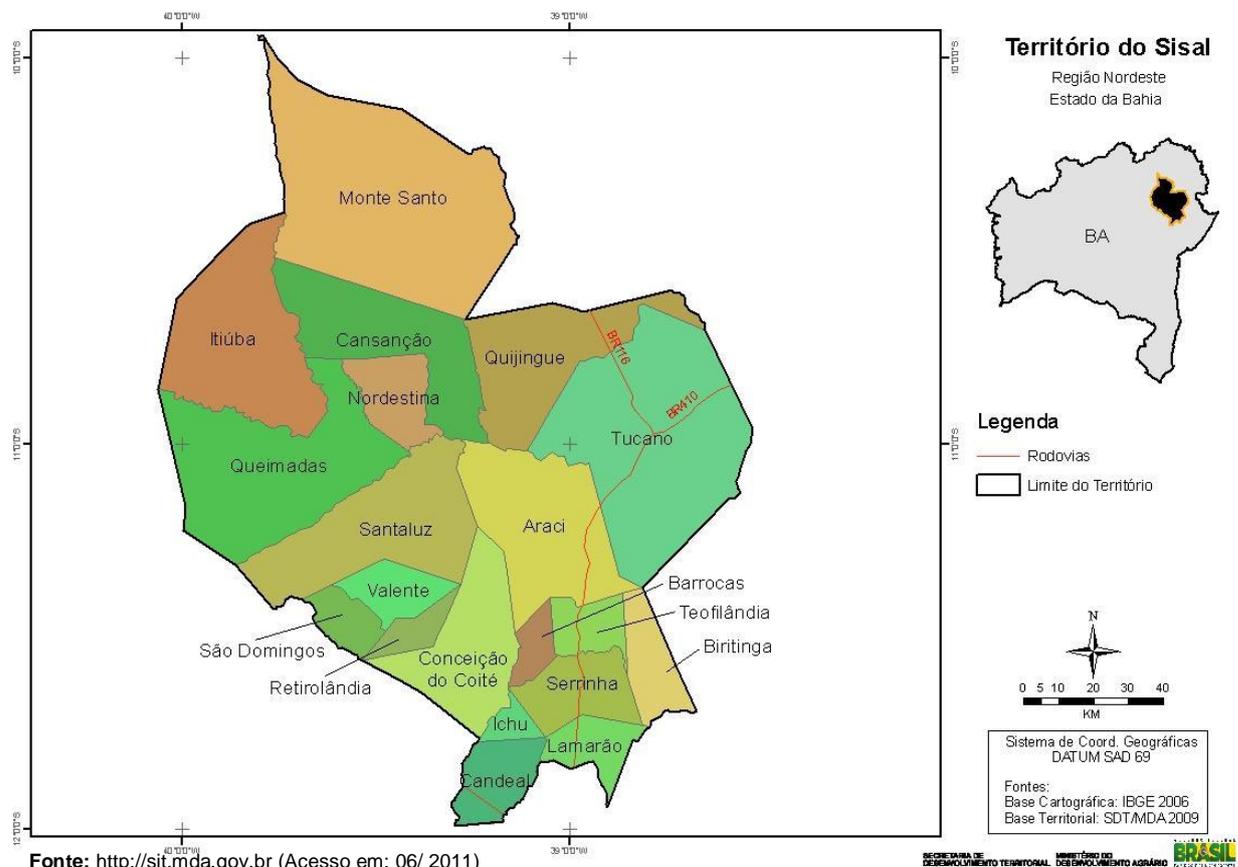


Figura 1. Território do Sisal na Bahia.

A Bahia é o principal estado produtor de sisal do território brasileiro, contribuindo com 94% da produção nacional (IDR, 2010). Neste estado, o sisal representa o segundo produto na pauta de exportação agrícola, tendo uma grande importância social por abranger um contingente de 150 mil famílias que encontram no sisal a única fonte de renda (SINDIFIBRAS, 2010; SILVA et al, 1999).

Embora tão relevante para a economia do país e principalmente economia baiana, o cultivo de sisal tem sofrido grande redução de produtividade e área plantada. Alguns dos fatores que limitam o setor sisaleiro são: práticas inadequadas de plantio, cortes indevidos das folhas, tratos culturais incorretos, uso de máquinas antiquadas no desfibramento, falta de material genético apropriado e problemas fitossanitários, os quais vêm causando crescente preocupação da sociedade (OASHI, 1999; SUINAGA et al., 2006; BATISTA, 2010).

2. Podridão vermelha do sisal

Dentre as doenças que incidem sobre o sisal, apenas duas foram relatadas até o presente no Brasil: a antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum agaves* (MEDINA, 1954), que não se constitui em problema fitossanitário de importância econômica, e a podridão vermelha do caule, ou simplesmente podridão do caule do sisal (LIMA et al., 1998; ABREU, 2010), a qual vem afetando, de maneira isolada, desde a década de 1970, os sisalais brasileiros, e que atingiu níveis críticos a partir de 1998. A incidência da doença demonstra-se variável entre as regiões de cultivo, sendo que em algumas, não ultrapassa 5% da área e, em outras, pode alcançar 40% de infestação (ALVES et al., 2004; ABREU, 2010).

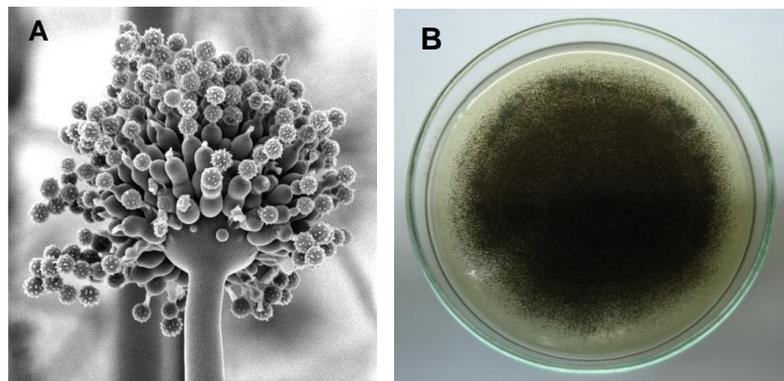
A podridão vermelha do sisal apresenta os seguintes sintomas: amarelecimento e murcha das folhas, com a descoloração avermelhada do caule até a base das folhas e posterior apodrecimento deste, causando o desprendimento do solo e morte da planta (Figura 2) (SÁ, 2009). As folhas murchas não servem para o desfibramento e comercialização da fibra. A doença afeta as plantas em todos os estados fenológicos, desde rebentos a plantas adultas (ADAB, 2010).



Fonte: Laboratório de Fitopatologia e Microbiologia Agrícola da UFRB, Cruz das Almas, Bahia.

Figura 2: Plantas de sisal com podridão vermelha. (A) Sintomas externos- amarelecimento e murcha das folhas; (B e C) Sintomas internos- descoloração avermelhada dos tecidos do caule e base das folhas.

O agente causal da podridão vermelha do sisal foi descrito como *Aspegillus niger* (Figura 3) (LIMA et al., 1998, SOARES et al., 2006) que é um fungo da ordem Moniliales, difundido em todas as regiões e comumente encontrado no solo (MORAES et al., 1997). Este micro-organismo é classificado como mitospórico e saprófita ou parasita fraco, por ser dependente de lesões de origem mecânica ou fisiológica e de condições ambientais adversas ao hospedeiro para iniciar o processo de infecção (LIMA et al, 1998).



Fonte: (A) <http://micologiaeasd.blogspot.com/2010/10/aspergillus.html>. (B) Lab. de Fitopatologia e Microbiologia Agrícola da UFRB, Cruz das Almas, BA.

Figura 3. *Aspergillus niger* (A) Conidióforo de *A. niger*; (B) Cultura de *A. niger* em placa de Petri com meio de cultivo Ágar Batata Dextrose.

A. niger não consegue penetrar em tecidos não injuriados do hospedeiro (SÁ, 2009; WALLACE e DIEKMAHNS, 1952; LOCK, 1962; LIMA et al., 1998). São necessárias lesões mecânicas ou fisiológicas, ferimentos causados na base das

folhas e no caule, pó instrumentos utilizados para a realização de tratos culturais, como capinas, desbaste de touceiras ou mesmo a retirada de filhotes da planta-mãe, como vias de penetração para tais patógenos (SUINAGA, 2006).

3. Controle Biológico

Considerando a importância sócio-econômica da fibra de sisal, torna-se imprescindível o desenvolvimento de métodos de controle da podridão vermelha do sisal (SÁ, 2009).

Segundo Whetzel et al. (1925, citado por BERGAMIN et al, 1995), controle é a prevenção dos prejuízos de uma doença. Dentre as estratégias de controle de doenças, o uso de agrotóxicos, constitui-se numa das práticas mais difundida atualmente, em virtude de sua eficiência e da elevada produtividade que proporcionam. No entanto, esses químicos contaminam: a comunidade microbiana no solo, à água, a vegetação, o homem, os animais. Além de provocar degradação ambiental por meio do acúmulo dessas substâncias na cadeia alimentar e ocasionar forte pressão de seleção que acarreta no surgimento de micro-organismos resistentes (FRANCESCHINI et al., 2001).

São poucos os registros de produtos químicos quando se trata de patologias relacionadas a fungos que habitam o solo. Outro fator que caracteriza a dificuldade de controle dessas doenças é que os micro-organismos envolvidos possuem mecanismos especiais de sobrevivência e podem permanecer bastante tempo viáveis no solo (AZEVEDO, 2004).

Em meio às estratégias de combate à podridão do caule do sisal, o controle biológico faz-se uma alternativa viável, de baixo custo e menos prejudicial ao meio ambiente quando comparado ao controle químico. O termo controle biológico refere-se:

[...] a redução da densidade de inóculo ou das atividades determinantes da doença, esta provocada por um patógeno ou parasita nos seus estados de atividade ou dormência, por um ou mais organismos, realizada naturalmente ou através da manipulação do ambiente, hospedeiro ou antagonista, ou pela introdução em massa de um ou mais antagonistas (BAKER E COOK, p. 718, 1974; citado por BERGAMIN et al, 1995).

Neste contexto, antagonistas naturais encontrados no ambiente podem ser utilizados para reduzir a população do patógeno, de forma a diminuir a fonte de

inóculo e infecção para os hospedeiros, ocasionando ainda, menos prejuízos ambientais, em comparação aos métodos químicos (GIROTTI et al, 2008). Segundo Michereff (2008), antagonistas ou agentes de controle biológico podem afetar os processos vitais do patógeno e são espécies ou raças apatogênicas que se adaptam às mesmas condições ambientais do patógeno.

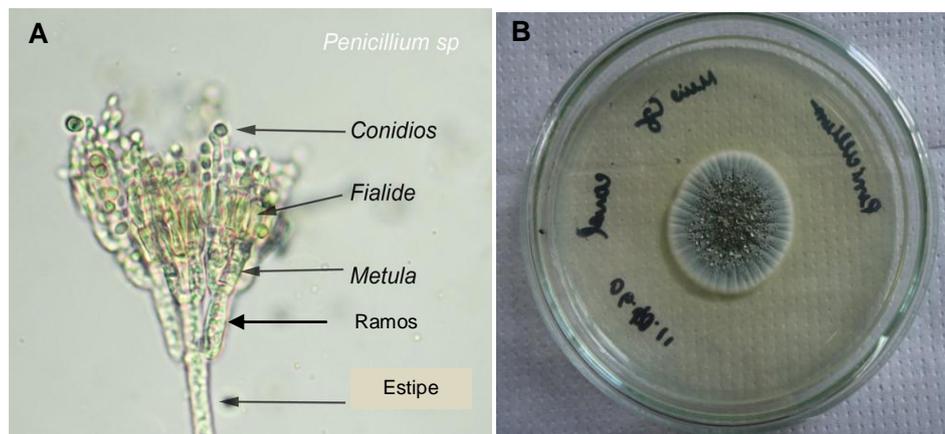
Dentre os mecanismos básicos de antagonismo, temos: a antibiose, na qual metabólitos secretados pelo antagonista afetam negativamente o patógeno, inibindo-o; a competição, quando os micro-organismos competem entre si por recursos do ambiente; o parasitismo, onde um dos organismos se nutre do outro, atacando assim suas estruturas; a hipovirulência, que funciona por meio da transmissão de caracteres de uma linhagem do patógeno menos agressiva para uma causadora de doenças; a predação, na qual o antagonista usa o patógeno e outros organismos como fonte de alimento e a indução de resistência, quando a introdução do antagonista (não-patogênico, ou linhagem fraca/ avirulenta do patógeno) ou de seus metabólitos provoca o desenvolvimento de defesa no hospedeiro (MICHEREFF, 2008).

Dentre os exemplos de micro-organismos utilizados para controle biológico no Brasil, tem-se o fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (controle de insetos da cana de açúcar e soja), *Trichoderma* spp. (controle da vassoura de bruxa na cultura do cacau), *Acremonium* spp. (com aplicação na lixa do coqueiro), além de bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas* (NETO, 2002; BETTIOL, 2009).

Em trabalhos realizados no laboratório de Microbiologia Agrícola da UFRB, com o objetivo de isolar *A. niger* à partir de plantas de sisal com sintomas da podridão vermelha, várias plantas de sisal apresentaram o crescimento exclusivo de *Penicillium* sp., quando pedaços dos tecidos das plantas foram desinfestados e colocados em placas de Petri com meio de cultivo ágar batata dextrose (Dados não publicados). Sugerindo assim, a hipótese de que *Penicillium* sp. fosse também o agente causal da doença ou que ele atuasse em sinergia com o *A. niger*, amplificando a severidade da doença ou que inibisse o crescimento de *A. niger*, sendo nesta última situação um micro-organismo antagônico ao patógeno e potencial agente de controle biológico.

4. Gênero *Penicillium* no controle biológico de doenças de plantas

Penicillium spp. apresenta-se como um grupo de fungos, em maioria filamentosos, encontrados comumente na vegetação em decomposição, no solo e no ar (Figura 4) (SAMSON e FRISVAD, 2011; MEMBRILLERA, 1950). Estes microorganismos pertencem ao filo Ascomycota, subfilo Pezizomycotina, classe Eurotiomycetes e a ordem Eurotiales (NCBI, 2010; PALLU, 2010).



Fonte: (A) <http://flickr.com/photos/r-rico/collections>. (B) Cultura de *Penicillium citrinum*, Lab. de Fitopatologia e Microbiologia Agrícola da UFRB, Cruz das Almas, BA.

Figura 4: *Penicillium citrinum* (A) Estruturas de *Penicillium* sp.; (B) Cultivo em placa de Petri com meio de cultivo BDA.

Este gênero de fungos divide-se em quatro subgêneros: *Aspergilloides*, *Penicillium*, *Biverticillium* e *Furcatum*, os quais diferem entre si por meio de características como: o número de verticilos (pontos de ramificação) entre a fiálide e o estipe; forma e tamanho das fiálides; tamanho, cor e ornamentação dos conídios; textura da estipe, ramos e métulas (PITT, 1998, citado por CARDOSO et al, 2007; SERRA, 2005).

Fungos deste gênero são bastante conhecidos pela capacidade de produzir uma grande variedade de metabólitos secundários biologicamente ativos, como por exemplo: alcalóides, terpenóides, peptídeos, dentre outros e também enzimas extracelulares, como as pectinases, utilizadas na indústria de suco de laranja (SARGO, 2009; GRASSIN, 1996, citado por CARDOSO et al, 2007). Estas substâncias podem ser aplicadas em diversos setores da ciência, como o controle biológico, fonte de fármacos, antiparasíticos, antibióticos e imunossupressores (ALECRIM, 2007).

Como exemplo mais difundido desses antibióticos, tem-se, a penicilina, substância descoberta acidentalmente em 1928 por Alexander Fleming, a qual foi isolada do *Penicillium notatum* e atualmente possui notável importância para a indústria médica e farmacêutica, por causa de sua importante ação no combate a diversos agentes infecciosos (FERRARONI e GRUMACH, 2006).

