

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

**PODRIDÃO VERMELHA DO SISAL: PROGRESSO DA DOENÇA
EM DIFERENTES TEMPERATURAS E CONTROLE BIOLÓGICO
UTILIZANDO MISTURAS DE BACTÉRIAS**

LEONARDO DE OLIVEIRA BARBOSA

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA
FEVEREIRO – 2015**

**PODRIDÃO VERMELHA DO SISAL: PROGRESSO DA DOENÇA
EM DIFERENTES TEMPERATURAS E CONTROLE BIOLÓGICO
UTILIZANDO MISTURAS DE BACTÉRIAS**

LEONARDO DE OLIVEIRA BARBOSA

Licenciado em Ciências Agrárias

Universidade Federal da Paraíba, 2013

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

Orientador: Dr. JORGE TEODORO DE SOUZA
Co-Orientadora: Dr^a. ANA CRISTINA FERMINO SOARES

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
MESTRADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CRUZ DAS ALMAS - BAHIA – 2015

FICHA CATALOGRÁFICA

B238p

Barbosa, Leonardo de Oliveira.

Podridão vermelha do sisal: progresso da doença em diferentes temperaturas e controle biológico utilizando misturas de bactérias / Leonardo de Oliveira Barbosa. _ Cruz das Almas, BA, 2015.

83f.; il.

Orientador: Jorge Teodoro de Souza.

Coorientadora: Ana Cristina Fermino Soares.

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

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

CDD: 633.577



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias

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

Membro Presidente: Profa. Dra. Ana Cristina Fermino Soares
Instituição: UFRB

Membro Externo ao Programa: Prof. Dr. Thiago Alves Santos de Oliveira
Instituição: FAPESB / UFRB

Membro Externo à Instituição: Prof. Dr. Harllen Sandro Alves Silva
Instituição: Embrapa Mandioca e Fruticultura

Homologada em / /

Às meus avós Maria das
Graças Silva de Oliveira (in memoriam)
e José Figuerado de Oliveira pelo
amor, carinhó e dedicação que sempre
tiveram comigo.

DEDICÓ

Aos meus avós Maria das Graças Silva de Oliveira (in memoriam) e José Figueiredo de Oliveira pelo amor, carinho e dedicação que sempre tiveram comigo.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida, por ter me dado força e conforto durante os momentos difíceis que passei até chegar aqui, pelas pessoas de bom coração que o senhor pois em meu caminho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela bolsa no curso de mestrado e apoio a pesquisa. A Financiadora de Estudos e Projetos - FINEP, a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia - FAPESB, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pelo financiamento da infra-estrutura de equipamentos dos Laboratórios de Microbiologia e as casas de vegetação.

A minha avó Maria das Graças que sempre me incentivou e apoiou nos meus sonhos e mesmo em seu leito de morte nunca deixou de pensar na minha formação pessoal e profissional.

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

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

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

Ao meu orientador Dr. Jorge Teodoro de Souza, pela confiança na realização desse trabalho, pela sua orientação que mesmo distante não deixou de ajudar esclarecendo as dúvidas. Seus ensinamentos e conselhos contribuíram para o meu amadurecimento pessoal e profissional.

A minha co-orientadora Dr^a. Ana Cristina Fermino Soares por sua confiança e dedicação durante todo o período da pesquisa. Seus ensinamentos e conselhos

foram essenciais para o sucesso desse trabalho, as discussões me ajudaram a amadurecer as ideias e contribuíram com a minha formação profissional.

Ao professor Dr. Phellippe Marbach, meus agradecimentos pela disponibilização do Laboratório de Microbiologia para a realização de algumas etapas deste trabalho.

Ao pesquisador Dr. Carlos Alberto Tuão Gava, pela disponibilização do Laboratório de Controle Biológico da Embrapa Semi-árido, onde foram realizadas as etapas de preparo das mudas e etapas para a implantação dos experimentos de campo e casa de vegetação.

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

Aos amigos Jessica Lima e Valter Magalhães pela ajuda na implantação, avaliação e coleta dos experimentos. Sem a ajuda de vocês esse trabalho não teria se concretizado.

Ao Fernando Fortunado pelo apoio e ajuda constantes na realização do experimento de campo e nas avaliações semanais. Sem a sua ajuda não teria como esse trabalho ser realizado.

Ao Agricultor João Batista por permitir que o experimento de campo fosse realizado em sua propriedade.

Aos meus amigos do Laboratório de Microbiologia e Fitopatologia, pelo convívio, amizade e ajuda: Jaqueline Maria, Franciane, Eliane (Lica), Carina, Eliane (Any), Cristiane (Cris), Jack Andrade, Fabio, Cristiano, Rafael, Liane. À equipe e colegas do Laboratório de controle biológico da Embrapa Semiárido pelo convívio e ajuda.

As minhas irmãs de coração Margarida Santana e Juliana Fernandes, pelas conversas, descontração e troca de conhecimentos, por sempre transformarem meus momentos tristes em alegrias.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da UFRB, pelos ensinamentos.

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

A todos aqueles que contribuíram direta e indiretamente para a realização desse trabalho.

A todos meu muito obrigado!

*“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu,
mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre
aquilo que todo mundo vê.”*

Arthur Schopenhauer

SUMÁRIO

	Página
RESUMO ABSTRACT	
INTRODUÇÃO.....	01
 Capítulo 1 BIOCONTROLE DA PODRIDÃO VERMELHA DO SISAL POR MISTURAS DE BACTÉRIAS ANTAGONISTAS.....	16
 Capítulo 2 COMPORTAMENTO DE <i>Aspergillus niger</i> E PROGRESSO DA PODRIDÃO VERMELHA DO SISAL EM DIFERENTES TEMPERATURAS.....	41
 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	67
 ANEXO.....	69

PODRIDÃO VERMELHA DO SISAL: PROGRESSO DA DOENÇA EM DIFERENTES TEMPERATURAS E CONTROLE BIOLÓGICO UTILIZANDO MISTURAS DE BACTÉRIAS

Autor: Leonardo de Oliveira Barbosa

Orientador: Jorge Teodoro de Souza

Co-orientadora: Ana Cristina Fermino Soares

RESUMO: O sisal (*Agave sisalana* Perrine ex Engelm) é uma planta cultivada nas regiões semiáridas do Brasil que se destaca por ser a principal fonte de fibra dura vegetal do mundo e uma importante fonte de geração de renda nessas regiões. A podridão vermelha do sisal é a principal doença dessa cultura, atingindo todas as áreas de cultivo no estado da Bahia, com incidência média variando de 5 a 40%. A combinação de bactérias selecionadas como potenciais agentes de biocontrole pode representar uma estratégia para o controle desta doença. O efeito da temperatura no patossistema *Aspergillus niger* - *Agave sisalana* ainda é desconhecido. Este trabalho teve como objetivos: avaliar os isolados de *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Brevibacterium*, *Serratia* e suas combinações no controle da podridão vermelha em mudas de sisal produzidas no campo e estudar o efeito da temperatura no crescimento e esporulação de *A. niger* e no progresso da doença. Os isolados de *Paenibacillus* sp., *Bacillus pumilus*, *Brevibacterium* sp., *Serratia rubidae*, *Bacillus* sp. (2 isolados). e suas combinações apresentaram antagonismo sobre *A. niger*, inibindo significativamente o crescimento micelial em 50% e a germinação de esporos em 99%. Em campo, as bactérias e suas combinações promoveram uma redução significativa na incidência e severidade da podridão vermelha, com eficiência de controle acima de 70%. A temperatura ótima para o crescimento e esporulação de *A. niger* foi 28°C. A podridão vermelha atingiu 100% de incidência e mortalidade das plantas nas temperaturas entre 24 a 42°C. Nas temperaturas entre 12 e 18°C, a incidência da doença variou entre 5 e 45 % e a severidade entre 0,25 e 17,3 %. O patógeno parece estar bem adaptado a região semiárida da Bahia.