Espécies do gênero *Penicillium* têm sido relatadas em alguns estudos como importantes agentes de biocontrole, tais como: *Penicillium* spp. que apresentou antagonismo contra o fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, causador do mofo branco em pepineiros (ETHUR et al., 2005), *Penicillium pinophilum*, antagonista à *Rhizoctonia solani*, fungo patógeno (STEFANO et al., 1999), *Penicillium striatisporum* afetou significativamente o crescimento micelial de *Phytophthora* spp., *Cladosporium cucumerium* e *Sclerotinia sclerotiorum* (MA, 2008), *Penicillium oxalicum* mostrou efeito antagônico à *Alternaria alternata*, fungo patogênico à cultura do arroz, micoparasitando-o e desintegrando conídios e conidióforos (SEMPERE e SANTAMARINA, 2010). *Penicillium citrinum* apresentou notável atividade antimicrobiana *in vitro* e *in vivo* frente à *Phytophthora palmivora*, agente causal da podridão parda do cacauzeiro (BASTOS, 1987). Sequeira et al. (2009) se depararam com a atividade antimicrobiana de *Penicillium* spp. contra bactérias como, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, e *Staphylococcus aureus*.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Fitopatologia e Microbiologia Agrícola da UFRB e em estufa agrícola do Centro de Ciências Agrárias Ambientais e Biológicas, campus de Cruz das Almas.

Obtenção dos isolados

O isolado de *Penicillium* spp. (PSPP) foi obtido a partir de experimentos anteriores, que objetivavam isolar fungos do gênero *Aspergillus* a partir de plantas de sisal com sintomas de podridão vermelha, no quais, diversas vezes observou-se o crescimento exclusivo de *Penicillium* spp. O isolado de *Aspergillus* foi adquirido da mesma maneira conforme citado anteriormente, entretanto este, já havia sido previamente identificado como *Aspergillus niger* (dados não publicados).

Identificação morfológica do isolado de *Penicillium* sp. em nível de espécie

A identificação por meio de técnicas morfológicas foi realizada pela bióloga Michelle Ferreira Terra, doutoranda em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais.

Penicillium sp. foi repicado para meios e temperaturas padronizados sendo os seguintes: Czapek Yeast Autolysate (CYA) a 25°C e 37°C; e Extrato de malte ágar (MEA) a 25°C (Anexo 1). Após sete dias foram avaliadas as características macroscópicas das colônias e as microscópicas por meio de confecção de lâminas para observação em microscópio. As estruturas microscópicas foram medidas com auxílio de um microscópio óptico com régua na ocular, na objetiva de imersão (100X). Apenas o comprimento do conidióforo foi medido na objetiva 10X.

Para cada colônia, foram analisadas as seguintes características macroscópicas: diâmetro médio da colônia; cor da colônia e do micélio; presença/ausência de exsudatos e cor do reverso da colônia. Em relação às características microscópicas, observou-se: o tipo de ramificação (monoverticilado/ biverticilado/ tetraverticilado ou poliverticilado); comprimento, largura e textura dos conidióforos; comprimento e textura da ramificação, da métula, das fiáides e dos conídios (SAMSON e FRISVAD, 2004; OLIVEIRA, 2007).

Para a descrição morfológica do isolado de *Penicillium* sp., utilizou-se uma ficha específica para gênero, tendo como base Pitt (2000) (Anexo 2).

Identificação molecular do isolado de *Penicillium* sp. em nível de espécie

O isolado de *Penicillium* sp. foi também identificado ao nível de espécie, por meio de técnicas moleculares, pelo Dr. Ricardo Harakava, do Laboratório de Bioquímica Fitopatológica, no Instituto Biológico de São Paulo.

Para a extração do DNA genômico do fungo, o micélio, crescido em meio BDA por aproximadamente sete dias, foi congelado com N₂ líquido e triturado em microtubo com auxílio de pistilo de plástico. Após a trituração, o DNA foi extraído por meio do método que emprega CTAB, descrito por Ausubel et al. (1997).

Seguiu-se então à amplificação da região ITS (*Internal Transcribed Spacer*) do rDNA, por meio de reação em cadeia pela polimerase (PCR) realizada com os oligonucleotídeos iniciadores ITS1 (5' – TCCGTAGGTGAACCTGCGG – 3') e ITS4

(5' – TCCTCCGCTTATTGATATGC – 3') (WHITE et al., 1990). O programa do termociclador para a PCR constou de: 94 °C/2 min, 40x 94 °C/30 s – 54 °C/30 s – 72 °C/40 s, 72 °C/4 min.

O produto de PCR foi purificado e submetido ao seqüenciamento pelo método de terminação de cadeia com o reagente BigDye 3.1 (Applied Biosystems) no sequenciador automático ABI3500 (Applied Biosystems).

As seqüências obtidas foram submetidas ao programa Blastn para comparação com as seqüências depositadas no GenBank-NCBI (*National Center for Biotechnology Information*).

O alinhamento múltiplo foi feito com o programa MEGA versão 5.05 (TAMURA et al., 2007). O mesmo programa foi usado para gerar uma árvore filogenética Neighbor-Joining, modelo evolutivo Jukes-Cantor (JUKES, CANTOR, 1969).

Antagonismo entre *Penicillium citrinum* e *Aspergillus niger* em dois meios de cultura: Czapeck Yest Agar e Ágar Batata Dextrose

Isolados de *P. citrinum* e *A. niger* obtidos de plantas de sisal na região semiárida da Bahia e mantidos na coleção de micro-organismos do Laboratório de Microbiologia Agrícola da UFRB foram cultivados por aproximadamente sete dias em placa de Petri contendo meio BDA (Ágar Batata Dextrose). Em seguida, com auxílio de uma agulha descartável (calibre 22G, 0,7mm X 25mm) porções de micélio e esporos da borda da colônia de cada um dos fungos foram transferidas para placas de Petri contendo meio de cultivo BDA e placas contendo meio Czapek Yest Agar (CYA) (Anexo 1), sendo as culturas pareadas da seguinte forma: esporos e micélio de *P. citrinum* foram colocados em um lado da placa, à 1,5 cm da borda e esporos e micélio de *A. niger* foram colocados no lado oposto da placa, também a 1,5 cm da borda (Figura 5). As placas foram incubadas em temperatura ambiente (28±2°C).

Os tratamentos consistiram de diferentes intervalos de tempo (0, 24, 48, 72 horas) entre a repicagem de *P. citrinum* e *A. niger* nas placas de Petri, sendo que *P. citrinum* foi previamente colocado em todas as placas. Os controles negativos consistiram da repicagem apenas de *A. niger* na lateral das placas nos respectivos intervalos de tempo. A partir do quinto dia de incubação, foi medido o tamanho da colônia de *A. niger*, por meio da medição da distância do centro da colônia de *A.*

niger à sua extremidade voltada para o centro da placa, durante um período de 18 dias, sendo que as medições realizadas em intervalos de três dias.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 10 repetições por tratamento.

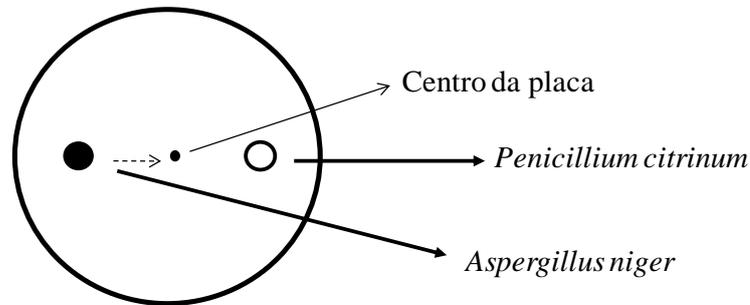


Figura 5. Esquema de pareamento entre *Aspergillus niger* e *Penicillium citrinum* em placa de Petri.

Para a análise dos dados calculou-se a porcentagem de inibição do crescimento micelial, utilizando-se a seguinte fórmula: $\text{Pinib} = [(\text{Rtest} - \text{Rtrat}) / \text{Rtest}] \times 100$, onde: Pinib = Porcentagem de inibição; Rtest = crescimento radial testemunha; Rtrat = crescimento radial tratamento (MENTEN et al., 1976). Para calcular a área abaixo da curva de crescimento micelial utilizou-se a fórmula descrita por Shaner e Finney (1977).

Os dados foram submetidos à análise de variância e a comparação entre os tratamentos e a testemunha foi feita pelo teste de Tukey e teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis a 5% de probabilidade.

Antagonismo entre *Penicillium citrinum* e *Aspergillus niger* em discos de sisal

Foram extraídos segmentos de tecido de caule de sisal, em forma de discos de 1,7 cm de diâmetro e 0,5 cm de altura. Esses discos foram lavados e desinfestados em álcool 70% durante cinco minutos e hipoclorito de sódio 1% durante cinco minutos, seguidos de três lavagens em água destilada esterilizada. Posteriormente, cada disco de caule foi colocado em recipientes de plástico, descartáveis (capacidade de 100 mL), contendo no fundo, papel de filtro esterilizado e foi pulverizado com 2,5 mL de uma suspensão de esporos de *P. citrinum* na concentração de 10^7 esporos.mL⁻¹. Os tratamentos consistiram na inoculação com

A. niger com uma suspensão de esporos na mesma concentração que *P. citrinum*, em diferentes intervalos de tempo (0, 24, 48, 72 horas) entre a pulverização de *P. citrinum* e com *A. niger* nos discos de caule.

O tratamento controle negativo consistiu da aplicação apenas da suspensão de *A. niger* e o controle positivo da aplicação de água destilada esterilizada.

A avaliação do antagonismo foi realizada cinco dias após a inoculação com *A. niger*, por meio da observação da presença ou ausência do crescimento e esporulação de *A. niger*, nos discos de caule. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com cinco repetições.

Colonização de mudas de sisal pelo fungo *Penicillium citrinum*

Mudas de sisal foram lesionadas na região do caule (quatro furos eqüidistantes, com 2 mm de profundidade, padronizados com uma agulha de seringa) e inoculadas, com o auxílio de um borrifador, com 2mL por muda, da suspensão de esporos de *P. citrinum* na concentração 10^7 esporos mL⁻¹. Em seguida, as mudas foram plantadas em sacos de muda de polietileno, contendo 1 litro de solo e foram mantidas na estufa agrícola do Laboratório de Microbiologia Agrícola da UFRB. O controle positivo consistiu da aplicação de água destilada.

Para avaliar a colonização de *P. citrinum* no tecido da planta, foram realizadas amostragens destrutivas, retirando-se a planta, cortando-se transversalmente o caule (0,5 cm acima do ponto da lesão) e cortando pedaços da raiz. Os pedaços de tecido foram desinfestados com álcool 70 % (2 minutos) e hipoclorito de sódio 1 % (2 minutos), com posterior lavagem em água esterilizada (três lavagens) e os fragmentos de tecido (10 fragmentos de cada parte da planta) foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultivo BDA salino (6% de NaCl) com 1 mL . L⁻¹ de Tormicina (bactericida). As avaliações ocorreram durante 10 dias, sendo coletadas duas plantas de cada tratamento em intervalos de cinco dias.

A avaliação da colonização pelo fungo foi feita com base na contagem do número de fragmentos de raiz e de caule de sisal com crescimento micelial de *P. citrinum*, sendo determinada a freqüência de fragmentos colonizados pelo fungo (fragmentos colonizados em relação ao número total de fragmentos analisados). Os respectivos dados foram submetidos ao teste F a 5% de probabilidade e análise de variância, utilizando-se o software Sisvar.

Controle da podridão vermelha por *Penicillium citrinum* em mudas de sisal

Mudas de sisal foram lesionadas na região do caule (quatro furos padronizados) e inoculadas com *P. citrinum* por meio de pulverização de suspensão de esporos na concentração 10^7 conídios.mL⁻¹. Posteriormente, as respectivas mudas foram inoculadas com *A. niger* da mesma forma e com a mesma concentração de inóculo de *P. citrinum*, mas em intervalos de tempo de 0, 24, 48 e 72 horas após a inoculação com *P. citrinum*. O tratamento controle positivo consistiu na aplicação de água destilada e o controle negativo consistiu da inoculação apenas por *A. niger*.

A avaliação da severidade da doença foi realizada após 18 dias da inoculação com *A. niger*, com a escala de notas proposta por Sá (2009), em que: (0) sem sintoma, (1) sintoma inicial, (2) sintoma avançado e (3) planta morta (Figura 6).

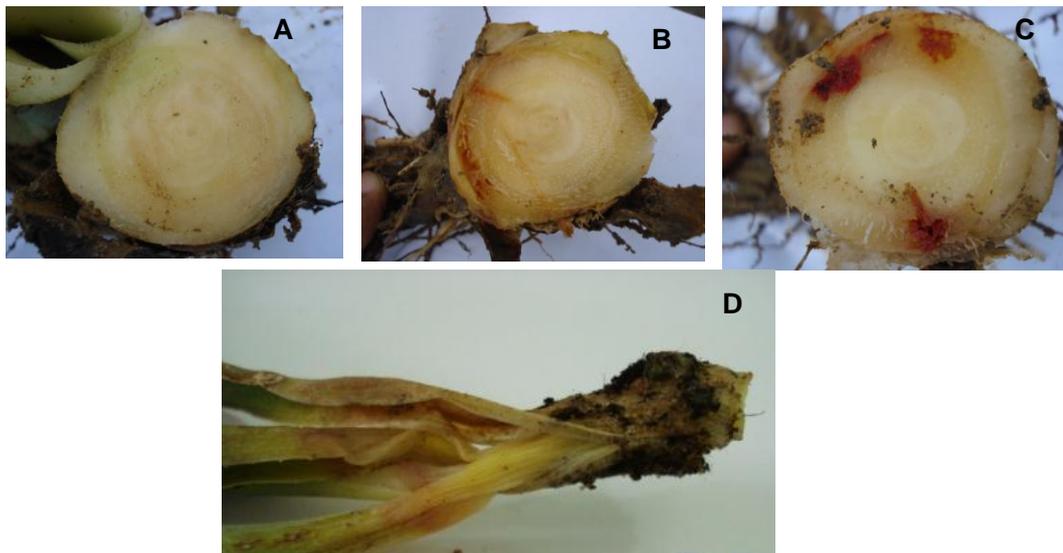


Figura 6: Escala de notas: (A) Planta sadia nota 0; (B) Sintoma inicial nota 1; (C) Sintoma avançado nota 2 e (D) Planta morta nota 3.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 25 repetições. As notas obtidas foram submetidas à uma análise de variância não-paramétrica, o teste de Kruskal-Wallis a 5% de probabilidade, com o software estatístico action 2.0.

Sobrevivência de *Aspergillus niger* em diferentes solos da região produtora de sisal do semiárido baiano

Quatro amostras de diferentes solos de áreas produtoras de sisal dos municípios de Ourolândia, Valente, Barrocas e Mirangaba (Quadro 1) foram coletadas na camada arável (0 a 20 cm de profundidade), próximo as raízes de sisal. Do solo coletado, foram retiradas amostras de 60 gramas, sendo estas acondicionadas em recipientes de plástico, descartáveis, com capacidade para 100 mL.

Quadro1. Características químicas das amostras de solo coletadas nos municípios de Ourolândia (S1 Arenoso), Valente (S2 Médio-arenoso), Barrocas (S3 Médio-arenoso) e Mirangaba (S4 Argiloso). As análises foram realizadas pelo Departamento de Ciências do Solo da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, USP.

Macronutrientes										
Solos	pH	M.O	P	K	Ca	Mg	H+Al	SB	CTC	V
S1(Arenoso)	7,7	29	82	2,1	262	49	8	322,2	329,7	98
S2(M-arenoso)	5,6	14	6	2,8	19	9	13	30,0	42,5	70
S3(M-arenoso)	4,7	24	4	1,5	25	12	28	37,7	65,7	57
S4(Argiloso)	7,4	56	16	4,1	352	26	9	381,8	391,3	98

Micronutrientes							
Solos	B	Cu	Fe	Mn	Zn	Na	Si
S1(Arenoso)	0,41	0,6	4	18,5	1,94	7,0	6,2
S2(M-arenoso)	0,11	0,2	13	21,5	0,48	15,0	5,6
S3(M-arenoso)	0,47	0,3	74	22,6	0,54	64,0	5,5
S4(Argiloso)	0,97	1,0	8	48,0	1,84	18,0	23,2

Unidades: M.O. ($\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$); P ($\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$); K, Ca, Mg, H+Al, SB e T ($\text{mmolc}\cdot\text{dm}^{-3}$); V %. B; Cu, Fe, Mn, Zn, Na e Si ($\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$). Métodos: pH em CaCl_2 (acidez ativa) - CaCl_2 0,01 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; M.O.- Dicromato/Colorimétrico; Fósforo, Potássio, Cálcio e Magnésio - Resina trocadora de íons; H+Al (acidez potencial) - pH SMP; Boro - água quente/microondas; Cu, Fe, Mn e Zn - extração DTPA - TEA em pH 7,3; Na - extração duplo ácido; Si - extração CaCl_2 0,01 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

Foram adicionados ao solo, em cada recipiente, 3 mL de suspensão de esporos de *A. niger* na concentração de 10^7 conídios. mL^{-1} , utilizando-se uma micropipeta de 1 mL, exceto no tratamento controle que recebeu 3 mL de água

destilada esterilizada. Durante a aplicação do inóculo de *A. niger*, as subamostras de solo foram reviradas várias vezes com auxílio de uma espátula, para homogeneização do inóculo. Os ensaios foram incubados em BOD a 30 ± 2 °C.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três repetições. As avaliações foram realizadas em intervalos de sete dias, com retirada de subamostras de 10 g de solo. Para a quantificação do *A. niger* no solo, utilizou-se a metodologia de diluição seriada em solução salina (0,85% NaCl) e plaqueamento em meio de cultivo BDA salino com 1 mL.L^{-1} de Tormicina. As placas foram incubadas a temperatura ambiente por um período de três dias e, após a incubação, procedeu-se à contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) de *A. niger* e os cálculos de UFC/g de solo, utilizando-se a seguinte fórmula: $N = (NC \times FD \times FC)/10$, sendo N – número de UFC/g de solo; NC – média da contagem de colônias; FD – fator de diluição; FC – fator de correção em relação ao volume plaqueado.

Durante o ensaio, para manter a mesma umidade do solo em todos os tratamentos, de forma que a umidade não se constituísse em mais um fator de interferência na sobrevivência do fungo, fez-se a reposição de água periodicamente, com base na pesagem dos recipientes incubados com solo infestado e a adição de água destilada esterilizada até a obtenção do peso inicial (peso dos recipientes no momento da incubação).

Sobrevivência de *Penicillium citrinum* em diferentes solos da região produtora de sisal do semiárido baiano

Foram utilizadas as quatro amostras de solo descritas anteriormente. Subamostras de 60 g de solo foram colocadas em recipientes de plástico descartáveis e infestadas com *P. citrinum*, conforme descrito acima para a sobrevivência de *A. niger*. As amostras foram posteriormente incubadas em BOD a 30 ± 2 °C. A umidade do solo foi mantida, também como descrito acima.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três repetições. As avaliações foram realizadas em intervalos de cinco dias com retirada de subamostras de 10 g de solo, conforme descrito acima.

Supressão de *Aspergillus niger* por *Penicillium citrinum* no solo

Para se avaliar a supressão de *A. niger* por *P. citrinum* no solo, quatro amostras de solo dos municípios de Ourolândia, Valente, Barrocas e Mirangaba foram coletadas na camada arável (0 a 20 cm de profundidade), próximo as raízes de sisal. As amostras de solo foram separadas em subamostras de 60 g e colocadas em recipientes de plástico, descartáveis.

Os tratamentos consistiram da adição de 3 mL suspensão de esporos na concentração 2×10^7 esporos.mL⁻¹, sendo 1,5 mL de suspensão de esporos de *A. niger* e 1,5 mL de suspensão de *P. citrinum*, em cada recipiente com 60 g de solo, exceto no tratamento controle que recebeu 3 mL de água destilada esterilizada. Os solos foram incubados em BOD a 30 ± 2 °C. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três repetições. A umidade do solo foi mantida, conforme descrito acima. As avaliações foram realizadas em intervalos de sete dias com retirada de subamostras de 10 g de solo. A quantificação da UFC.g de solo foi realizada conforme descrito acima.

Efeito de metabólitos secundários de *Penicillium citrinum* sobre *Aspergillus niger*

Penicillium citrinum foi multiplicado em frascos de Erlenmeyer com 200 mL de meio líquido CYA (Anexo 1) e incubado a temperatura ambiente 28 ± 2 °C, em mesa agitadora orbital (120 rpm), durante sete dias. Após a incubação, a cultura de *P. citrinum* em meio líquido, contendo os metabólitos e micélio do fungo, foi filtrada, utilizando-se um funil de vidro e papel filtro qualitativo (8 µm). Para retirar as células fúngicas restantes, o líquido filtrado foi centrifugado à 2265 g (3400 rpm) por 30 minutos e o sobrenadante recolhido. Objetivando eliminar possíveis esporos fúngicos restantes, o sobrenadante foi filtrado, utilizando-se o sistema de filtragem a vácuo (Cadinho de GOOCH com placa filtrante de vidro sinterizado nº 4 (10 µm), com um kitassato (500 mL) esterilizado e bomba de vácuo. Após este procedimento, restou apenas o meio líquido com os metabólitos produzidos pelo fungo.

Para avaliar a inibição da germinação de esporos de *A. niger* por metabólitos de *P. citrinum*, adicionaram-se 150 µL de suspensão de esporos de *A. niger* na

concentração 10^6 conídios.mL⁻¹ e 150 µL do meio contendo o metabólito em 6 poços de uma placa de ELISA, sendo esta vedada com filme PVC e incubada a temperatura ambiente. O tratamento controle consistiu do meio líquido sem o crescimento de *P. citrinum*. A avaliação ocorreu por meio da observação e contagem aleatória de 200 esporos, após a adição de uma gota de lactofenol azul, em todos os tratamentos, para paralisar a germinação de esporos. A adição do lactofenol azul ocorreu no momento em que o tratamento controle possuía 70% de esporos germinados, o que ocorreria após aproximadamente 14 horas. Considerou-se como esporo germinado aquele cujo tubo germinativo tenha comprimento superior ao dobro do diâmetro do esporo. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com seis repetições.

Para avaliar a inibição do crescimento micelial de *A. niger* por metabólitos de *P. citrinum*, o meio líquido CYA, contendo o(s) metabólito(s) foi adicionado ao meio BDA (Ágar Batata Dextrose) fundente, no momento de verte-lo em placas de Petri, para obtenção da concentração final de 0, 25, 50, 75% v/v, sendo o meio agitado e vertido nas placas de Petri, conforme descrito em SOARES et al., (2006). Os tratamentos controle consistiram da adição do meio CYA e do meio batata dextrose, sem o crescimento de *P. citrinum* e sem filtração e centrifugação, nas mesmas concentrações utilizadas nos demais tratamentos. Após 24 horas de solidificação do meio de cultura, adicionou-se um disco da cultura de *A. niger* (crescido em BDA por aproximadamente sete dias) no centro da placa. O diâmetro da colônia foi medida a cada dois dias, com auxílio de uma régua, até a colônia do tratamento controle (meio BDA sem adição de metabólitos de *P. citrinum*) atingir as bordas da placa de Petri. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com cinco repetições. Ao final das medições do diâmetro das colônias, para cada cultura fungica, foram adicionados 25 mL de água destilada esterilizada e duas gota de Tween 20 na placa e a cultura foi raspada com uma alça de Drigalsky esterilizada por flambagem. A suspensão obtida foi filtrada em gase esterilizada e a concentração de esporos determinada por contagem em câmara de Neubauer, com auxílio de um microscópio ótico com aumento de 40 X, para determinação da produção de esporos por diâmetro de colônia. A avaliação do crescimento micelial foi feita por meio do cálculo do Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM) = $\sum(D - D_a)/N$ (onde D = diâmetro atual da colônia, D_a = diâmetro da colônia do dia anterior, N = número de dias após a inoculação) (OLIVEIRA, 1991).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Identificação morfológica do isolado de *Penicillium* sp. em nível de espécie

Não houve crescimento do isolado de *Penicillium* em meio de cultivo CYA (Czapek Yest Agar) a 37°C. Enquanto que, em meio de cultivo CYA a 25°C, após sete dias de cultivo, a colônia obteve diâmetro médio de 21 mm, com uma coloração verde azulada e levemente sulcada, sendo que o micélio apresentou coloração branca. Havia grande quantidade de exsudatos presentes, os quais possuíam coloração incolor, sendo o reverso da colônia de coloração amarela (Figura 7).

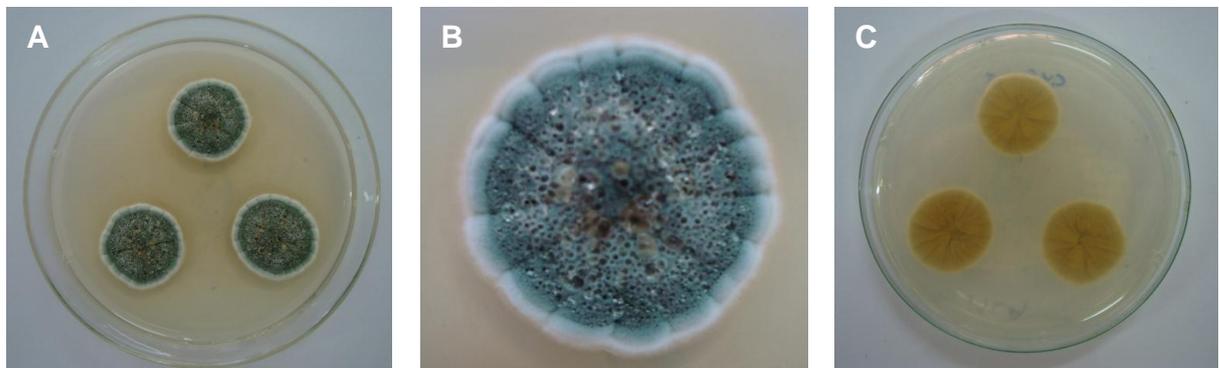


Figura 7. Colônia de *Penicillium citrinum*, cultivada em meio CYA, a 25° C. **(A)** Colônias em três pontos equidistantes da placa, **(B)** Colônia, mostrando presença de exsudatos e **(C)** Reverso da colônia, amarelado.

Já em meio MEA (Ágar extrato de malte), a colônia do isolado de *Penicillium*, apresentou diâmetro médio de 19 mm, com coloração verde-acizentado, micélio de cor branca e reverso da colônia amarelo.

Em relação às características microscópicas, o isolado foi classificado como biverticilado, possuindo conidióforos finamente rugosos. Métulas e fiálides finamente rugosas, com um comprimento médio de 16 μm e 9 μm , respectivamente. Os conídios possuíam aproximadamente 2 μm de diâmetro médio e foram caracterizados como lisos e esféricos (Figura 8).



Figura 8. Micrografia do isolado de *Penicillium citrinum*.

Com base em Pitt (2000) e nos dados obtidos, o isolado em questão foi identificado como pertencente à espécie de *Penicillium citrinum*.

Identificação molecular do isolado de *Penicillium* sp. em nível de espécie

O sequenciamento da região ITS do isolado de *Penicillium* sp., resultou em uma sequência com 428 pares de base, a qual foi utilizada como *query* para realização de uma busca por sequências homólogas na base de dados National Center for Biotechnology Information (NCBI), usando o do programa BLASTN (ALTSCHUL et al., 1997). Um total de 36 sequências foram recuperadas, destas, 24 foram excluídas das análises posteriores por se tratarem de sequências incompletas ou redundantes (Anexo 3). As 12 sequências restantes foram utilizadas para fazer um alinhamento múltiplo, o qual foi editado e então utilizado para gerar a árvore filogenética (Figura 9).

Na árvore filogenética é possível distinguir três grupos: Grupo I formado por espécies de *Penicillium westlingii*, *Penicillium sartoryi*, *Penicillium citrinum* e *Penicillium griseofulvum* e também o isolado *Penicillium* sp. PSPP; o Grupo II também formado por espécies do gênero *Penicillium*, como: *Penicillium steckii*, *Penicillium roseopurpureum*, *Penicillium sumatrense*, *Penicillium meleagrinum* var. *viridiflavum* e *Eupenicillium tropicum*.; e o grupo III formado por espécies do gênero *Aspergillus*, que foram utilizadas para enraizar a árvore (Figura 9).

Como pode ser observado o isolado de *Penicillium* sp. PSPP, agrupou junto com as espécies do gênero *Penicillium*, dentre as quais encontra-se *Penicillium citrinum* (Figura 9). Entretanto neste grupo as relações de ancestralidade entre as espécies não estão bem resolvidas. Isso indica que a região ITS, utilizada para a reconstrução filogenética, não foi suficiente para definir a relação entre as espécies. Para contornar esse problema uma análise combinada, utilizando a região ITS e outros genes, poderia ser utilizada para identificação do isolado em questão.

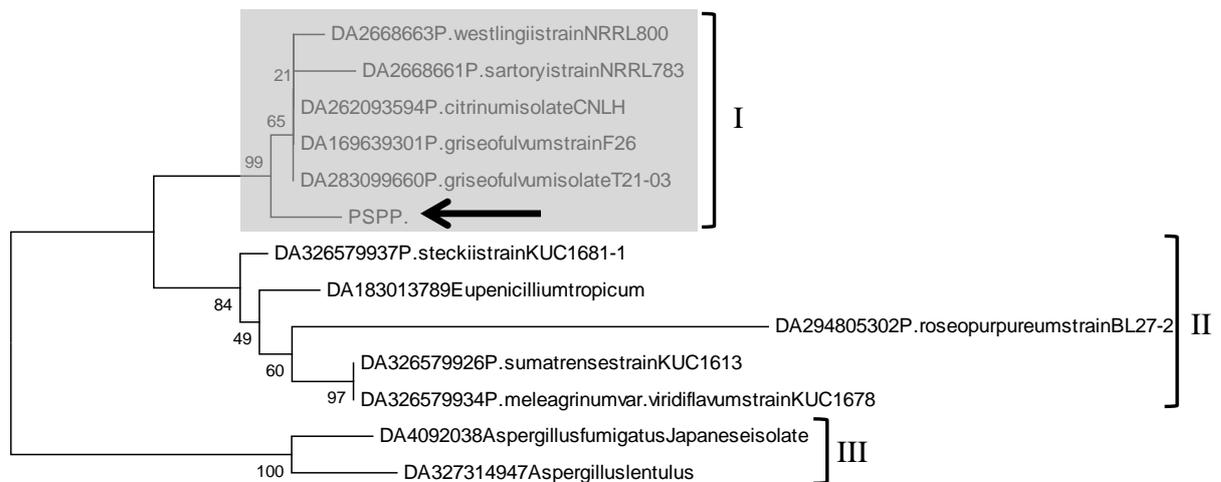


Figura 9. Árvore filogenética, gerada por meio do método de Neighbor – Joining, usando o modelo evolutivo de Jukes-Cantor. A seta indica o isolado de *Penicillium* spp., DA- Dikaria, Ascomycota.

Houbraken et al. (2010) utilizaram a região ITS, juntamente com partes de genes para β -tubulina e calmodulina e obtiveram sucesso ao realizar análises filogenéticas com *Penicillium citrinum* e espécies relacionadas com fins de identificação de espécies.

No entanto, o valor de confiabilidade do grupo I (99%) demonstra que o grupo é consistente e que as espécies presentes são proximamente relacionadas.

A semelhança entre a sequência do isolado *Penicillium* sp. PSPP e as demais espécies de *Penicillium* spp. presentes no grupo I é bastante elevada, como pode ser observado na matriz de distância (Figura 10). A falta de sinal filogenético é responsável por gerar a politomia observada nesse grupo.

A partir da análise molecular não foi possível definir qual a espécie do isolado PSPP, no entanto sua semelhança com as espécies do grupo I indica que o isolado

pertence a uma dessas espécies. No entanto, a análise de identificação morfológica revelou que o isolado PSPP pertence a espécie *Penicillium citrinum*.