Palavras-chave: *Bacillus* sp., *Paenibacillus* sp., *Serratia* sp., *Agave sisalana*.

SISAL BOLE ROT DISEASE: DISEASE PROGRESSION UNDER DIFEFRENTE TEMPERATURES AND BIOLOGICAL CONTROL WITH COMBINATIONS OF BACTERIA

Autor: Leonardo de Oliveira Barbosa

Orientador: Jorge Teodoro de Souza

Co-orientadora: Ana Cristina Fermino Soares

ABSTRACT: Sisal (*Agave sisalana* Perrine ex Engelm) is cultivated in the semi-arid regions of Brazil, and has been pointed out as the main hard fiber worldwide and an important source of income for this region. Sisal bole rot disease is the most important disease of this crop, reaching all cultivated areas in Bahia State, Brazil, with average incidences varying between 5 and 40 %. The combination of bacteria selected as potential biological control agents may represent a strategy to control this disease. The effect of temperature on the patossystem *Aspergillus niger* - *Agave sisalana* is still unknown. This work aimed to study bacteria and their combination in the control of sisal bole rot disease in plants under field conditions and to study the effect of temperature on growth and sporulation of *A. niger* and on disease progression. *Paenibacillus* sp., *Bacillus pumilus*, *Brevibacterium* sp., *Serratia rubidae*, *Bacillus* sp. (2 isolates) and their combinations presented antagonism against *A. niger*, significantly inhibiting mycelium growth and spore germination. Under field conditions these bacteria and their combinations promoted a significant reduction in the incidence and severity of bole rot disease, with control efficiency above 70 %. Disease control with the combinations of bacteria was not superior to that obtained with the individual bacterial isolates. The optimum temperature for growth and sporulation of *A. niger* was 28°C. At temperatures between 24 and 42°C, bole rot disease incidence and plant mortality reached 100 %, while at temperatures between 12 and 18°C, disease incidence varied from 5 to 45 % and disease severity varied from 0.25 to 17.3 %. The pathogen seems to be well adapted to the temperatures of the semi-arid region.

Keywords: *Bacillus* sp., *Paenibacillus* sp., *Serratia* sp., *Agave sisalana*

INTRODUÇÃO

A cultura do sisal

O sisal (*Agave sisalana* Perrine ex Engelm) é uma planta pertencente à classe das monocotiledôneas, família *Agavaceae* e gênero *Agave*, que abriga cerca de 300 espécies, em diferentes regiões tropicais (MEDINA, 1954; JUDD et al., 2007 citado por NETO e MARTINS, 2012). É uma espécie xerófila adaptada ao clima quente, alta luminosidade e estiagens prolongadas. Cresce principalmente em ambientes áridos e semiáridos na China, Brasil, México, Tanzânia, África do Sul e Moçambique, embora seja nativo da América do Norte, com seu centro de origem no México (BROWN, 2002).

A fibra de sisal é a principal fibra dura produzida no mundo, correspondendo a aproximadamente 70% da produção comercial de todas as fibras duras (MARTIN et al., 2009). Os principais países produtores de fibra de sisal no mundo são: Brasil, Tanzânia, Quênia, Venezuela, e Madagascar. Também a China, África do Sul, Moçambique, Haiti e Cuba contribuem com quantidades menores (SHARMA e VARSHNEY, 2012).

O Brasil foi o maior produtor e exportador mundial de fibra de sisal em 2013, com a produção brasileira desta fibra estimada em 82,3 mil toneladas (CONAB, 2013). No Brasil, destacam-se os estados da Bahia, Paraíba, Ceará e Rio Grande do Norte como os principais produtores, com respectivamente 95,8%, 3,5%, 0,4% e 0,3% da produção nacional. Historicamente, 80% da produção são exportados, principalmente para os Estados Unidos, China, México e Portugal (IBGE, 2011; CONAB, 2013). A fibra do sisal, beneficiada ou industrializada, representa cerca de 80 milhões de dólares em divisas para o Brasil (SILVA e BELTRÃO, 1999; SILVA et al., 2008).

O cultivo do sisal no Brasil se concentra em áreas de pequenos produtores, com predomínio da agricultura familiar. Essa cultura tem se destacado pela capacidade de geração de emprego e renda para mais de 800 mil pessoas na região semiárida nordestina (ALVES e SANTIAGO, 2006; SILVA e COUTINHO, 2006; CONAB, 2013). Constitui um importante agente de fixação do homem ao semiárido, sendo, em algumas dessas regiões, a única alternativa de cultivo com resultados econômicos satisfatórios (MARTIN, et al., 2009; SILVA e BELTRÃO, 1999; SUINAGA

et al., 2006; BANDEIRA e SILVA, 2006). A cadeia de serviços envolvida na produção de sisal abrange atividades que vão desde a manutenção das lavouras, extração e processamento da fibra, até a industrialização e confecção de diversos produtos (SILVA e BELTRÃO, 1999).

Apesar da grande relevância econômica e social representada por esta cultura para o Estado da Bahia e para o Brasil (GAMA et al., 2014; SANTOS et al., 2014), estudos recentes têm indicado que a Bahia vem apresentando um acentuado declínio na atividade sisaleira, com redução tanto da área plantada quanto da produção (CONAB, 2013). Na década de 1980, a produção média do Brasil girou na casa das 200.000t, caindo para 100.000t na década de 1990 e 60.000t em 2010. Recuperou-se em 2011 com uma produção de 111.000t e voltou a cair em 2012 com uma produção entre 80 a 90.000t (CONAB, 2013).

Os fatores que contribuíram para esse declínio são: o baixo aproveitamento da planta (apenas a fibra), o baixo valor pago pela fibra, a competição com os fios sintéticos, o alto custo inicial de produção, a falta de máquinas modernas para a colheita e beneficiamento, os longos períodos de estiagem, a falta de tecnologias para o manejo adequado dos plantios e a elevada incidência da podridão vermelha do sisal, principal problema fitossanitário da cultura que tem aumentado nesses últimos anos (COUTINHO et al., 2006a; SILVA, 2012).

Podridão vermelha do sisal

Apesar da planta de sisal possuir características morfológicas que conferem uma barreira natural à penetração de microrganismos patogênicos, isso não impede que a planta seja afetada por doenças capazes de causar sérios prejuízos (BOCK, 1965 citado por SILVA et al., 2008).