	PSPP.	DA262093594P.citrinumisolateCNLH	DA169639301P.griseofulvumstrainF26	DA283099660P.griseofulvumisolateT21-03	DA2668663P.westlingiistrainNRRL800	DA2668661P.sartoryiistrainNRRL783	DA183013789Eupenicilliumtropicum	DA326579937P.steckiistrainKUC1681-1	DA326579926P.sumatrensestrainKUC1613	DA326579934P.meleagrinumvar.viridiflavumstrainKUC1678	DA294805302P.roseopurpureumstrainBL27-2	DA327314947Aspergilluslentulus	DA4092038AspergillusfumigatusJapaneseisolate
PSPP.													
DA262093594P.citrinumisolateCNLH	0,007												
DA169639301P.griseofulvumstrainF26	0,007	0,000											
DA283099660P.griseofulvumisolateT21-03	0,007	0,000	0,000										
DA2668663P.westlingiistrainNRRL800	0,010	0,002	0,002	0,002									
DA2668661P.sartoryiistrainNRRL783	0,012	0,005	0,005	0,005	0,007								
DA183013789Eupenicilliumtropicum	0,027	0,024	0,024	0,024	0,027	0,029							
DA326579937P.steckiistrainKUC1681-1	0,022	0,019	0,019	0,019	0,022	0,024	0,007						
DA326579926P.sumatrensestrainKUC1613	0,029	0,027	0,027	0,027	0,029	0,032	0,014	0,012					
DA326579934P.meleagrinumvar.viridiflavumstrainKUC1678	0,029	0,027	0,027	0,027	0,029	0,032	0,014	0,012	0,000				
DA294805302P.roseopurpureumstrainBL27-2	0,062	0,059	0,059	0,059	0,062	0,064	0,042	0,044	0,042	0,042			
DA327314947Aspergilluslentulus	0,057	0,052	0,052	0,052	0,054	0,057	0,052	0,052	0,052	0,052	0,083		
DA4092038AspergillusfumigatusJapaneseisolate	0,054	0,049	0,049	0,049	0,052	0,054	0,052	0,052	0,049	0,049	0,083	0,014	

Figura 10. Estimativas de divergência evolutiva entre as seqüências, mostrando o número de substituições de bases por sítio entre as sequências. As análises foram realizadas utilizando o modelo de Jukes-Cantor. A análise envolveu 13 sequências de nucleotídeos. Os valores destacados referem-se as espécies presentes no grupo I. As análises evolutivas foram realizadas com o programa MEGA5 (Tamura, Peterson, Stecher, Nei, e Kumar, 2011).

Antagonismo entre *Penicillium citrinum* e *Aspergillus niger*

O pareamento entre os fungos em meios de cultura CYA e BDA demonstrou que o isolado *P. citrinum* inibe o crescimento micelial de *A. niger*. De modo geral, foram constatadas diferenças significativas na redução do crescimento micelial de *A. niger* de acordo com o meio de cultivo utilizado (CYA ou BDA) e com o intervalo de tempo entre o crescimento de *P. citrinum* e a introdução do *A. niger*. Essas diferenças podem ser observadas por meio da porcentagem de inibição (Tabela 1).

Em meio de cultivo CYA, a porcentagem de inibição de *A. niger* por *P. citrinum* variou de acordo ao intervalo de repicagem entre os micro-organismos,

sendo que essa diferença foi de 65,76% quando se utilizou um tempo de 72 horas (Tabela 1).

Já em meio de cultivo BDA, a porcentagem de inibição apresentou-se menor em comparação ao meio CYA e esta não diferiu ao longo dos intervalos de repicagem (Tabela 1).

Estas diferenças de desenvolvimento foram ocasionadas pelas composições, bastante divergentes, dos meios de cultivo utilizados CYA e BDA, as quais combinadas com condições como temperatura e pH influenciaram no crescimento das colônias e na atividade metabólica dos micro-organismos (WHEELER et al. 1991).

Tabela 1. Porcentagem de inibição de *Penicillium citrinum* ao crescimento da colônia de *Aspegillus niger* em placa de Petri, repicados em diferentes intervalos de tempo e em dois meios de cultivo: Czapek Yest Agar (CYA) e Ágar Batata Dextrose (BDA).

Tratamento	CYA	BDA
Tempo 0 h	52,3 b	45,1 a
Tempo 24 h	55,77 b	46,82 a
Tempo 48 h	49,11 b	45,95 a
Tempo 72 h	65,76 a	42,46 a

Médias seguidas de mesma letra, entre tratamentos, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

De maneira geral, todos os tratamentos com *P. citrinum* causaram a inibição do crescimento micelial de *A. niger*, quando comparados aos tratamentos controles.

Quando o pareamento foi feito utilizando-se o meio de cultivo CYA, por meio da análise da curva de regressão foi observado que, o crescimento da colônia de *A. niger* apresentou-se maior nos tratamentos controle e reduziu nos tratamentos com variações de tempo (Figura 11). Sendo que nestes tratamentos, quanto maior o intervalo de tempo entre a aplicação do fungo antagonista e do fitopatógeno, mais eficiente é o efeito inibidor do crescimento micelial do fitopatógeno (Figura 12).

Assim, o tratamento mais eficiente foi aquele no qual o *P. citrinum* foi aplicado ao meio de cultura 72 horas antes da inoculação com *A. niger* (Figura 11). As equações de regressão estão apresentadas na tabela 2.

Possivelmente, esse intervalo de tempo permite o crescimento do micro-organismo antagonístico *P. citrinum* e a conseqüente produção de metabólitos secundários com efeito antagonístico a *A. niger*. Metabólitos secundários caracterizam o mecanismo de antagonismo por meio da antibiose, na qual um dos micro-organismos que interagem, produz metabólitos que agem negativamente sobre o outro (BERGAMIN, 1995). Como o *A. niger* cresce mais rápido que o *P. citrinum* em meio CYA, atingindo todo o diâmetro da placa; é necessário favorecer primeiro o crescimento de *P. citrinum* (o agente antagonístico), para depois introduzir o patógeno.

No entanto, outros mecanismos também podem estar atuando, como por exemplo, a competição, pois os dois micro-organismos presentes na placa de Petri estão a todo momentos competindo entre si. Segundo Bettiol (1995) citado por BERGAMIN et al, (1995), a competição ocorre quando dois ou mais micro-organismos estão explorando uma mesma ação e/ou substrato. Assim, nesta interação negativa ocorre luta pelos recursos de sobrevivência, como: oxigênio, espaço e nutrientes (carboidratos, nitrogênio, fatores de crescimento) (MOREIRA E SIQUEIRA, 2006; MICHEREFF, 2008).

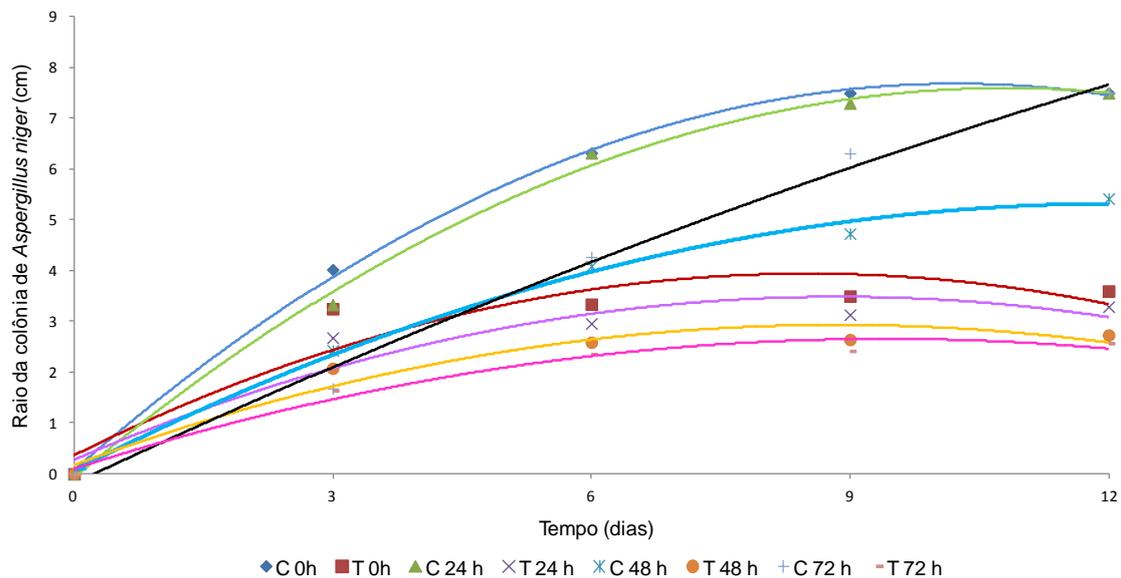


Figura 11. Curva de regressão do antagonismo de *Penicillium citrinum* a *Aspergillus niger*, pareados em diferentes intervalos de tempo em meio de cultura CYA, avaliados aos 0, 3, 6, 9, 12 dias. T0h - intervalo de 0 horas entre *Penicillium citrinum* e *Aspergillus niger*; T24h - intervalo de 24 horas; T48h - intervalo de 48 horas; T72h - intervalo de 72 horas. C0h, C24h, C48h, C72h - Controles negativos (somente *Aspergillus niger*).

Tabela 2. Equações de regressão do crescimento micelial de *Aspergillus niger*, em resposta ao pareamento entre *Aspergillus niger* e *Penicillium citrinum* em meio CYA.

Tratamento	Equação	R ²
CT0	$\hat{y} = -0,0727x^2 + 1,4885x + 0,064$	0,9991 **
T0	$\hat{y} = -0,0494x^2 + 0,8417x + 0,358$	0,8812 **
CT1	$\hat{y} = -0,0657x^2 + 1,4202x - 0,0846$	0,9966 **
T1	$\hat{y} = -0,0409x^2 + 0,7252x + 0,2698$	0,9148 **
CT2	$\hat{y} = -0,0357x^2 + 0,8666x + 0,0631$	0,9951 **
T2	$\hat{y} = -0,0352x^2 + 0,6235x + 0,1688$	0,9507 **
CT3	$\hat{y} = -0,0121x^2 + 0,8x - 0,1926$	0,9916 *
T3	$\hat{y} = -0,0289x^2 + 0,544x + 0,094$	0,9769 **

* significativo, ** altamente significativo ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste F.

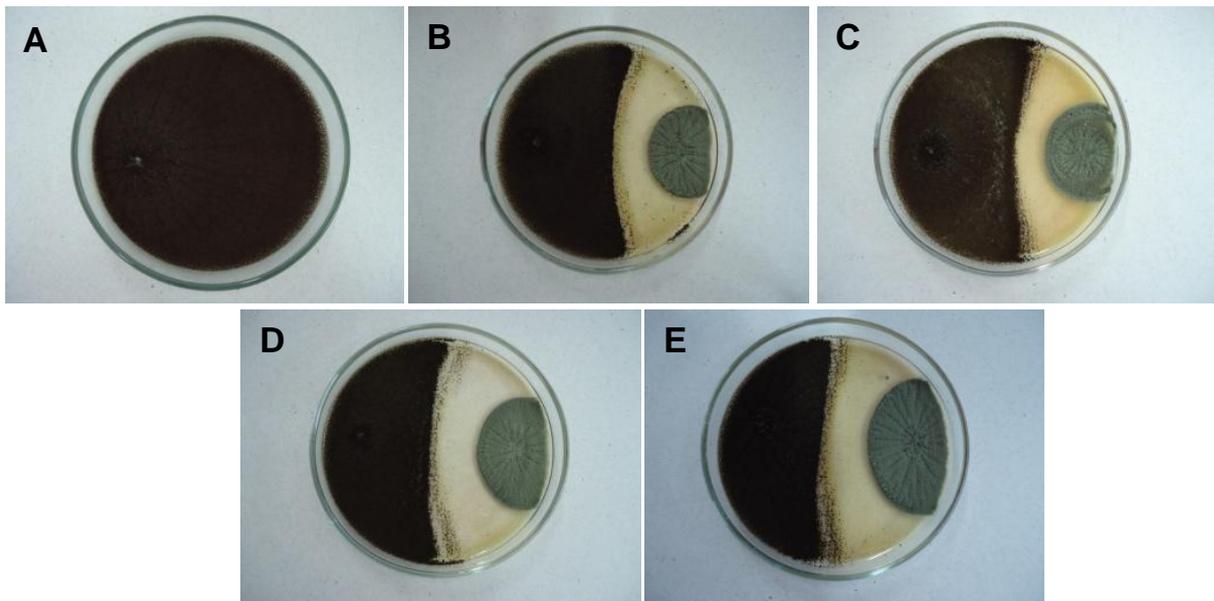


Figura 12. Pareamento de culturas de *Aspergillus niger* (colônia negra) e *Penicillium citrinum* (colônia esverdeada), em meio de cultura CYA, com variação do intervalo de tempo entre a repicagem do *Penicillium citrinum* e do *Aspergillus niger*. (A) Controle; (B) Tratamento 0 horas; (C) Tratamento 24 horas; (D) Tratamento 48 horas; (E) Tratamento 72 horas.

Os ensaios com pareamento em meio de cultivo BDA, também apresentaram menor crescimento micelial de *A. niger* nos tratamentos com *P. citrinum*, quando comparados aos tratamentos controle (apenas *A. niger*) (Figura 13).

As curvas de regressão indicam o menor crescimento micelial para os tratamentos T0h, T24h, T48h e T72h, correspondentes a 0, 24, 48 e 72 horas de intervalo de repicagem entre os micro-organismos. Já para os tratamentos controles, as curvas de regressão indicam maior crescimento das colônias (Figuras 13). As equações de regressão estão apresentadas na tabela 3.

No entanto, a redução do crescimento micelial de *A. niger* não variou conforme o intervalo de repicagem entre os fungos, sendo assim, os tratamentos com 0, 24, 48 e 72 horas apresentaram resultados semelhantes (Figura 14).

O antagonismo neste caso, também pode ter ocorrido por meio de mecanismos de antibiose, através da produção de metabólitos por *P. citrinum*, os quais inibem o *A. niger* e/ ou por mecanismos de competição entre os micro-organismos.

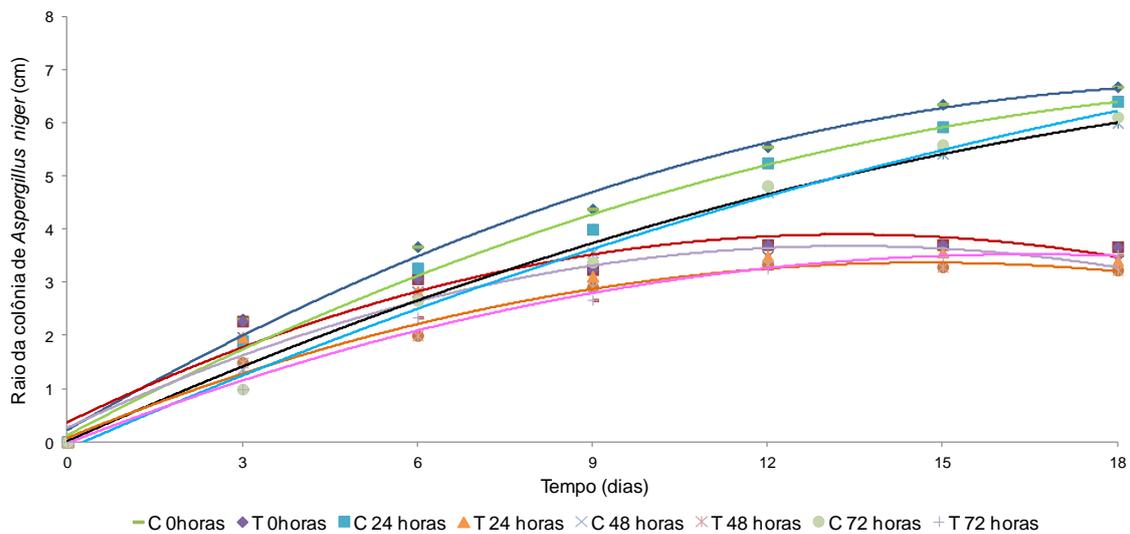


Figura 13. Curva de regressão do antagonismo de *Penicillium citrinum* a *Aspergillus niger*, pareados em diferentes intervalos de tempo em meio de cultura BDA, avaliados aos 0, 3, 6, 9, 12, 15 e 18 dias. T0h - intervalo de 0 horas entre *Penicillium citrinum* e *Aspergillus niger*; T24h - intervalo de 24 horas; 48h - intervalo de 48 horas; T72h - intervalo de 72 horas. C0h, C24h, C48h, C72h - Controles negativos (somente *Aspergillus niger*).

Tabela 3. Equações de regressão do crescimento micelial de *A. niger*, em resposta ao pareamento entre *Aspergillus niger* e *Penicillium citrinum* em meio BDA.