Há várias doenças que afetam o sisal, mas apenas duas foram relatadas até o presente no Brasil: a antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum agaves* Cav. (MEDINA, 1954), que não se constitui propriamente em um problema fitossanitário de importância econômica, e a podridão vermelha do sisal (LIMA et al., 1998; COUTINHO et al., 2006b; SOARES et al., 2006; SANTOS et al., 2014), que nos últimos anos tem ameaçado ainda mais a sustentabilidade desta cultura (ALVES et al., 2005).

A podridão vermelha do sisal é o principal problema fitossanitário da cultura no Brasil. A doença causa a morte das plantas infectadas, ocorre em todos os estádios fenológicos, desde o rebento até plantas do final do ciclo produtivo (SILVA et al., 2008). A doença afeta a cultura em todas as áreas produtoras do estado da Bahia, com incidência variando de 5 a 40% (ABREU, 2010).

A podridão vermelha do sisal é caracterizada pelo escurecimento dos tecidos internos do caule e base das folhas; as áreas colonizadas pelos agentes etiológicos da doença variam da coloração cinza escuro ao rosa pálido e se estendem da base das folhas à base do caule da planta. Em plantas infectadas, ocorre a murcha e o amarelecimento das folhas. Em estágios mais avançados da doença, o caule apodrece, a planta morre e tomba (SILVA et al., 2008).

No Brasil, *Lasiodiplodia theobromae* (LIMA et al., 1998) e *Aspergillus niger* (COUTINHO et al., 2006a; COUTINHO et al., 2006b; SOARES et al., 2006; SANTOS et al., 2014) foram relatados, causando a podridão vermelha do sisal. Nos Estados da Paraíba e Bahia foi identificado somente o fungo *Aspergillus niger* causando a doença (COUTINHO et al., 2006a; COUTINHO et al., 2006b; SOARES et al., 2006). Entretanto Santos et al., (2014) identificaram, por meio de métodos moleculares, várias espécies da seção Nigri do gênero *Aspergillus* como capazes de causar sintomas de podridão vermelha. Estes autores relataram que, além de *A. niger*, *A. tubingensis* e *A. brasiliensis* também incitam sintomas de podridão vermelha no caule do sisal, quando inoculados em condições de casa de vegetação.

Não existe nenhum controle curativo e preventivo para a podridão vermelha do sisal. Porém, algumas medidas preventivas podem ser implementadas no manejo da doença, como arrancar e queimar plantas com sintomas da doença, utilizar rebentos provenientes de campos saudáveis para implantação de novos campos e utilizar o resíduo do desfibramento como adubação orgânica para melhorar a fertilidade do solo (SILVA et al., 2008).

Aspergillus niger

O gênero *Aspergillus* constitui um grupo taxonômico diverso, e com relativa importância em diversos segmentos da sociedade. Organismos pertencentes a esse grupo possuem importância agrícola, científica, cultural, farmacêutica, industrial e patológica (VARGA et al., 2011). Muitas espécies desse gênero causam deterioração

de alimentos, mas também são utilizadas na indústria de fermentação para a produção de enzimas hidrolíticas, tais como amilases ou lipases, e ácidos orgânicos, tais como ácido cítrico e ácido glucônico (VARGA et al., 2000).

Aspergillus niger encontra-se na seção Nigri do gênero *Aspergillus*. Embora a principal fonte de isolamento das espécies dessa seção seja o solo, podem ser isolados a partir de variados ambientes, sendo encontrados em quase todos os locais do planeta, degradando uma ampla gama de substratos orgânicos naturais, crescendo e se reproduzindo em diferentes fontes, mostrando uma enorme adaptabilidade nutricional (ABARCA, et al., 2004; SAMSON et al., 2004; BAKER e BENNETT, 2008; VARGA et al., 2011).

Muitas espécies de *Aspergillus* são encontradas na natureza, vivendo de forma saprofítica, causando podridão em órgãos vegetais, a exemplo de sementes armazenadas em condições de elevada umidade (FELIX, 2007). Além de ser relatado como agente etiológico da podridão vermelha do sisal, *A. niger* também é relatado causando podridões pós-colheita em outras culturas de importância econômica como amendoim (MORAES et al., 1997), uva (CAMARGO et al. 2011), e cebola (SANTIAGO e UENO 2011).

É um fungo considerado oportunista, que só penetra em tecidos injuriados do hospedeiro, necessitando de lesões de origem mecânica ou fisiológica, para que se dê a infecção. Nesse sentido, os ferimentos causados pelo corte das folhas para o desfibramento e aqueles causados por instrumentos utilizados para realização de tratamentos culturais, constituem importantes meios para penetração do fitopatógeno (LOCK, 1962; LIMA et. al.,1998; COUTINHO et al., 2006a). Entretanto, existem estudos demonstrando que o instrumento de corte das folhas de sisal não é o veículo de transmissão do patógeno (SILVA, 2012).

De acordo com Schuster et al. (2002), *A. niger* cresce na faixa de temperatura de 6 a 47 °C, com temperatura ótima de crescimento variando entre 35 e 37 °C, e na faixa de pH entre 1,4 e 9,8. Rippel e Baldes 1955, citados por Deepake (2008) ressaltam que essas características, além da produção de esporos e sua dispersão pelo ar, garantem que este fungo esteja frequentemente presente em ambientes com elevada temperatura e umidade.

No Brasil, o sisal é cultivado na região semiárida, principalmente no Estado da Bahia, onde a temperatura média anual de 27 °C favorece o desenvolvimento da doença e a disseminação do agente.

Combinação de micro-organismos antagonistas como estratégia de biocontrole de doenças de plantas

A utilização de microorganismos nos sistemas agrícolas, sejam estes para a melhor ciclagem de nutrientes no solo e melhor absorção destes pelas plantas, ou para o controle biológico de fitopatógenos, constitui uma importante ferramenta para a obtenção de agroecossistemas mais equilibrados (MORANDI; BETTIOL, 2009).

O controle biológico visa manter, por meio de determinadas práticas, um equilíbrio no agroecossistema, de modo que o hospedeiro, na presença do patógeno, não sofra danos significativos, com a atividade de biocontrole dos organismos não patogênicos do sistema (GRIGOLETTI JÚNIOR et al., 2000).

A maioria das abordagens para o controle biológico de doenças de plantas tem utilizado apenas um único agente antagonista para o controle de doenças (WILSON e BACKMAN, 1999). Essa abordagem de controle tem apresentado algumas inconsistências em campo, pois um único agente de controle pode não ser ativo em todas as condições do ambiente (RAUPACH e KLOEPPER 1998).

Nos últimos anos, várias estratégias foram analisadas para aumentar a eficiência do controle biológico de fitopatógenos. Dentre estas, destaca-se o uso de antagonistas combinados (JANISEWICZ, 1998). O controle biológico baseado na combinação de micro-organismos tem apresentado melhores resultados na redução de doenças do que o uso individual desses agentes em diversas culturas (JANISIEWICZ, 1996; De BOER et al., 1999; De BOER et al., 2003; ABEYSINGHE, 2009; AKRAMI et al., 2009; GOLZARI et al., 2011; ZANGOEI et al., 2014).

O controle biológico com combinação de micro-organismos, pode ampliar o espectro de ação sobre diferentes patógenos devido ao envolvimento de vários mecanismos de biocontrole, tais como indução de resistência, competição por nutrientes e produção de antibióticos (PIERSON & WELLER, 1994, JANISIEWICZ, 1988; DUFFY & WELLER, 1995, MISHRA et al, 2011), além de estabilizar o efeito

controlador sob diferentes condições de cultivo e de ambiente (RAUPACH & KLOEPPER, 1998; De BOER et al., 2003).

Influência da temperatura no desenvolvimento de doenças em plantas

Para se traçar estratégias que sejam eficientes no controle de doenças em plantas é essencial conhecer as condições que favorecem o desenvolvimento do patógeno, bem como as condições que predispõem a planta ao ataque do agente patogênico. Os fatores ambientais são os que afetam mais intensamente o início e o progresso de doenças infecciosas em plantas (AGRIOS, 2005).

O surgimento de uma doença é resultante da interação de três fatores: planta suscetível, agente patogênico e ambiente favorável. O ambiente, portanto, é um componente relevante nesta interação, podendo impedir a ocorrência da doença, mesmo na presença de ambos, hospedeiro e patógeno (VALE et al., 2004).

Segundo Silveira et al., (2001) a temperatura e a umidade na superfície da planta são os fatores ambientais que afetam mais intensamente o início e o progresso de doenças infecciosas em plantas, ressaltando que os patógenos diferem em suas preferências por alta ou baixa temperatura, uma vez que a mesma afeta o crescimento destes.

A temperatura ainda exerce um papel vital tanto na infecção quanto na colonização do hospedeiro pelo patógeno, constituindo-se na variável climática mais correlacionada com as respostas biológicas (AGRIOS, 2005; DIAS et al., 2005).

Quando fatores abióticos, como a temperatura, ocorrem em níveis acima ou abaixo de um determinado intervalo tolerado pelas plantas, favorecem o surgimento de doenças (AGRIOS, 2005). Ainda segundo o autor, a temperatura afeta o progresso de doenças em plantas, e os sintomas aparecem mais rapidamente quando a temperatura é ótima para o crescimento e disseminação do patógeno, e quando esta está acima ou abaixo da ideal para o desenvolvimento do hospedeiro.

Dessa forma, trabalhos que visem determinar condições favoráveis ao patógeno, e as condições que predispõem a planta a estes, são imprescindíveis para direcionar estratégias para o controle de doenças de plantas (SILVEIRA et al., 2004; DIAS et al., 2005; SOARES et al., 2008).

Na literatura científica não foram encontrados estudos sobre a influência da temperatura no desenvolvimento da podridão vermelha do sisal e nem no crescimento e germinação do agente etiológico *A. niger*. Essas informações são primordiais para a melhor compreensão do patossistema *A. niger* – *Agave sisalana* e para o desenvolvimento de estratégias de controle mais efetivos em plantios de sisal no semiárido nordestino.

Diante do exposto, tornam-se necessários estudos sobre a influência da temperatura ambiente e sobre a seleção de agentes eficiente para a prevenção e controle da podridão vermelha do sisal.

Este trabalho é apresentado em dois capítulos. O primeiro sobre a utilização de misturas de bactérias antagônicas a *A. niger*, no controle preventivo da podridão vermelha em campo. E o segundo capítulo refere-se ao estudo de diferentes temperaturas sobre o progresso da podridão vermelha no sisal e sobre o crescimento e esporulação de *A. niger*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ABEYSINGHE, S. Effect of combined use of *Bacillus subtilis* CA32 and *Trichoderma harzianum* RU01 on Biological Control of *Rhizoctonia solani* on *Solanum melongena* and *capsicum annum*. **Plant Pathology Journal**, v. 8, n. 1, p. 9-16, 2009.

ABREU, K. C. L. de M. **Epidemiologia da podridão vermelha do sisal no Estado da Bahia**. 2010. 100f. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. Cruz das Almas, 2010.

AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. — 5th ed., Academic Press. 2005. 922 p.

AKRAMI, M; IBRAHIMOV, A. Sh; ZAFARI, D. M; VALIZADEH, E. Control *Fusarium* rot of bean by combination of by *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma asperellum* in greenhouse condition. **Agricultural Journal**, v.4, n. 3, p.121-123, 2009.

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

ALVES, M. O; SANTIAGO, E. G. Tecnologia e relações sociais de produção no setor sisaleiro nordestino. **Revista Econômica do Nordeste**, Fortaleza, v.37, n.3, p.368-381, 2006.

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

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

BETTIOL, W; GHINI, R. Controle biológico. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L (Eds). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. 10 p.

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

CAMARGO, R. B; PEIXOTO, A. R; TERAQ, D; ONO, E. O; CAVALCANTI, L. S. Fungos causadores de podridões pós-colheita em uvas apirênicas no pólo agrícola de Juazeiro-Ba e Petrolina-Pe. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 24, n. 1, p. 15-19, 2011.

CONAB, 2013. **Companhia Nacional de Abastecimento**. Sisal – safra 2012/2013: comercialização – proposta de ações. Brasília-DF, 01 de outubro de 2012.

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

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

De BOER, M.; BOM, P.; KINDT, F.; KEURENTJES, J. J. B.; VAN DER SLUIS, I.; VAN LOON, L. C.; BAKKER, P. A. H. M. Control of Fusarium wilt of radish by combining *Pseudomonas putida* strains that have diferente disease-suppressive mechanisms. **Phytopathology**, v. 93, p.626-632, 2003.

De BOER, M.; VAN DER SLUIS, I.; VAN LOON, L. C.; BAKKER, P. A. H. M. Combining fluorescent *Pseudomonas* spp. strains to enhance suppression of *fusarium* wilt of radish. **European Journal of Plant Pathology**, v.105, p. 201-210, 1999.

DEEPAKE, U. Aero-microbiological studies of Moisture Affected Buildings in the Indoor Environment. **Journal of Young Investigators**, v. 19, n.11, p.1-10, 2008.

DIAS, M.B; POZZA. E.A.; ABREU, M.S.; MIRANDA, E. O. Efeito da temperatura no crescimento micelial, produção e germinação de conídios de *Colletotrichum* spp. isolados de *Coffea arabica* L. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, n. 3, p. 545-552, 2005.

DUFTY, B. K.; WELLER, D. M. Use of *Gaeumanomyces graminis* var. Graminis alone and in combination with flourescent *Pseudomonas* spp. to supress take-all of wheat. **Plant Disease**, v.79, p.907-911, 1995.

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

GAMA, E. V. S.; SILVA, F.; SANTOS, I.; MALHEIRO, R.; SOARES, A. C. F.; PEREIRA, J. A.; ARMOND, C. Homeopathic drugs to control red rot disease in sisal plants. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 35, n. 2, p.649-656, 2014.

GOLZARI, H.; AHMADZADEH, M.; PANJEHKEH, N.; SALARI, M.; SEDAGHATI-KHORAVI, E. The effects of some biocontrol agents and their combination on root-knot disease on tomato. **Insight Plant Disease**, v. 1, n.1, p. 1-11, 2011.

GRIGOLETTI JÚNIOR, A.; SANTOS, Á. F. dos.; AUER, C. G. Perspectivas do uso do controle biológico contra doenças florestais. **Floresta**, v. 30, n. 2, p.155-165, 2000.