Tratamento	Equação	R ²
CT0	$\hat{y} = -0,0156x^2 + 0,6376x + 0,2188$	0,99132 **
T0	$\hat{y} = -0,0198x^2 + 0,5287x + 0,3631$	0,9447 **
CT1	$\hat{y} = -0,0126x^2 + 0,5749x + 0,1207$	0,9955 **
T1	$\hat{y} = -0,019x^2 + 0,5104x + 0,261$	0,9687 **
CT2	$\hat{y} = -0,009x^2 + 0,495x + 0,0074$	0,9978 **
T2	$\hat{y} = -0,0152x^2 + 0,4482x + 0,0702$	0,9882 **
CT3	$\hat{y} = -0,0072x^2 + 0,4823x - 0,1388$	0,9927 **
T3	$\hat{y} = -0,0131x^2 + 0,4323x - 0,0307$	0,9905 **

* significativo ** altamente significativo ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste F.

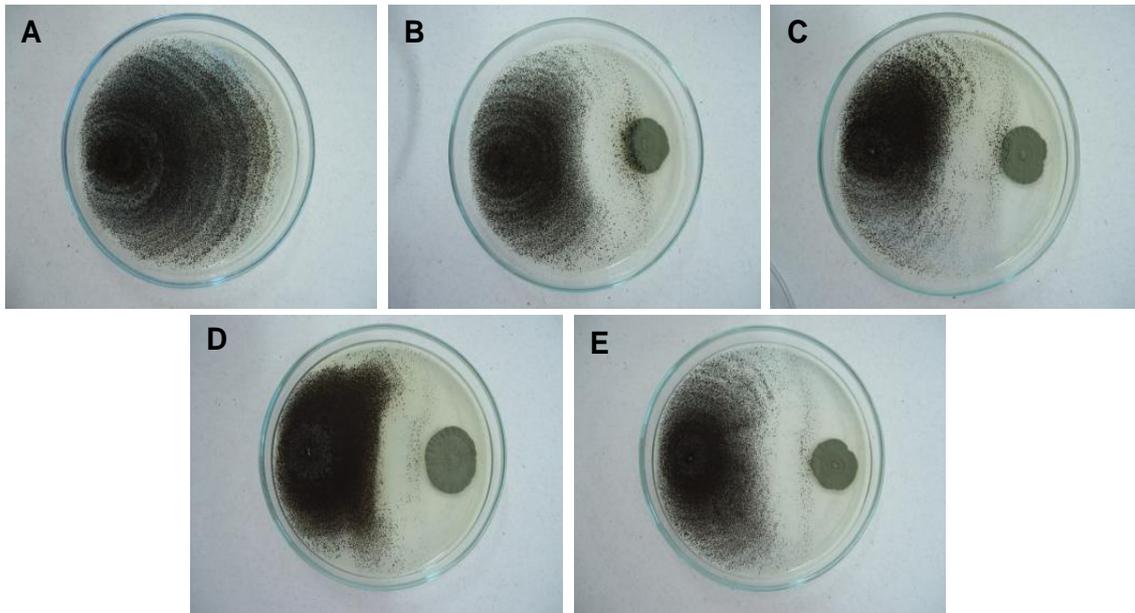


Figura 14. Pareamento de culturas de *Aspergillus niger* (colônia negra) e *Penicillium citrinum* (colônia esverdeada), em meio de cultura BDA, com variação do intervalo de tempo entre a repicagem do *Penicillium citrinum* e do *Aspergillus niger*. (A) Controle; (B) Tratamento 0 - 0 horas; (C) Tratamento 1 - 24 horas; (D) Tratamento 2 - 48 horas; (E) Tratamento 3 - 72 horas. Após 18 dias da repicagem.

O pareamento em placas de Petri, utilizando os dois meios de cultivo CYA e BDA, demonstrou a atividade antagonista de *P. citrinum* à *A. niger*, nas condições em que o experimento foi desenvolvido. Por meio da análise da área abaixo da curva do

crescimento micelial (AACCM) de *A. niger* constataram-se diferenças de significância quando foram feitas comparações entre os tratamentos (Tabela 4).

Os valores de área abaixo da curva de crescimento micelial foram menores para o meio de cultivo CYA de maneira geral (Tabela 4). Os tratamentos 0, 24, 48 e 72 horas de intervalo de repicagem demonstraram que a presença do fungo antagônico *P. citrinum* reduz a área abaixo da curva de crescimento micelial (Tabela 4). Sendo que o tratamento com intervalo de repicagem de 72 horas obteve 20,72 de área (Tabela 4), por meio do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis a 5% de probabilidade constatou-se diferença significativa na comparação entre este tratamento e o respectivo controle (Tabela 4).

Em meio BDA, a área abaixo da curva de crescimento micelial foi reduzida em todos os tratamentos com ou sem intervalo de repicagem, quando estes são comparados aos respectivos controles (Tabela 4). A diferença observada na comparação da área abaixo da curva do crescimento micelial de controle e respectivos tratamentos apresentou diferença significativa.

Tabela 4. Diferença observada na área abaixo da curva de crescimento micelial (AACCM) de *Aspergillus niger*, quando pareado com *Penicillium citrinum* em diferentes intervalo de tempo.

Tratamentos	Área abaixo da curva do crescimento micelial (AACCM)	
	Czapek Yest Agar	Ágar Batata Dextrose
C 0h	59,02	73,33
C 24h	30,78	67,81
C 48h	57,58	60,55
C 72h	27,30	60,00
T 0 h	36,47	50,91
T 24 h	23,00	47,10
T 48 h	45,70	43,77
T 72 h	20,72	42,03
Tratamentos	Diferenças observadas entre as AACCM	
	Czapek Yest Agar**	Ágar Batata Dextrose**
C0h - T0h	29,17	40,95*
C24h - T24h	38,22*	40,55*
C48h - T48h	24,06	36,80*
C72h - T72h	43,44*	41,70*

* Diferenças significativas pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis a 5% de probabilidade.

** Diferença crítica de 30,82 para o CYA e de 32,46 para o BDA

O antagonismo entre fungos é base para o desenvolvimento de modelos racionais para introdução de biocontroladores em agroecossistemas e são vários os mecanismos de antagonismo. Dentre esses mecanismos encontra-se a antibiose, que consiste na interação entre organismos, na qual um ou mais metabólitos produzidos pelo antagonista têm efeito negativo sobre o fitopatógeno, resultando na inibição do crescimento e/ou germinação e a competição, na qual os micro-organismos interagem negativamente, disputando por espaço e nutrientes principalmente. Geralmente, os micro-organismos antagônicos agem por meio de vários mecanismos de antagonismos (MICHEREFF, 2000; MOREIRA e SIQUEIRA, 2009).

Neste experimento, *P. citrinum* possivelmente foi antagonista a *A. niger* por meio da competição e antibiose. *Penicillium* spp. é um gênero de fungos conhecido pelos seus metabólitos, dentre os quais se encontra a penicilina, que possui ação bactericida (WIKIPÉDIA, 2009). A produção de metabólitos por esse fungo não foi avaliada neste experimento. No entanto, tais substâncias podem estar associadas à inibição que *P. citrinum* exerceu sobre o crescimento micelial de *A. niger*, visto que esta espécie em particular constitui-se grande produtora de metabólitos secundários, dentre os quais a citrinina, uma micotoxina (HOUBRAKEN, FRISVAD e SAMSON, 2010).

Antagonismo entre *Penicillium citrinum* e *Aspergillus niger* em discos de sisal

Nos discos de caule de sisal, houve inibição do crescimento micelial e esporulação de *A. niger*, a partir do intervalo de 24 horas (Figura 15), confirmando, assim, alguns dos resultados observados *in vitro* em meio de cultura.

No tratamento sem intervalo de inoculação, não foi observada a inibição do crescimento micelial do patógeno, sendo semelhante ao controle negativo. *Aspergillus niger* tem um desenvolvimento muito rápido nos tecidos de caule de sisal, quando comparado com *P. citrinum*, sendo que nesta situação *P. citrinum* não consegue competir por espaço e nutrientes, sendo seu desenvolvimento inibido por *A. niger* (Figura 15 A). No intervalo de inoculação de 24 horas entre *P. citrinum* e *A. niger* existe uma baixa inibição do patógeno, onde *A. niger* se desenvolve com menor intensidade quando comparado com o controle negativo (Figura 15 B). Entretanto, a partir de 48 horas, somente o fungo antagonista apresenta

crescimento, mostrando assim que nesses intervalos e nas condições em que o experimento foi conduzido ocorre inibição total do *A. niger* pelo *P. citrinum* nos discos de caule de sisal e que *P. citrinum* consegue sobreviver nestes tecidos vegetais inibindo o crescimento do patógeno (Figura 15 C e D).

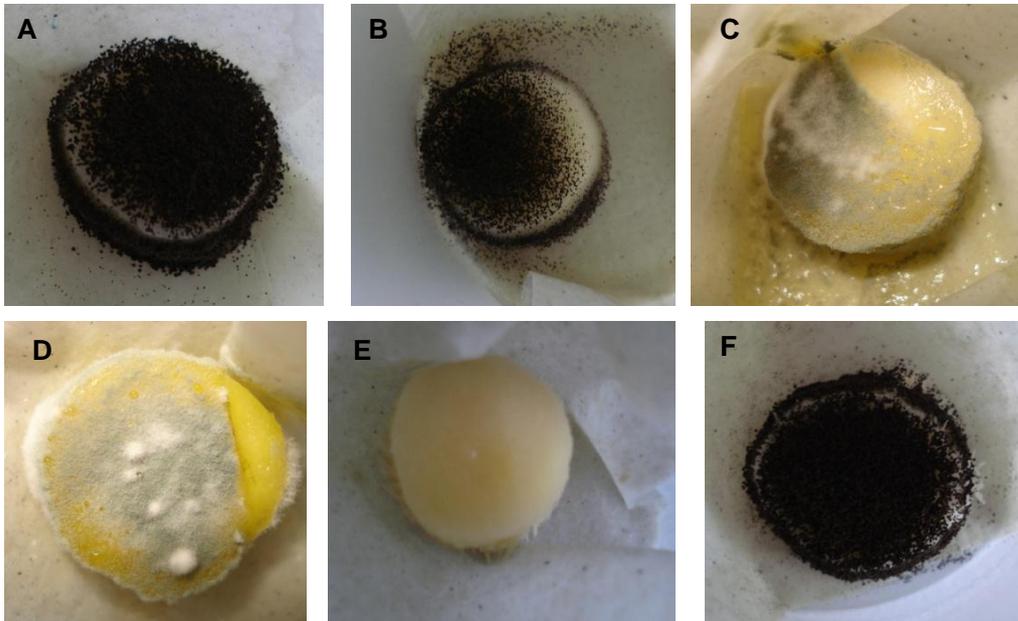


Figura 15. Efeito do antagonismo entre *Penicillium citrinum* e *Aspergillus niger* em discos de caule de sisal em diferentes intervalos entre a inoculação com os fungos (A) Tratamento 0 - 0 horas; (B) Tratamento 1 - 24 horas; (C) Tratamento 2 - 48 horas; (D) Tratamento 3 - 72 horas; (E) Controle positivo; (F) Controle negativo.

Fungos do gênero *Penicillium*, enquanto agentes de controle biológico, têm sido relatados utilizando múltiplos mecanismos no controle de doenças, os quais vão desde o antagonismo até a indução de resistência (MA, 2008). Neste experimento, provavelmente pode ter ocorrido antibiose, pois foi necessário um intervalo de tempo para que o *P. citrinum* apresentasse atividade antagônica a *A. niger* ou ainda inibição por mecanismos de competição, pois os dois patógeno e antagonista estavam presentes em um mesmo espaço competindo entre si.

Colonização de mudas de sisal pelo fungo *Penicillium citrinum*

O teste de colonização demonstrou que *P. citrinum* coloniza os tecidos internos da planta em até cinco dias após a inoculação, onde pôde-se observar crescimento de *P. citrinum* apenas nos fragmentos de caule e raiz de plantas inoculadas com o antagonista (Figura 16).

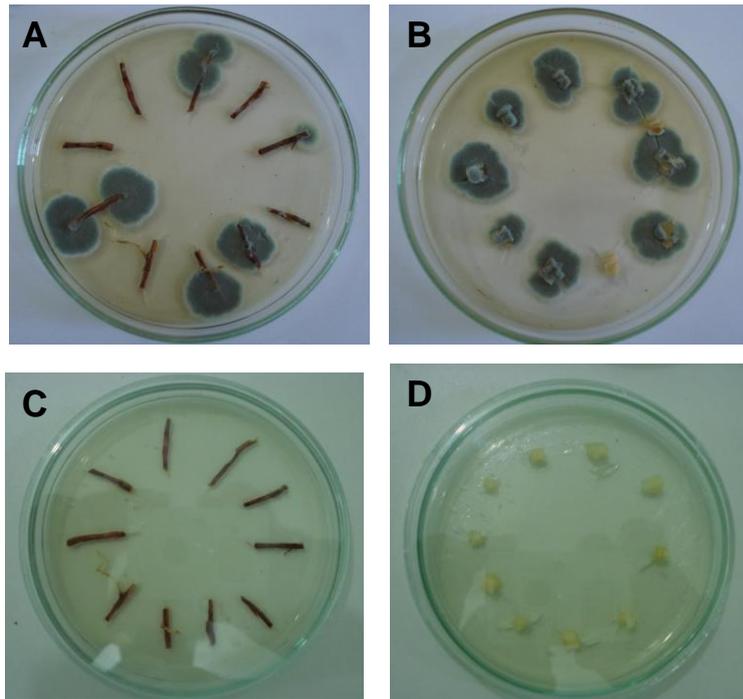


Figura 16. Teste de colonização de sisal **(A)** Crescimento de *Penicillium citrinum* após cinco dias de semeio em placas de Petri com BDA salino de raízes desinfestadas, coletadas de mudas de sisal inoculadas com *P. citrinum*; **(B)** Crescimento de *P. citrinum* após cinco dias de semeio de fragmentos de caule desinfestados, coletados de mudas de sisal inoculadas com *P. citrinum*.; **(C)** e **(D)** Controles de raiz e caule.

Não houve diferença significativa entre as freqüências de colonização dos fragmentos de raiz e caule plaqueados em meio de cultivo, tanto em cinco e em dez dias a aplicação de *P. citrinum* (Figuras 17).

Estes resultados indicam que dentre os períodos avaliados após a aplicação de *P. citrinum*, o fungo coloniza a maioria dos tecidos da raiz e caule da planta em aproximadamente cinco dias (Figuras 17).

A porcentagem de colonização das plantas de sisal foi de 50% para pedaços da raiz de plantas inoculadas com o fungo e de 70% para pedaços de caule. Assim,

observa-se o maior crescimento do fungo em pedaços do caule. A riqueza de exsudatos das plantas na rizosfera faz dessa região um local de desenvolvimento intenso de micro-organismos, tornando-o bastante competitivo para *P. citrinum*, com porcentagem de colonização menor do que no caule, onde não existe muita competição. Adicionalmente, os tecidos do caule podem ser mais suscetíveis a infecção e colonização por *P. citrinum*, semelhante ao que vem sendo observado para *A. niger* (ABREU, 2010). Estudos com *A. niger* tem demonstrado que este fungo não apresenta a capacidade de penetração no sisal pelas raízes, mas sim pelo tecido caulinar (SÁ, 2009; ABREU, 2010).

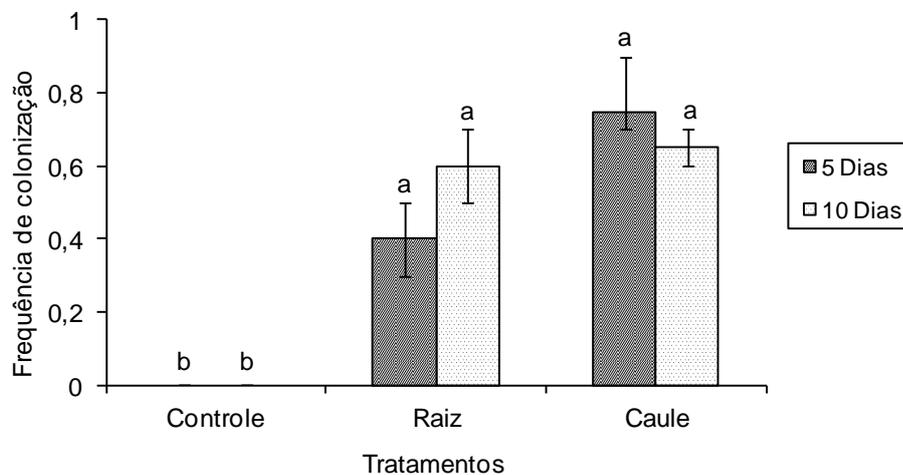


Figura 17. Frequência de colonização por *Penicillium citrinum* em fragmentos de raízes e pedaços de caule de sisal desinfestados 5 e 10 dias após a sua aplicação. Controle (água destilada) Raiz e Caule inoculados por *Penicillium citrinum*. Médias seguidas pela mesma letra entre os tratamentos não diferem entre si pelo teste F a 5% de probabilidade.