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

JANISIEWICZ, W. Ecological diversity, niche overlap, and coexistence of antagonists used in developing mixture for biocontrol of postharvest disease of apple. **Phytopathology**. v.86, p.473-479, 1996.

JANISIEWICZ, W. J. Biocontrol of postharvest diseases of apples with antagonist mixtures. **Phytopathology**, v.78, p.194-198, 1988.

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

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

LOCK, G.W. **Sisal**. London: Longmans, 1962. 355p.

MAGALHÃES, V. C. **Uso de isolados bacterianos no controle da podridão vermelha do sisal**. 2013. 93f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do

Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. Cruz das Almas, 2013.

MARTIN, A. R.; MARTINS, M. A.; MATTOSO, L. H. C.; SILVA, O. R. R. F. Caracterização química e estrutural de fibra de sisal da variedade *Agave sisalana*. **Polímeros**, São Carlos, v. 19, n. 1, p. 40-46, 2009.

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

MISHRA, D. S.; GUPTA, A. K; PRAJAPATI, C. R; SINGH, U. S. Combination of fungal and bacterial antagonists for management of root and stem rot disease of soybean. **Pakistan Journal of Botany**, v.43, p.2569-2574, 2011.

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

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

PIERSON, E. A.; WELLER, D. M. Use of mixtures of fluorescent pseudomonads to suppress take-all and improve the growth of wheat. **Phytopathology** v.84, p.940-947, 1994.

RAUPACH, G. S.; KLOEPPER, J. W. Mixtures of plant growthpromoting rhizobacteria enhance biological control of multiple cucumber pathogens. **Phytopathology**, v.88, p. 1158-1164, 1998.

RIPPEL-BALDES A. **Grundzüge der Mikrobiologie**, 3rd edn. Springer, Berlin Heidelberg, New York, 1955.

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

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

SANTIAGO, M.F.; UENO, B. Eficácia da mistura de trifloxistrobina com tebuconazol no controle de *Aspergillus niger* em bulbos de cebola. In: Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 44, 2011. Bento Gonçalves. [Resumos.] **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 36 (Suplemento), Agosto 2011.

SANTOS, A. F. de J.; MARTINS, C. Y. S.; SANTOS, P. O.; CORRÊA, É. B.; BARBOSA, H. R.; SANDOVAL, A. P. S.; OLIVEIRA, L. M.; SOUZA, J. T. de; SOARES, A. C. F. Diazotrophic bacteria associated with sisal (*Agave sisalana* Perrine ex Engelm): potential for plant growth promotion. **Plant and Soil**, p. 1-12, 2014.

SANTOS, P. O.; SILVA, A. C. M da.; CORRÊA, É. B.; MAGALHÃES, V. C.; SOUZA, J. T. Additional species of *Aspergillus* causing bole rot disease in *Agave sisalana*. **Tropical Plant Pathology**, v. 39, n.4, p.331-334, 2014.

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

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

SILVA, J. R. Q. **Agente etiológico da podridão vermelha do sisal: Densidade populacional, sobrevivência, caracterização genética e de agressividade**. 2012.

98f. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Cruz das Almas, 2012.

SILVA, M. H. S. da. **Aspectos bioecológicos de *Aspergillus niger*, fungo causador da podridão vermelha do sisal.** 2012. 99f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Cruz das Almas, 2012.

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

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

SILVEIRA, N.S.S., MICHEREFF, S.J., MARIANO, R.L.R., TAVARES, L.A. & MAIA, L.C. Influência da temperatura, período de molhamento e concentração do inóculo de fungos na incidência de podridões pós-colheita em frutos de tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, p. 33-38, 2001.

SILVEIRA, E. B; MARIANO, R. L. R; MICHEREFF, S. J; OLIVEIRA, S. M. A. Influência da temperatura, umidade, concentração de inóculo de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* e idade do fruto no desenvolvimento da mancha-aquosa em melão. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, p.034-038, 2004.

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

SOARES, A. R.; LOURENÇO, S. A.; AMORIM, L. Infecção de goiabas por *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum acutatum* sob diferentes temperaturas e período de molhamento, **Tropical Plant Pathology**, v. 33 n. 4, p. 265-272, 2008.

SUINAGA, F. A.; SILVA, O. R. R. F.; COUTINHO, W. M. **Cultivo de Sisal na Região Semiárida do Nordeste Brasileiro, Sistemas de Produção**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Centro Nacional de Pesquisa de Algodão, Campina Grande, PB, 2006, 42 p.

VALE, F. X. R.; JESUS JUNIOR, W. C.; ZAMBOLIM, L. **Epidemiologia Aplicada ao Manejo de Doenças de Plantas**. Belo Horizonte: Perfil Editora, 2004. 531p.

VARGA, J.; FRISVAD, J. C.; KOCSUBÉ, S.; BRANKOVICS, B.; TÓTH, B.; SZIGETI, G.; SAMSON, R. A. New and revisited species in *Aspergillus* section *Nigri*. **Studies in Mycology** 69:1-17, 2011.

VARGA J.; KEVEI, F.; HAMARI, Z.; TÓTH, B.; TÉREN, J. et al. Genotypic and phenotypic variability among black *Aspergilli*. In: *Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification*. (Samson RA, Pitt JI, editors., eds). **Amsterdam, Harwood Academic Publishers**: p. 397–411, 2000.

WILSON, M.; BACKMAN, P. A. Biological control of plant pathogens. In: *Handbook of Pest Management*. J. R. Ruberson, ed. **Marcel Dekker Publishers, New York**. In press 1999.

ZANGOEI, E.; ETEBARIAN, H. R.; SAHEBANI, N. Biological control of apple gray mold by mixtures of *Bacillus Subtilis* and yeast isolates. **African Journal of Food Science**, v. 8, n. 3, p. 155-163, 2014.