Os resultados de antagonismo *in vitro* e de colonização dos tecidos de raiz e caule do sisal, com maior capacidade de colonização do tecido caulinar indicam que este isolado de *P. citrinum* apresenta potencial para o controle do crescimento de *A. niger* e, conseqüentemente, da podridão vermelha do sisal.

As plantas inoculadas com o *P. citrinum* não apresentaram sintomas de doença, nas condições em que o experimento foi conduzido, indicando que este fungo não é patogênico ao sisal (Figura 18).



Figura 18. Comparação entre caule de sisal (A) inoculado com *Penicillium citrinum* e (B) tratamento controle.

Controle da podridão vermelha por *Penicillium citrinum* em mudas de sisal.

Os resultados obtidos nos testes com mudas de sisal em estufa agrícola indicaram que o tratamento sem intervalo de inoculação entre *P. citrinum* e *A. niger* (T0h) não diminuiu a severidade da doença, pois este não diferiu estatisticamente do controle negativo (CT-), inoculado apenas com o patógeno (Figura 19). Provavelmente, não houve tempo suficiente para que *P. citrinum* atuasse no controle da doença (Figura 19), semelhante ao que vem sendo observado nos estudos de antagonismos *in vitro*. *Aspergillus niger* tem rápido desenvolvimento, sendo que após cinco dias de inoculação, coloniza os tecidos do caule do sisal e causa sintomas da doença após 15 dias de inoculação (SÁ, 2009).

Já os tratamentos com diferentes intervalos de inoculação entre os micro-organismos, apresentaram resultados positivos, de forma que, com base no teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis a 5% de probabilidade, estes diferiram estatisticamente do controle negativo, assemelhando-se ao controle positivo (CT+), no qual as plantas foram tratadas apenas com água esterilizada (Figura 19). Dessa maneira, os tratamentos com intervalos de 24, 48 e 72 horas de intervalos, promoveram uma significativa diminuição de 100% na severidade da doença (Figura 18), devido a esses intervalos de tempo permitirem o desenvolvimento de *P. citrinum*, possibilitando assim, que o micro-organismo antagônico possa agir por meio da produção de metabólitos secundários, através da antibiose ou até da competição (MICHEREFF, 2008).

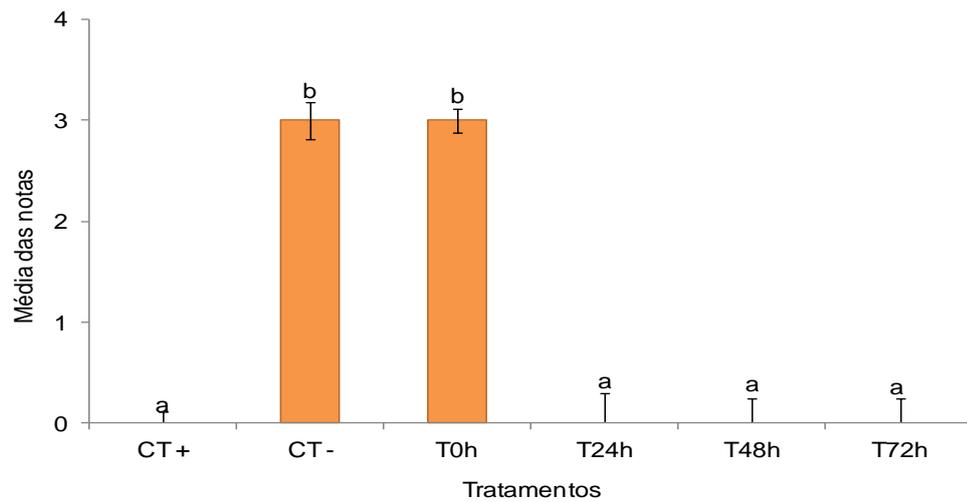


Figura 19. Avaliação de mudas de sisal inoculadas com *Penicillium citrinum* e *Aspergillus niger* em diferentes intervalos de tempo por meio de escalas de notas: 0-Planta sadia; 1- Sintoma inicial; 2-Sintoma avançado; 3-Planta morta. Médias seguidas pela mesma letra diferem entre si pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis a 5% de probabilidade.

Estes resultados indicam que o *P. citrinum* é um excelente agente de controle da podridão vermelha do sisal, promovendo 100% de controle da doença, e corroboram com aqueles observados nos testes em laboratório, nos quais a aplicação prévia do isolado de *P. citrinum* permitiu que este micro-organismo colonizasse os tecidos do sisal e exercesse ação antagônica a *A. niger*, para agir no controle da podridão vermelha do sisal, diminuindo severidade da doença.

Sobrevivência de *Aspergillus niger* em diferentes solos das regiões produtoras de sisal do semiárido baiano

As amostras de solos foram coletadas na região semiárida da Bahia, em diferentes plantios de sisal, nos municípios de Orolândia e Mirangaba, regiões com solos argilosos e nos municípios de Valente e Barrocas, regiões com solos arenosos (Figura 20).

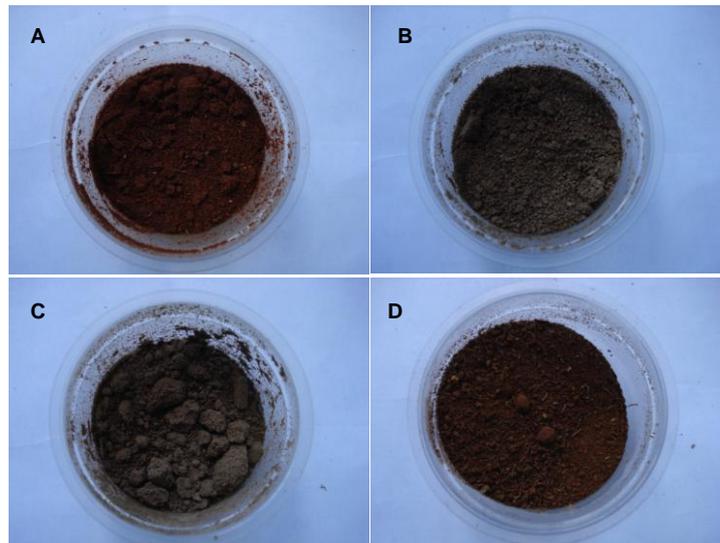


Figura 20. Representação dos solos da região semiárida. **(A)** Município de Ouroândia **(B)** Valente **(C)** Barrocas **(D)** Mirangaba.

Foram observadas diferenças na sobrevivência de *A. niger* nos diferentes solos e no tempo avaliado. De modo geral, observou-se um decréscimo na população de *A. niger* nos solos analisados. Houve redução do número de UFC a partir de 21 dias para as amostras de solo de Ouroândia e Mirangaba, os quais caracterizam-se por serem vermelhos, constituídos de partículas finas e menos permeáveis à água, sendo o primeiro arenoso e o segundo argiloso (Figura 21).

Nas amostras de solo de Valente e de Barrocas, a redução do número de UFC ocorreu mais cedo, em período anterior aos 14 dias. Esses solos são médio-arenosos com baixa quantidade de matéria orgânica, e baixa capacidade de retenção de água, dificultando a sobrevivência de *A. niger* (Figura 21).

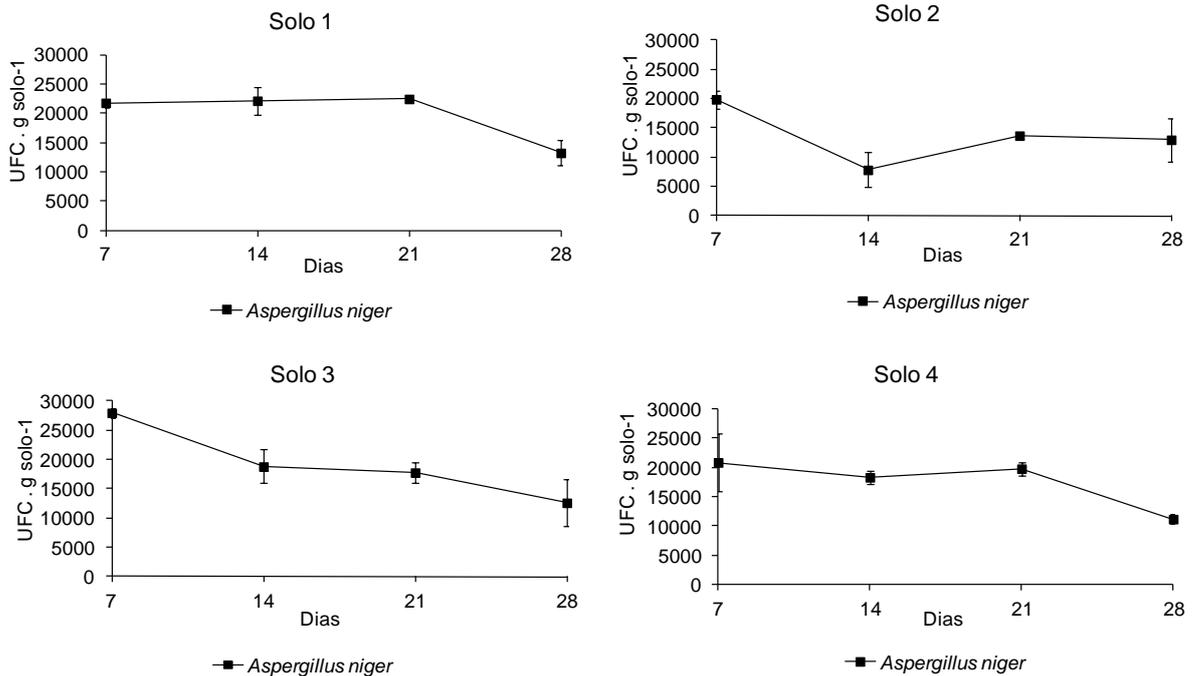


Figura 21. Sobrevivência de *Aspergillus niger* em diferentes solos de diferentes municípios. Solo 1: Ourolândia; Solo 2: Valente; Solo 3: Barrocas e Solo 4: Mirangaba.

Observações em campo demonstram que em áreas constituídas por solos arenosos e com baixa quantidade de matéria orgânica ocorre maior incidência da doença. *Aspergillus niger* é um fungo filamentosos, pertencente à ordem Eurotiales, Família Tricomaceae e Filo Ascomycota (DEEPAKE, 2009). Este apresenta crescimento aeróbico na matéria orgânica, sendo encontrado no solo, serrapilheira e em matéria orgânica em decomposição (SCHUSTER et al., 2002). *Aspergillus niger* vive como saprófita, podendo causar doenças como podridão do colo do amendoim, principalmente em solos com baixos teores de matéria orgânica, podendo ocasionar perdas de produção superiores a 50% devido a morte das plântulas (MORAES et al., 1997). É um fungo considerado oportunista, não penetrando em tecidos não injuriados do hospedeiro, necessitando de lesões de origem mecânica ou fisiológica para que se dê a infecção (LIMA et. al. 1998).

Provavelmente a baixa capacidade de sobrevivência de *A. niger* nesses solos está associada ao baixo teor de matéria orgânica. Nessas áreas, o monocultivo do sisal representa uma das poucas fontes de matéria orgânica para a sobrevivência do fungo. Sá (2009) demonstrou que o *A. niger* coloniza bem os tecidos de sisal. Assim,

o monocultivo de sisal em regiões com solos pobres em matéria orgânica e sob condições de estresse nutricional e estresse por deficiência hídrica favorece a sobrevivência do fungo em solo e o estabelecimento da doença.

Sobrevivência de *Penicillium citrinum* em diferentes solos de regiões do semiárido baiano

Penicillium citrinum apresentou menor população em comparação ao *A. niger*. No entanto, sua sobrevivência apresentou-se relativamente constante no período avaliado, exceto no solo 1. Ao final do período de avaliação, o decréscimo na população desse fungo foi menor que aquele apresentado por *A. niger* (Figura 22).

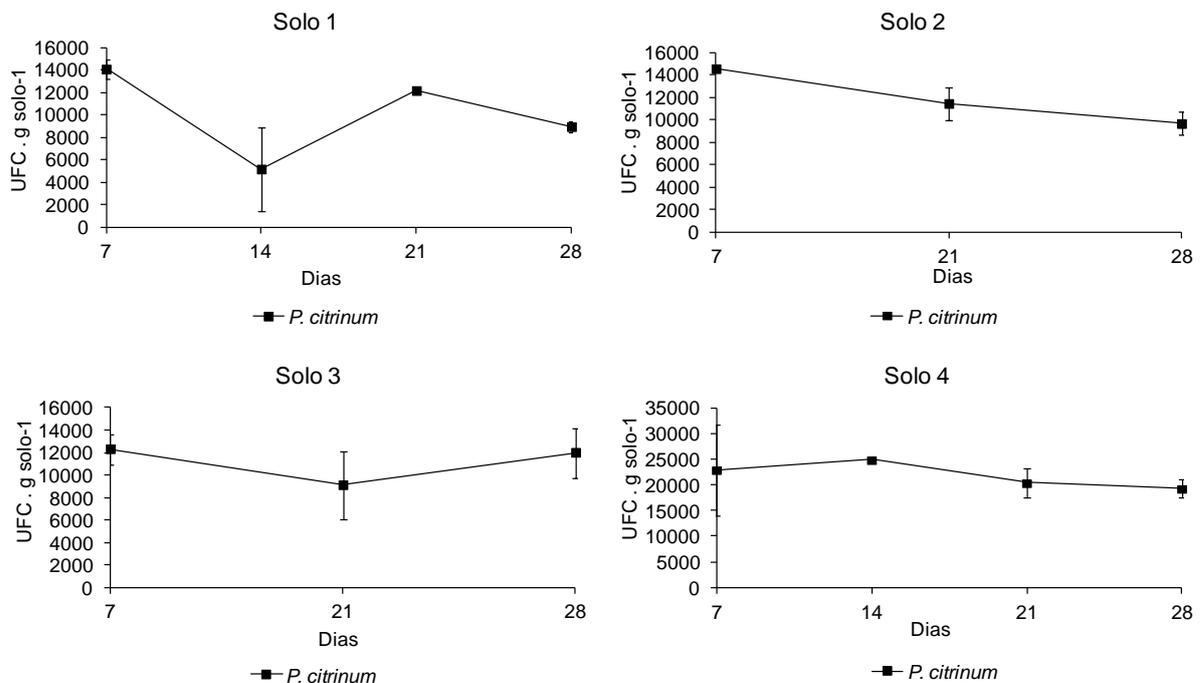


Figura 22. Sobrevivência de *Penicillium citrinum* em diferentes solos de diferentes municípios. Solo 1: Orolândia; Solo 2: Valente; Solo 3: Barrocas e Solo 4: Mirangaba.

Os testes em segmentos de discos de caule do sisal demonstraram que o *P. citrinum* coloniza, mas não tem a capacidade de infectar e causar doença no sisal. Entretanto, o *P. citrinum* parece apresentar maior capacidade de sobrevivência no solo.

Supressão de *Aspergillus niger* por *Penicillium citrinum* em diferentes solos

Quando se infestou o solo com *P. citrinum* e *A. niger* observou-se uma redução da população de *A. niger* em todos os solos dentro do período avaliado, demonstrando assim que *P. citrinum* causa uma redução na população do patógeno (Figura 23). A redução na população ocorre possivelmente por mecanismos de antagonismo e competição por espaço e nutrientes. Ao final do experimento, a população de *A. niger* nos tratamentos com e sem *P. citrinum* não foi significativamente diferentes (Figura 23). Estes resultados indicam que o *A. niger* não tem a capacidade de sobrevivência em solos sem matéria orgânica e *P. citrinum* compete com *A. niger*, e apresenta potencial para controle do *A. niger*, podendo proporcionar a redução da população deste fungo nas regiões produtoras de sisal.