CAPÍTULO 1

BIOCONTROLE DA PODRIDÃO VERMELHA DO SISAL POR MISTURAS DE BACTÉRIAS ANTAGONISTAS¹

¹Artigo a ser ajustado e submetido à periódico científico

BIOCONTROLE DA PODRIDÃO VERMELHA DO SISAL POR MISTURAS DE BACTÉRIAS ANTAGONISTAS

RESUMO: A podridão vermelha do sisal é a principal doença da cultura do sisal no Brasil e vem contribuindo para diminuição da produção no país. Apesar da importância econômica da doença na cultura do sisal, não existe nenhum controle preventivo ou curativo. O controle biológico com ênfase na combinação de agentes de biocontrole pode apresentar uma forma eficiente de controlar essa doença. O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito do uso de isolados de bactérias de forma individual e combinada no controle da podridão vermelha do sisal. Foram testados seis isolados bacterianos: *Paenibacillus* sp. (512); *Bacillus pumilus* (105); *Brevibacterium* sp. (90); *Serratia rubidaea* (127); *Bacillus* sp. (BMH e INV). Para determinar as combinações a serem testadas nos experimentos, foi realizado um teste de compatibilidade *in vitro*. Após o teste seguiu-se apenas com as combinações compatíveis nos ensaios *in vitro* e *in vivo*. A inibição da germinação de esporos de *A. niger* foi maior nos tratamentos com os isolados 512 (99,3%), 105 (98%), BMH (98,5%), INV (97,5%) e as combinações 512+105 (99,3%), 90+127 (97,5%) e 127+INV (98,3%). Na inibição do crescimento micelial de *A. niger* destacaram os tratamentos com as bactérias 512 (49,9%) e BMH (44,1%) e a combinação 512+105 (43,5%). No campo, houve menor incidência da doença para os tratamentos com os isolados 512 (55,5%), 105 (57,7%), 127 (53,3%), 90 (53,3), BMH (55,5%), INV (51,1%) e as combinações 127+105 (48,8%) e 127+INV (51,1%). O melhor controle da doença foi alcançado pelos tratamentos com os isolados 512 (76,4%), 105 (76,1%), BMH (73%), INV (78,1%) e as combinações 127+105 (72,8) e 127+INV (76,7%). A combinação dessas bactérias não proporcionou aumento nos resultados de controle *in vitro* e *in vivo*, apresentando resultados semelhantes ao das bactérias individuais. Conclui-se que as bactérias testadas possuem potencial antagônico sobre *A. niger*, em mudas crescidas em campo, proporcionaram redução significativa da doença, mas a combinação dessas bactérias não é recomendada.

Palavras-chave: *Bacillus* sp., *Paenibacillus* sp., *Serratia* sp., severidade, incidência.

BIOCONTROL OF SISAL BOLE ROT DISEASE WITH ANTAGONISTIC BACTERIA AND THEIR COMBINATIONS

ABSTRACT: Sisal bole rot disease is the main phytosanitary problem of this plant in Brazil. Even though sisal is an important crop, there is no control measure available for the disease. The combination of biocontrol agents may be an efficient way to control the disease. The objective of this study was to investigate the effect of antagonistic bacteria applied individually or in combination on the control of bole rot disease. Six isolates were used: *Paenibacillus* sp. (512); *Bacillus pumilus* (105); *Brevibacterium* sp. (90); *Serratia rubidaea* (127); *Bacillus* sp. (BMH and INV). The compatibility between isolates was determined in an *in vitro* assay. Only the compatible combinations were tested in further experiments. The inhibition of *A. niger* spore germination was higher for treatments with isolates 512 (99,3%), 105 (98%), BMH (98,5%), INV (97,5%) and the combinations 512+105 (99,3%), 90+127 (97,5%) and 127+INV (98,3%). Higher inhibition of *A. niger* mycelial growth was obtained with isolates 512 (49,9%) and BMH (44,1%) and the combination 512+105 (43,5%). In the field, the lowest disease incidence was provided by isolates 512 (55,5%), 105 (57,7%), 127 (53,3%), 90 (53,3), BMH (55,5%), INV (51,1%) and the combinations 127+105 (48,8%) and 127+INV (51,1%). The best disease control was given by treatments with isolates 512 (76,4%), 105 (76,1%), BMH (73%), INV (78,1%) and the combinations 127+105 (72,8) and 127+INV (76,7%). The combination of bacterial isolates did not provide increased protection against bole rot in *in vitro* and *in vivo* experiments when compared to the individual isolates. In conclusion, the bacterial isolates have potential to control *A. niger* and significantly reduced the disease in sisal plants grown under field conditions, but the combination of isolates is not recommended.

Keywords: *Bacillus* sp., *Paenibacillus* sp., *Serratia* sp., Severity, Incidence.

INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor e exportador mundial da fibra de sisal. Em 2013 a produção brasileira de fibra foi de 82,3 mil toneladas (MARTIN et al., 2009; CONAB, 2013, SANTOS et al., 2014). Dentre os Estados produtores, a Bahia é o maior produtor com 95,8% da produção nacional (CONAB, 2013).

A cadeia produtiva do sisal é uma importante atividade econômica, destacando-se pela geração de emprego e renda para mais de 800 mil pessoas na região semiárida (SILVA e COUTINHO, 2006; CONAB, 2013).

A podridão vermelha do sisal é o principal problema fitossanitário da cultura no Brasil. Na Bahia, a doença tem prevalência de 100% nas áreas produtoras de sisal, com incidência média variando de 5 a 40% (COUTINHO et al., 2006a; SILVA et al., 2008; ABREU, 2010). As folhas da planta de sisal afetada pela podridão vermelha tornam-se impróprias para o desfibramento, diminuindo a produção e gerando prejuízos para os produtores. O fungo *Aspergillus niger* foi identificado pela morfologia e por técnicas moleculares como o agente causal da podridão vermelha do sisal (COUTINHO et al., 2006a; COUTINHO et al., 2006b; SOARES et al., 2006; SANTOS et al., 2014).

Não existe nenhum controle curativo e preventivo para a podridão vermelha do sisal, sendo os tratamentos culturais a única forma de diminuir o avanço da doença nas áreas produtoras (SILVA et al., 2008). Nesse contexto, o controle biológico surge como uma estratégia de controle para a podridão vermelha do sisal. Pesquisas realizadas por Santos, (2012) e Magalhães, (2013) com bactérias antagonistas tem apresentado resultados promissores no controle dessa doença.

Uma forma de se aumentar o efeito do biocontrole em doenças de plantas é a combinação de micro-organismos. Essa abordagem têm apresentado melhores resultados na redução de doenças do que o uso de um único agente em diversas culturas (De BOER et al., 1999; JANISIEWICZ, 1996; De BOER et al., 2003). O biocontrole com misturas de antagonistas, amplia o espectro de ação devido ao envolvimento de vários mecanismos de biocontrole, tais como indução de resistência, competição por nutrientes e produção de antibióticos (PIERSON & WELLER, 1994, JANISIEWICZ, 1988; DUFFY & WELLER, 1995, MISHRA et al, 2011).

O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito de isolados de bactérias dos gêneros *Paenibacillus*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Serratia* e suas combinações sobre *Aspergillus niger* e no controle da podridão vermelha do sisal.

MATERIAL E MÉTODOS

Isolados bacterianos e seu cultivo

Os isolados bacterianos utilizados foram provenientes da coleção de cultura dos Laboratório de Microbiologia e Fitopatologia da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, conservados em glicerol 30% e mantidos em -80°C. Estes isolados foram previamente selecionados como potenciais agentes de biocontrole de *A. niger* por outros membros do grupo de pesquisa da UFRB (Tabela 1).

Tabela 1. Isolados bacterianos utilizados, codificação e coleção de cultura.