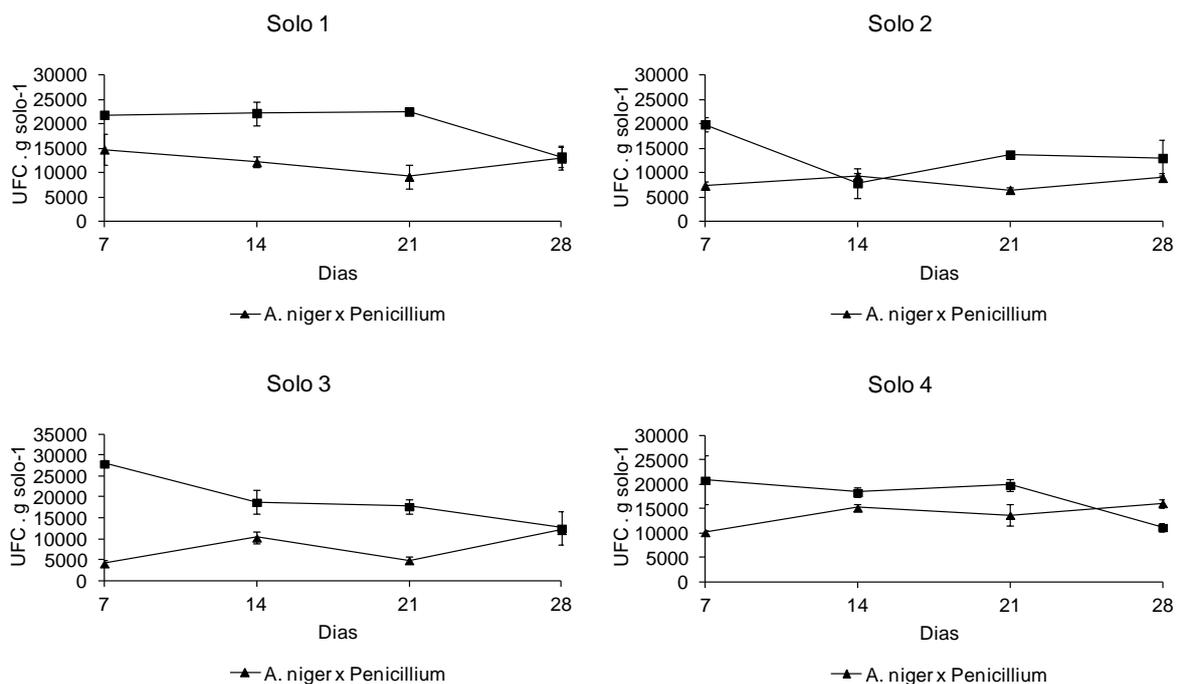


Figura 23. Comparação da sobrevivência de *A. niger*, em solos de diferentes municípios, quando inoculado junto ao *P. citrinum* e na ausência deste. Solo 1: Ourulândia, Solo 2: Valente; Solo 3: Barrocas; Solo 4 : Mirangaba.

Efeito de metabólitos secundários de *Penicillium citrinum* sobre *Aspergillus niger*

Os metabólitos produzidos por *P. citrinum* foram eficientes na inibição da germinação de esporos de *A. niger* (Figura 24). Sendo que em comparação com o controle, os resultados dos tratamentos apresentaram diferenças significativas, de acordo com o teste F a 5% de probabilidade. Observou-se que no tratamento controle, 80% dos esporos haviam germinado, enquanto que no tratamento contendo metabólitos de *P. citrinum*, apenas 1% de esporos germinaram (Figura 25).

Fungos do gênero *Penicillium* são bastante conhecidos por produzirem metabólitos secundários biologicamente ativos, utilizados como: antibióticos, agroquímicos, antiparasíticos, imunossupressores, dentre outros (SEQUEIRA et al, 2009) . Entende-se por metabólitos secundários, substâncias, geralmente bioativas e de baixo peso molecular, sintetizadas pelo micro-organismo em fase estacionária durante grandes acúmulos de precursores de metabólitos primários, como por exemplo: aminoácidos, acetato e piruvato (JAY, 2005; KELLER et al., 2005, citado por CORTEZ, 2011). Provavelmente, os metabólitos secundários produzidos por *P. citrinum* e obtidos neste experimento, possuem alguma substância que atue diretamente no desenvolvimento do tubo germinativo dos esporos de *A. niger*, prejudicando-o.

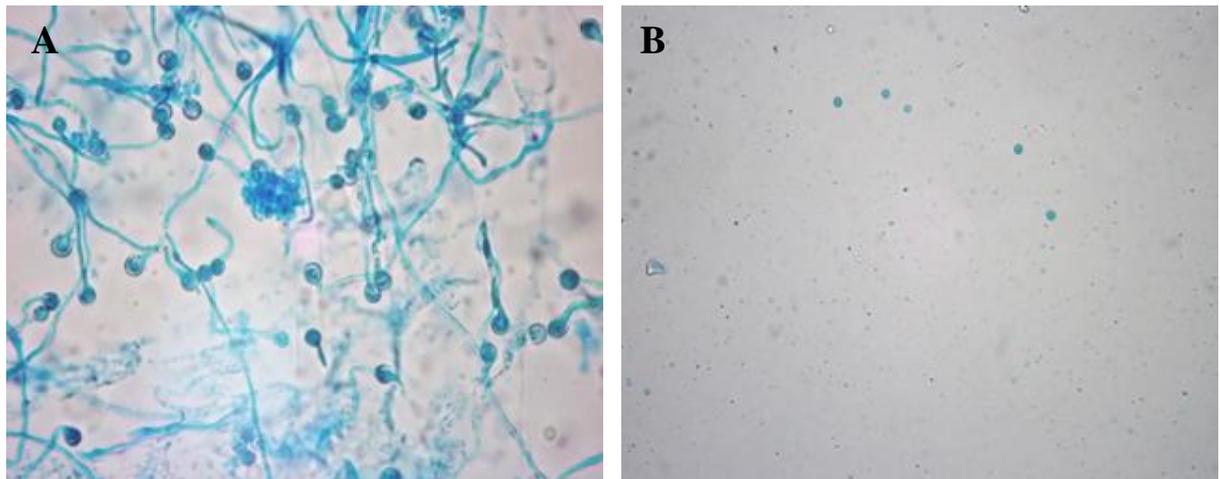


Figura 24. Inibição da germinação de esporos de *Aspergillus niger* por metabólitos de *Penicillium citrinum* (A) Tratamento controle mostrando esporos germinados, (B) Tratamento com metabólitos indicando inibição da germinação dos esporos.

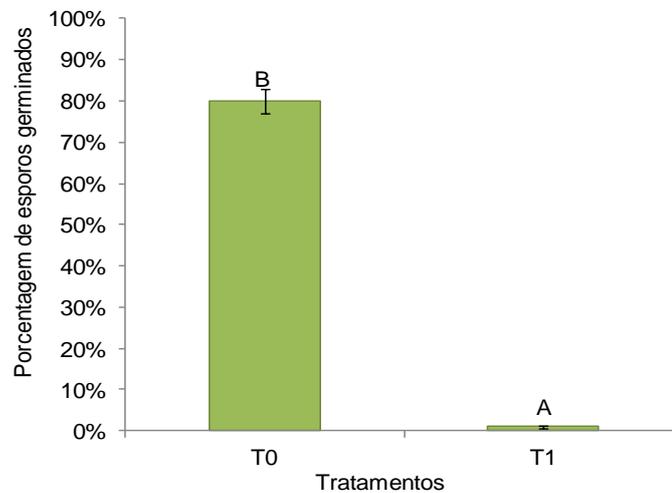


Figura 25. Inibição da germinação de esporos de *Aspergillus niger* por metabólitos de *Penicillium citrinum*. **T0:** Tratamento controle e **T1:** Tratamento com metabólitos de *P. citrinum*. Médias seguidas de mesma letra entre os tratamentos não diferem entre si pelo teste F a 5% de probabilidade.

Em relação à inibição do crescimento micelial, por meio da análise do índice de crescimento micelial (IVCM) foi possível observar diferenças no comportamento da colônia de *A. niger*, de acordo com o tratamento e as diferentes concentrações de metabólitos de *P. citrinum* no meio de cultivo BDA (Figura 26 e 27).

Os tratamentos controle com 50% e 25% de meio líquido CYA, incorporados ao meio BDA, apresentaram alto IVCM, sendo que apenas o controle com 75% de CYA apresentou baixo IVCM. Provavelmente a grande quantidade de meio líquido CYA quando adicionada ao meio de cultivo BDA, ocasionou algum tipo de reação que inibiu e modificou o crescimento da colônia de *A. niger*, prejudicando seu desenvolvimento. (Figura 26).

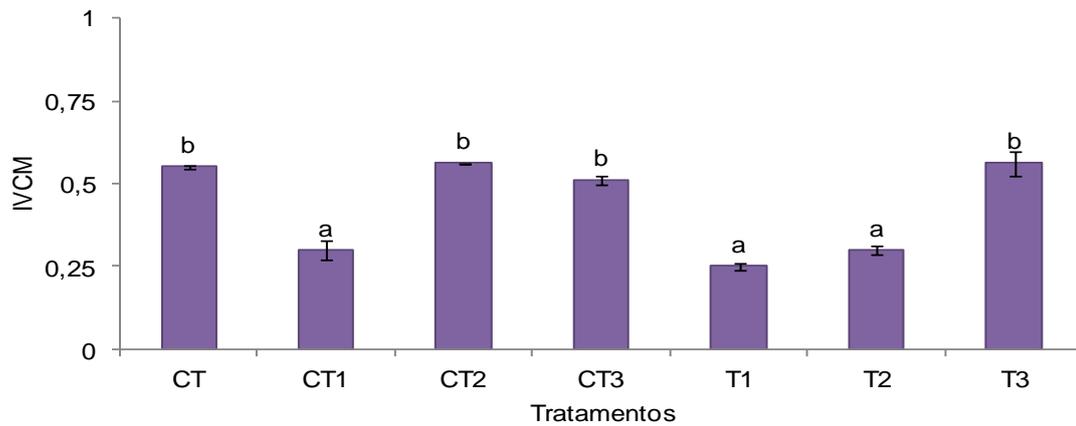


Figura 26. Crescimento micelial de *A. niger*, medido por meio do índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM). CT – Controle apenas meio BDA; CT1 – Controle do tratamento 1 (meio BDA acrescido de 75% de meio CYA líquido); CT2- Controle do tratamento 2 (meio BDA acrescido de 50% de meio CYA); CT3 - Controle do tratamento 2 (meio BDA acrescido de 25% de meio CYA); T1 – meio de cultura com 75% de metabólitos de *P. citrinum*; T2- 50% de metabólitos e T3 – 25% de metabólitos. Médias seguidas de mesma letra, entre tratamentos, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Pode-se observar que nos tratamentos controle com BDA, 50% de CYA e 25% de CYA, a colônia de *A. niger* se desenvolveu normalmente e atingiu a borda da placa aos 16 dias de avaliação (Figura 27).

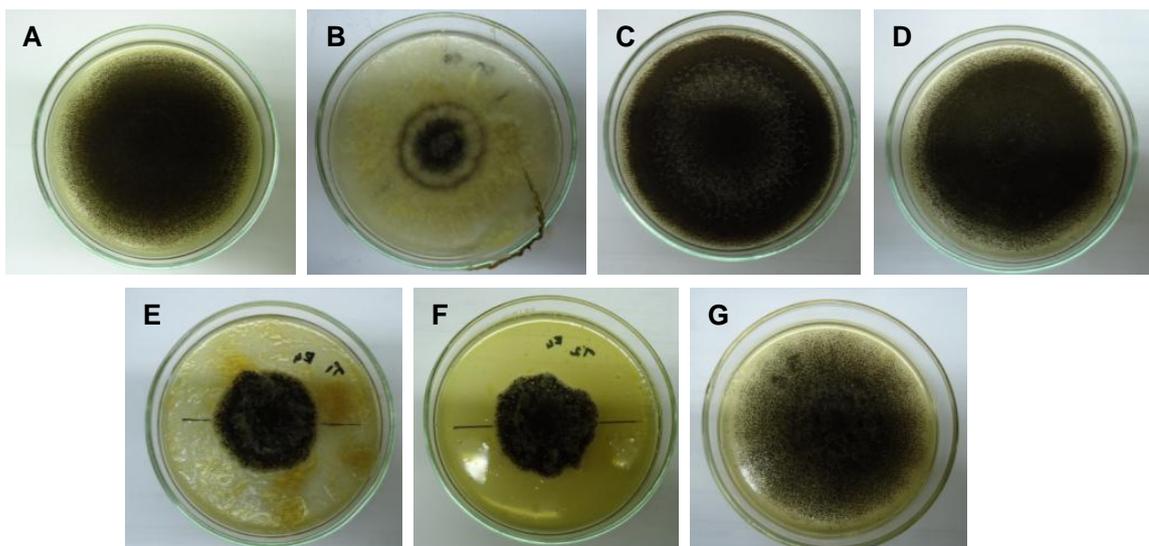


Figura 27. Inibição de crescimento micelial de *A. niger*. (A) Controle meio BDA; (B) Controle tratamento 1; (C) Controle tratamento 2; (D) Controle tratamento 3; (E) Tratamento 1- 75% de metabólitos de *P. citrinum*; (F) Tratamento 2 – 50% de metabólitos; (G) Tratamento 3 - 25% de metabólitos.

Os tratamentos com 75% e 50% de metabólitos de *P. citrinum* ocasionaram baixo IVCM, no entanto diferiram em relação a redução na esporulação de *A. niger* em comparação com o tratamento controle. Sendo que destes tratamentos, apenas 50% foi eficiente para reduzir a esporulação do *A. niger*, quando comparado ao controle (Tabela).

Tabela 5. Quantificação de esporos de *Aspergillus niger*, após incubação em tratamento com metabólitos.

Tratamentos*	Concentração de esporos (UFC x 10 ⁸ . mL)
CT	39,4b
CT1	4,47a
CT2	104c
CT3	47,3b
T1	25,6b
T2	32,1b
T3	40b

* **CT**: Tratamento controle, meio BDA; **CT1**: Tratamento controle com 75% de meio líquido CYA; **CT2**: Tratamento controle com 50% de meio líquido CYA; **CT3**: Tratamento controle com 25% de meio líquido CYA; **T1**: Tratamento com 75% de metabólitos de *Penicillium citrinum*; **T2**: Tratamento com 50% de metabólitos de *P. citrinum* e **T3**: Tratamento com 25% de metabólitos de *P. citrinum*. Médias seguidas pela mesma letra entre os tratamentos não diferem entre si pelo teste F a 5% de probabilidade.

O tratamento com 25% de metabólitos de *P. citrinum* não foi eficiente para a redução do crescimento micelial, visto que apresentou alto IVCM, assemelhando-se ao tratamento controle. Isso sugere que, a quantidade de metabólitos aplicada tem influência direta na inibição do patógeno. Neste experimento, 75% de metabólitos em meio de cultivo BDA, foi a proporção que apresentou melhores resultados, quanto a redução do crescimento micelial, mas não apresentou redução significativa na esporulação *in vitro* de *A. niger*.

CONCLUSÕES

O fungo *Penicillium citrinum*, isolado da região semiárida produtora de sisal na Bahia é um potencial agente de controle da podridão vermelha do sisal. *Penicillium citrinum* tem efeito antagônico a *Aspergillus niger*, inibindo o crescimento micelial, a esporulação e a germinação de esporos e controla a podridão vermelha em mudas de sisal, quando inoculado de 48 a 72 horas antes do contato com o patógeno. *Penicillium citrinum* coloniza os tecidos de raiz e caule de sisal e tem potencial para sobreviver no solo melhor do que *A. niger*, controlando a população do patógeno também no solo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, K.C.L. de M. **Epidemiologia da podridão vermelha do sisal no Estado da Bahia**. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, 2010.
- ADAB. **Podridão Vermelha do Sisal**. Disponível em:<http://www.adab.ba.gov.br/modules/mastop_publish/?tac=168> (Acesso em: novembro de 2010)
- ALECRIM, M. M.; SOUZA, T. C. de; TEIXEIRA, M. F. S.; SILVA, T. de A. **METABÓLITOS PRODUZIDOS POR FUNGOS DO GÊNERO *Penicillium* PROMOVEDO ANTAGONISMO FRENTE A BACTÉRIAS PATOGÊNICAS**, 62ª Reunião Anual da SBPC, FAPEAM, Universidade Federal do Amazonas. Disponível em:< <http://www.sbpcnet.org.br/livro/62ra/resumos/resumos/3607.htm>> (Acesso em: novembro de 2010)
- ALVES, M. O.; SANTIAGO, E. G.; LIMA, A. R. M. **Diagnóstico socioeconômico do setor sisaleiro no nordeste Brasileiro**. Documentos do Etene (Escritório técnico de recursos socioeconômicos do Nordeste), vol. 4, Fortaleza: Banco do Nordeste, 2004
- ALTSCHUL S. F.; MADDEN T. L.; SCHÄFFER A. A.; ZHANG J.; ZHANG Z.; MILLER W.; LIPMAN D. J. **Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs**. Nucleic Acids Research. v. 25, n. 17, pp. 3389-3402, Set. 1997.
- AUSUBEL, F.M., BRENT, R., KINGSTON, R.E., MOORE, D.P., SEIDMAN, J.G., SMITH, J.A., STRUHL, K. **Current protocols in molecular biology**. New York: Wiley Interscience, 1997
- AZEVEDO, L. A. S. de. **Danos ocasionados por fungos e as estratégias de controle**. [2004]. Disponível em:< <http://www.feagri.unicamp.br/tomates/pdfs/danfungos.pdf>> (Acesso em: novembro de 2010)
- BASTOS, C.N. **Ação antibiótica de metabólitos de *Penicillium citrinum* Thom. Sobre *Phytophthora palmivora* (Buti.) Buti**. Revista Theobroma 17(1): 31-37, Centro de Pesquisas do Cacau, Ilhéus, Bahia, Brasil, 1987.
- BATISTA, D. DA C.; SILVA, F. M.; SOUZA, W. C. O. DE; BARBOSA, M. A. G.; COSTA, V. S. DE O.; BRANDÃO, W. N.; TERAPO, D. **Manejo da Podridão Vermelha do Tronco do Sisal**, Petrolina, PE: Embrapa Semiárido, Dezembro, 2010 (Circular técnica on-line ISSN 1808-9976)
- BELTRÃO, N.E.M. A planta. In: ANDRADE, W. (Ed.). O Sisal do Brasil. 1. ed. Salvador: SINDIFIBRAS; Brasília: APEX-Brasil, 2006. p.25-28. SILVA, O. R. R. da. **O agronegócio do sisal no Brasil**. Brasília, DF: Embrapa, 1999.
- BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Eds.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v.1.

BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. **Bioncontrole de doenças de plantas: usos e perspectivas.** Embrapa meio ambiente, Jaguariúna, SP, 2009. 341p.

CARDOSO, P.G.; QUEIROZ, M.V. de; PEREIRA, O.L.; ARAÚJO, E.F. de. **Morphological and molecular differentiation of the pectinase producing fungi *Penicillium expansum* and *Penicillium griseoroseum*.** Brazilian Journal of Microbiology (2007) 38:71-77, Viçosa - MG. ISSN 1517-8283.

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

CORTEZ, F.L. **Produção e análise de metabólitos secundários de fungos filamentosos.** Dissertação mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011. Disponível em:< <http://hdl.handle.net/10183/33266>> (Acesso em: janeiro de 2012).

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

DEEPAKE, U. Aero-microbiological studies of Moisture Affected Buildings in the Indoor Environment. **Journal of Young Investigators.** v. 19, n. 11, 2009.

ETHUR, Luciana Zago ; BLUME, E. ; MUNIZ, Marlove Fátima Brião ; SILVA, Antonio Carlos Ferreira da ; STEFANELO, Daniela R ; ROCHA, Edileusa K . Fungos antagonistas a *Sclerotinia sclerotiorum* em pepineiro cultivado em estufa. **Fitopatologia Brasileira, Fortaleza**, v. 30, n. 2, p. 127-133, 2005.

FRANCESHINI, M.; GUIMARÃES, A.P.; CAMASOLA, M.; FRAZZON, A.P.; BARATO, C.M.; KOGLER, V.; SILVA, M. V. da; DUTRA, V.; NAKAZOTO, L.; CASTRO, L.; SANTI, L.; VAINSTEIN, M.H.; SCHRANK, A. **Biotechnologia aplicada ao controle biológico.** Revista Biotechnologia, Ciência e Desenvolvimento, nº23, novembro/dezembro, 2001.

FERRARONI, N. R.; GRUMACH, A. S. **O PAPEL DA PENICILINA NA MEDICINA MODERNA.** DST – Jornal brasileiro Doenças Sexualmente Transmissíveis 18(1): 7-13, SP, 2006

GIROTTI, M. J.; AQUINO, L. F. B.; PEREZ, R. B.; NEVES, M.F.; SACCO, S. R. **O uso de fungos nematófagos no controle biológico de nematóides parasitas: revisão de literatura.** Revista científica eletrônica de medicina veterinária, ano VI – Número 10 – Janeiro de 2008 – Periódico Semestral.

HOUBRAKEN J.; FRISVAD, J.C.; SAMSON R. A. **Taxonomy of *Penicillium citrinum* and related species.** Fungal Diversity, 2010. DOI: 10.1007/s13225-010-0047-z

JUKES T.H.; CANTOR C.R.. **Evolution of protein molecules.** In Munro HN, editor, Mammalian Protein Metabolism, pp. 21-132, Academic Press, New York, 1969.

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

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

LIMA, E.F. et al. **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, maio-ago. 1998.

LOCK, G.W. **Sisal**. London: Longman, 1969. 365p.

MA, Y.; CHANG, Z.; ZHAO, J.; ZHOU, M. **Antifungal activity of *Penicillium striatisporum* Pst10 and its biocontrol effect on *Phytophthora* root rot of chilli pepper**. Biological control 44, pag. 24-31, China, 2008.

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

MEMBRILLERA, J. L. G. de. **Clave determinativa de las especies del género *penicillium***. Anales de la Universidad de Murcia, ed. Murcia: Universidad de Murcia, Servicio de Publicaciones, 1950. 132ISSN: 0365-7973 Disponível em: <http://hdl.handle.net/10201/6407> (Acesso em: dezembro de 2011).

MENTEN, J. O. M.; MINUSSI, C. C.; CASTRO, C.; KIMATI, H. Efeito de alguns fungicidas no crescimento micelial de *Macrophomina phaseolina* (Tass.) Goid. "in vitro". **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 1, n. 2, p. 57-66, 1976.

MICHEREFF, S.J. **Controle Biológico de Doenças de Plantas**. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia, 2008 - Área de fitossanidade (**FITOPATOLOGIA I**). Disponível em: <http://www.unitins.br/e-learning/arquivos/blog/documentos/633246965371886349_17._controle_biologico_d_e_doencas_de_plantas.pdf> (Novembro de 2009).

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

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. Lavras: UFLA, 2006. 626 p.

NCBI. ***Penicillium* spp.** Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/> > (Acesso em: novembro de 2010).

NETO, P.A. de S.P.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. **Micro-organismos endofíticos: Interações com plantas e potencial biotecnológico**. Revista Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento, ano V, nº 29, 2002.

PALLU, A. P. de S. **Potencial biotecnológico de fungos do gênero *Penicillium* e interação com cana-de-açúcar**, 2010, 130f, Dissertação (Doutorado em Genética e Melhoramento de plantas) - Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2010.

PITT, J. I. **A laboratory guide to common *Penicillium* species**, 2000.

PORTAL DA CIDADANIA. **Território da Cidadania do Sisal – BA**. Disponível em: <http://www.territoriosdacidadania.gov.br/dotlrn/clubs/territoriosrurais/dosisalba/on-e-community?page_num=0> Acesso em: julho de 2011.

PROSSIGA. **Panorama do setor de sisal no Estado da Bahia**. Disponível em: <http://www5.prossiga.br/arranjos/vortais/sisal_ba_panorama1> Acesso em: 4 fev. 2004.

OASHI, M. C. G. **Estudo da cadeia produtiva como subsídio para pesquisa e desenvolvimento do agronegócio do sisal na Paraíba**. 1999. 253 f. Tese (Doutorado em Engenharia da Produção) – Universidade Federal da Santa Catarina, Florianópolis.

OLIVEIRA, I.S.; LUZ, E.D.M.N.; MOURA, R.M. & MAIA, L.C. **Distribuição geográfica e diversidade morfológica de culturas de *Penicillium sclerotigenum* em inhames no Brasil**. Fitopatologia Brasileira 32:131-136. 2007.

OLIVEIRA, J. A. **Efeito do tratamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativus*L.) e pimentão (*Capsicum annum* L.)**. 1991. 111 p. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

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

SAMSON, R.A. & FRISVAD, J.C. ***Penicillium* subgenus *Penicillium*: new taxonomic schemes and mycotoxins and other extrolites**. Studies in Mycology (Baarn) 49. 2004.

SARGO, C. R.; SILVA, J. V. da; SILVA, B. F. da; FILHO, E. R. **Isolamento e Identificação de Metabólitos Secundários do fungo *Penicillium griseoroseum***. Sociedade Brasileira de Química (SBQ), 31a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química [2009]. Disponível em: <<http://sec.sbq.org.br/cdrom/1ra/resumos/T0881-1.pdf>> (Acesso em: novembro de 2010).

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

SEI. **Superintendência de Estudos Econômicos e Sociais da Bahia**. Boletim de comércio exterior da Bahia, abril e junho/ 2011. Disponível em: <http://www.sei.ba.gov.br/images/releases_mensais/pdf/bce/bce_abr_2011.pdf> <

http://www.sei.ba.gov.br/images/releases_mensais/pdf/bce/bce_jun_2011.pdf
(Acesso em: janeiro de 2012)

SEMPERE, F.; SANTAMARINA, M.P. **Study of the interactions between *Penicillium oxalicum* Currie & Thom and *Alternaria alternata* (fr.) Keissler.** Brazilian Journal of Microbiology, ISSN 1517-8382, Valencia – Espanha, 2010.

SEQUEIRA, D.C.M. de; COSTA, G.L. da; BARBOSA, J.P. **Isolamento e identificação da atividade antimicrobiana dos metabólitos secundários de *Penicillium* spp.** 32ª Reunião da Sociedade Brasileira de Química, Fortaleza – CE, 2009. Disponível em: < http://sec.sbq.org.br/cdrom/32ra/lista_area_QB.htm > (Acesso em: fevereiro de 2011).

SERRA, R. **Micoflora das uvas portuguesas e seu potencial para a contaminação das uvas com micotoxinas, com destaque para a ocratoxina A.** Teste de doutorado em Engenharia Química e Biológica. Universidade do Minho, 2005. Disponível em: < <http://hdl.handle.net/1822/2579> > (Acesso em: novembro de 2011)

SHANER, G., and FINNEY, R.E.. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. **Phytopathology**, 67 : 1051-1056, 1977.

SILVA, O. R. R. da. O agronegócio do sisal no Brasil. Brasília, DF: Embrapa, 1999.

SINDIFIBRAS - **Ações p/ Prevenção e Controle da Podridão Vermelha do Sisal na Região Sisaleira do Estado da Bahia.** Disponível em: < <http://www.brazilianfibres.com.br/?p=736> > Acesso em: novembro de 2010.

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

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

STEFANO, S.De; NICOLETTI, R.; MILONE, A.; ZAMBARDINO, S. **3-o-Methylfunicone, a fungitoxic metabolite produced by the fungus *Penicillium pinophilum*.** Elsevier - Phytochemistry, Volume 52, Number 8, December 1999 , pp. 1399-1401(3). Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422\(99\)00320-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422(99)00320-9) > (Acesso em: março de 2011).

SUINAGA, F. A.; SILVA, O. R. F. da; COUTINHO, W. M. **Cultivo do sisal na região semiárida do Nordeste brasileiro.** Embrapa Algodão. Sistemas de Produção, 5, novembro de 2006.

SUINAGA, F. A.; SILVA, O. R. F. da; COUTINHO, W. M. A história do sisal no Brasil. In: ANDRADE, Wilson. (Org.). **O sisal do Brasil**. Salvador: SINDIFIBRAS/APEX, 2008, v., p. 16-21

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**. v.24, p.1596-1599, 2007.

WALLACE, M.M., DIECKMAHNS, E.C. Bole rot of sisal. **The East African Agricultural Journal**, v.18, n.1, p.24-29, 1952.

WHEELER, K. A.; B. F. HURDMAN and H. PITT. Influence of pH on the growth of some toxigenic species of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*. **International Journal of Food Microbiology**, 12: 141-150, 1991.

WIKIPEDIA. **Penicilina**. Disponível em: < <http://pt.wikipedia.org/wiki/Penicilina>> (Acesso em: Novembro de 2009).

ANEXO 1

Meio Batata Dextrose Ágar (BDA)

200g de batata

20g de dextrose

15g de Agar

1000mL de água destilada

Meio Czapek Yest Agar (CYA)

1g de K_2HPO_4

10mL de Czapek concentrado (descrito abaixo)

5g de Extrato de Levedura

30g de Sacarose

15g de Ágar

1000mL de Água destilada

1mL de solução metálica (descrita abaixo)

Czapek concentrado

30g de $NaNO_3$ (nitrato de sódio)

5g de KCL (cloreto de potássio)

5g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (sulfato de magnésio)

0,1g de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (sulfato de ferro)

0,1g de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (sulfato de zinco)

0,05g de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (sulfato de cobre)

100mL de Água destilada

Solução metálica

1% $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (sulfato de zinco)

0,5% $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (sulfato de cobre)

Meio Ágar Extrato de Malte (MEA)

30g de extrato de Malte

5 g de peptona micológica

15 g de ágar

1000 mL de água destilada

ANEXO 2

Ficha de identificação morfológica de espécies de *Penicillium*

FICHA DE IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE *Penicillium*

Características microscópicas

Colônia em CYA 25°C _____

Cor
Micélium
Exsudato
Reverso
Pigmentação solúvel
Cleistotécio/ escleródios

Colônia em CYA 37°C _____

Cor
Micélium
Exsudato
Reverso
Pigmentação solúvel
Cleistotécio/ escleródios

Colônia em MEA 25°C _____

Cor
Micélium
Exsudato
Reverso
Pigmentação solúvel
Cleistotécio/ escleródios

Colônia em CREA _____

Cor
Micélium
Exsudato
Reverso
Pigmentação solúvel
Cleistotécio/ escleródios

Características macroscópicas

Ramificação
Monoverticilado Biverticilado Tetraverticilado/poliverticilado

Conidíóforos
Comprimento
Largura
Textura

Ramificação
Comprimento
Textura

Métula
Comprimento
Textura

Fialides
Comprimento
Textura

Conídios
Diâmetro
Forma
Textura

Cleistotécio/escleródios
Diâmetro
Forma
Cor

Ascósporo
Dias de maturação
Comprimento
Largura
Forma

Identificação _____ n° _____

ANEXO 3

SEQUÊNCIAS REMOVIDAS	MOTIVO
DA639443Neosartoryafischeri	Incompleta
DA361052027P.citrinumstrainSCSGAF0167	Redundante
DA361052021P.citrinumstrainSCSGAF0141	Redundante
DA361052008P.citrinumstrainSCSGAF0103	Redundante
DA361052001P.citrinumstrainSCSGAF0092	Redundante
DA361051984P.citrinumstrainSCSGAF0052	Redundante
DA361051958P.citrinumstrainSCSGAF0003	Redundante
DA346653682P.citrinumisolateUASWS0790	Redundante
DA342325646P.citrinumstrainS36	Redundante
DA333352872P.citrinumstrainT134	Redundante
DA326579950P.citrinumstrainKUC3084	Redundante
DA326486745P.citrinum	Redundante
DA317574112P.citrinumstrainMA14	Redundante
DA310769715P.sizovaestrainCBS122387	Incompleta
DA310769710P.tropicoidesstrainCBS122410	Incompleta
DA310769707P.gorlenkoanumstrainCBS408.69	Incompleta
DA310769686P.hetheringtoniistrainDTO32E3	Incompleta
DA310659897P.citrinumisolatePCO.76	Redundante
DA309244272P.citrinumstrainMSSRFIS1	Redundante
DA300684684P.citrinumstrainGZU	Redundante
DA299810726P.citrinumstrainUASWS0352	Redundante
DA299810723P.citrinumstrainUASWS0339	Redundante
DA29501300Aschersoniasp.Ag	Incompleta
DA283099660P.griseofulvumisolateT21	Redundante

* DA = Dikaria; Ascomycota.