ISOLADOS	CÓDIGO	COLEÇÃO	LABORATÓRIO
<i>Paenibacillus</i> sp.	512	Silva, (2012)	Fitopatologia
<i>Bacillus pumilus</i>	105	Silva, (2012)	Fitopatologia
<i>Brevibacterium</i> sp.	90	Silva, (2012)	Fitopatologia
<i>Serratia rubidaea</i>	127	Silva, (2012)	Fitopatologia
<i>Bacillus</i> sp.	BMH	Magalhães, (2013)	Microbiologia
<i>Bacillus</i> sp.	INV	Magalhães, (2013)	Microbiologia

Avaliação da compatibilidade entre bactérias antagonistas

Para determinar as combinações que seriam usadas nos testes de biocontrole, foi realizado um teste de compatibilidade *in vitro* entre as bactérias, seguindo a metodologia descrita por Fukui et al. (1994). As bactérias foram crescidas em meio líquido Caldo Nutriente (Extrato de carne 3 g e Peptona 5 g para 1 L), sob constante

agitação a 120 rpm a $28 \pm 2^\circ \text{C}$ por 12 h. Após esse período, foram retirados 2 mL do meio e transferidos para microtubos. Estes microtubos foram centrifugados a 12000 rpm por 3 min, em seguida foi removido o sobrenadante e as células bacterianas foram ressuspensas em solução salina. Na sequência, fez-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro (600 nm) e as bactérias foram ajustadas numa densidade ótica (OD) de 0,5 que corresponde a diferentes UFC mL^{-1} para cada bactéria, sendo: *Paenibacillus* sp (512) = 2×10^8 , *Bacillus pumilus* (105) = $2,5 \times 10^{10}$, *Brevibacterium* sp (90) = $2,5 \times 10^{10}$, *Serratia rubidae* (127) = $1,5 \times 10^{10}$, *Bacillus* sp (BMH) = $4,8 \times 10^8$ e *Bacillus* sp (INV) = $7,5 \times 10^8$ UFC mL^{-1} . Após o ajuste, as bactérias foram riscadas horizontalmente e verticalmente umas com as outras nos meios Ágar Triptona de Soja (TSA) 1/10 e Ágar Nutriente (NA), com quatro placas para cada meio de cultura e para cada combinação de bactérias. As placas foram incubadas à temperatura de $28 \pm 2^\circ \text{C}$ durante 72 h. A avaliação foi qualitativa observando a zona de inibição. Ausência de zona de inibição indicou compatibilidade entre as bactérias e a presença da zona de inibição indicou incompatibilidade (Figura 1).

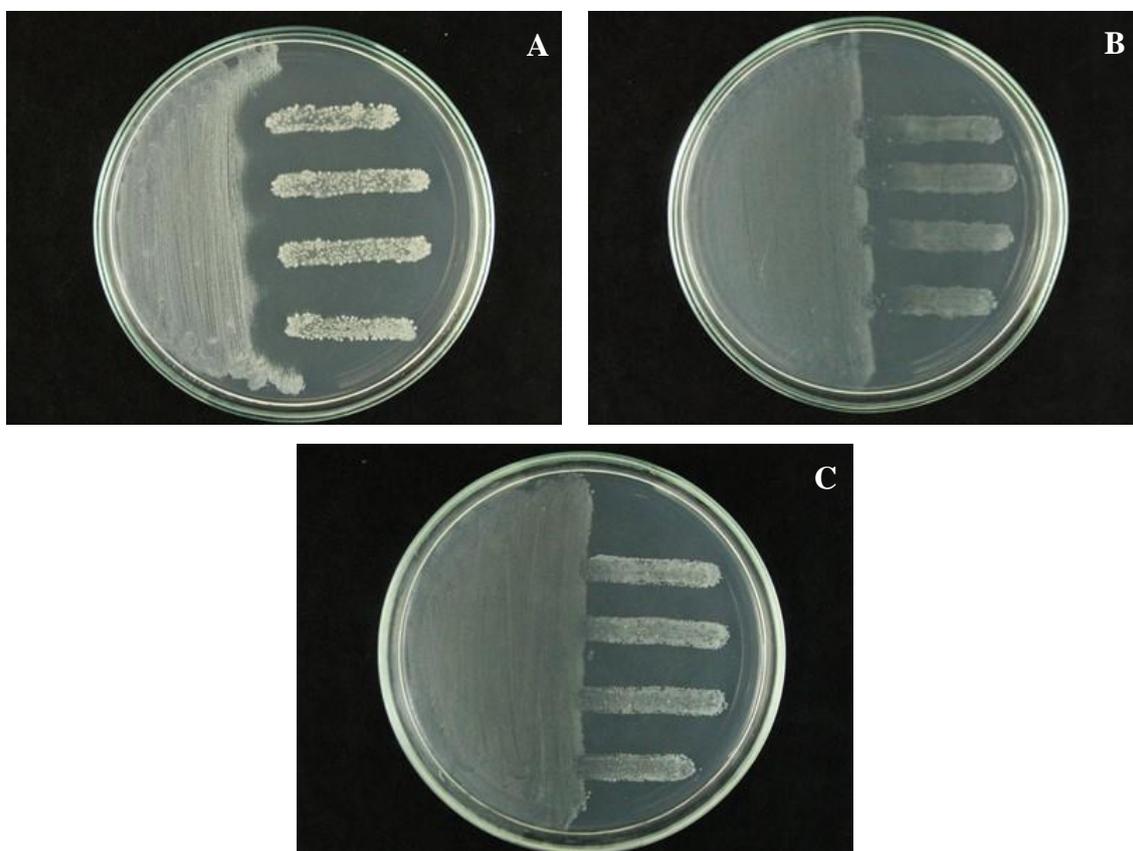


Fig. 1. Teste de compatibilidade entre as bactérias *in vitro* em meio TSA 1/10: **(A)** e **(B)** - Combinação incompatível e **(C)** – Combinação compatível.

Efeito das bactérias antagonistas e suas combinações sobre a germinação de esporos de *A. niger*

As bactérias foram crescidas e as concentrações ajustadas em espectrofotômetro como descrito anteriormente.

O isolado 131 de *A. niger* foi crescido em meio BDA (Batata Dextrose Agar) a $28 \pm 2^\circ \text{C}$ por 8 dias. Para obtenção dos esporos foram adicionados 20 mL de água destilada esterilizada e duas gotas de Tween 20® na placa e a cultura foi raspada com alça de Drigalsky. A concentração de esporos foi ajustada para 1×10^5 conídios mL^{-1} .

O teste foi montado em placa de ELISA sendo adicionados em cada poço 50 μL de meio líquido BD (Batata Dextrose), 100 μL da suspensão de esporos de *A. niger* e 100 μL da suspensão bacteriana quando testada individualmente e para avaliar a combinação foram adicionados 50 μL de cada bactéria. Foram utilizados dois controles sem crescimento bacteriano, o meio líquido BD e água destilada esterilizada, ambos inoculados com 100 μL da suspensão de esporos de *A. niger*. As placas foram vedadas com filme PVC e incubadas a 37°C por 16 h. Após o período, os controles foram avaliados e quando estes apresentaram um mínimo de 70% de esporos germinados, adicionou-se uma gota de lactofenol azul em todos os tratamentos paralisando a germinação de *A. niger*. A avaliação ocorreu por meio da contagem aleatória de 100 esporos em microscópio ótico. Considerou-se como esporo germinado aquele cujo tubo germinativo apresentava comprimento igual ou superior ao dobro do diâmetro do esporo. O experimento foi montado com quatro repetições (poços) para cada tratamento.

Inibição do crescimento micelial de *A. niger* por bactérias individuais e combinadas

As bactérias foram crescidas e as concentrações ajustadas como mencionado anteriormente. Para o preparo da suspensão de esporos de *A. niger* utilizou-se uma cultura crescida durante oito dias a $28 \pm 2^\circ \text{C}$ e os esporos foram coletados através de duas leves raspagens da borda da colônia fungica e foram transferidos para microtubos contendo ágar-água (0,1g para 100 mL de água).

A técnica de pareamento de cultura descrita por Dennis e Webster, (1971) foi utilizada para avaliar o efeito das bactérias individuais e combinadas sobre o crescimento de *A. niger*. No centro de cada placa de Petri contendo o meio BDA foram inoculados 6 µL da suspensão de esporos de *A. niger*, as bactérias foram inoculadas numa distância de 4 cm do local de inoculação do patógeno, em disco de papel de filtro esterilizado e com 5 mm de diâmetro, utilizando-se 6 µL da suspensão bacteriana, quando individual e, para o efeito da combinação, foram inoculados 3 µL de cada suspensão bacteriana. Adicionou-se um controle apenas *A. niger* e o disco de papel esterilizado e sem inoculação das bactérias. As placas foram vedadas com filme PVC e mantidas a temperatura de $28 \pm 2^\circ \text{C}$ por 8 dias, com três repetições para cada tratamento. Aos oito dias foi medido o diâmetro da colônia e o halo de inibição entre as bactérias e o fungo. Esses dados foram usados para calcular a porcentagem de inibição do crescimento (PI), conforme a equação descrita por Sundaramoorthy et al. (2012): $PI = [(diâmetro da testemunha - diâmetro do tratamento)/diâmetro da testemunha] \times 100$.

Efeito de bactérias sobre a podridão vermelha do sisal em condições de campo

As bactérias foram crescidas e as concentrações ajustadas para $OD=0,5$ como descrito anteriormente.

O *Aspergillus niger* foi crescido em meio BDA (Batata Dextrose Agar) a $28 \pm 2^\circ \text{C}$ por 8 dias. Para obtenção dos esporos foram adicionados 20 mL de água destilada esterilizada e duas gotas de Tween 20® na placa e a cultura foi raspada com alça de Drigalsky. A concentração de esporos foi ajustada para 1×10^7 conídios mL^{-1} .

O experimento foi instalado na comunidade de Tiquara, localizada a 27 km de Campo Formoso, Bahia.

O experimento de campo foi montado com mudas de sisal de aproximadamente 20-25 cm de altura. As mudas foram oriundas de bulbilhos coletados em Tiquara, Campo Formoso e plantados em bandejas de tubetes com 98 células e 203 cm^3 de solo, mantidos no campo por três meses até atingiram a altura de 20 a 25 cm. Em cada muda foram realizados dois ferimentos no caule com agulhas hipodérmicas descartáveis de $25 \times 0,7 \text{ mm}$ (Figura 3A). Em cada ferimento fez-se a inoculação com 100 µL da suspensão de bactérias e para a combinação de bactérias foram colocados

50 µL de cada bactéria no fermento (Figura 3B). Após a inoculação dos agentes de biocontrole, as mudas de sisal foram mantidas em caixas de papelão com papeis umedecido e 24 h depois, realizou-se a inoculação de 100 µL da suspensão de esporos de *A. niger* contendo 1×10^7 conídios mL⁻¹ nos mesmos fermentos das mudas, em sequência foi realizado o plantio das mudas na área experimental.



Fig. 2. Etapas do experimento de controle da podridão vermelha do sisal com bactérias individuais e combinadas em campo: **(A)** muda de sisal sendo lesionada no caule. **(B)** mudas de sisal sendo inoculada com os agentes de biocontrole.

Os experimentos foram montados em delineamento de blocos casualizados, com 20 repetições, sendo os tratamentos constituídos pelos isolados bacterianos individuais, combinados e dois controles: 1 - inoculação apenas com a suspensão de *A. niger*, e 2 – tratamento com água esterilizada.

Após a implantação do experimento, avaliou-se semanalmente a incidência da podridão vermelha, levando em consideração os sintomas externos característicos da doença até os 30 dias. Com esses dados da incidência da doença, calculou-se a área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD) por meio da equação proposta por Campbell & Madden (1990):

$$AACPD = \frac{\sum_{i=1}^{n-1} Y_i + Y_{i+1}}{2} \times (T_{i+1} - T_i)$$

Onde:

AACPD = Área abaixo da curva de progresso da doença;

n = número de avaliações;

y = intensidade da doença;

t = o tempo quando da avaliação da intensidade da doença;

$(Y_i + Y_{i+1})$ = a altura média do retângulo entre os pontos Y_i e Y_{i+1} e

$(t_{i+1} - t_i)$ = a diferença da base do retângulo entre os pontos t_{i+1} e t_i .

Após 30 dias de inoculação do *A. niger*, as mudas de sisal foram coletadas e, cortadas transversalmente ao longo de toda a planta, para avaliação da severidade dos sintomas no caule e base das folhas, com a seguinte escala de notas (Sá, 2009): 0 – sem sintomas, apenas lesões mecânicas causadas pela perfuração da agulha; 1 – sintoma inicial, lesão maior do que a causada pela agulha, podridão na base da folha mais externa; 2 – sintoma avançado, podridão no interior da planta, planta ainda viva; 3 – planta morta, caule totalmente destruído (Figura 5).



Fig. 3. Escala de notas adotada para avaliar a severidade da podridão vermelha do sisal em mudas inoculadas. **(A)** Nota 0 - planta sadia; **(B)** Nota 1 - sintoma inicial de vermelhidão nas base das folhas com sintomas mais externos; **(C)** Nota 2 -vermelhidão dos tecidos internos do caule; **(D)** Nota 3 - planta morta.

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

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

Para avaliação da incidência da doença em cada tratamento, somaram-se as plantas sintomáticas dividindo pelo número total de plantas, obtendo-se os dados em percentagem (%). Esses dados foram usados para o cálculo de eficiência de controle pela formula descrita por Abbott (1925): Eficiência = $(T-t) \cdot 100/T$, sendo T a testemunha e t o tratamento).

Para determinação da presença de interação sinérgica entre a combinação de bactérias foi usada a equação descrita por Limpei et al. (1962): Efeito esperado = $(X + Y) - (X \cdot Y)/100$, onde, X e Y referem-se ao controle alcançado por cada agente de biocontrole individualmente. Se a combinação dos dois agentes produzir qualquer valor de controle maior do que efeito esperado (Ee), conclui-se que ocorreu sinergismo.

Análises estatísticas

O dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F e para o caso de diferença significativa entre os tratamentos, as médias foram comparadas com o teste de Scott-Knott com o *software* SISVAR 4.0 (FERREIRA, 2000).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Compatibilidade entre isolados

Avaliou-se a compatibilidade entre os isolados 512 (*Paenibacillus* sp.), 105 (*Bacillus pumilus*), 90 (*Brevibacterium* sp.), 127 (*Serratia rubidaea*), BMH e INV (*Bacillus* sp.). Respostas idênticas foram observadas nos meios TSA e NA. Os isolados 90, 512 e 105 foram inibidos pelas bactérias BMH e INV, que também foram

antagônicas entre si, quando pareadas. O isolado 127 foi compatível com todos os outros. No total, foram sete combinações compatíveis e oito incompatíveis (Tabela 2).

Tabela 2. Compatibilidade entre as bactérias nos meios TSA 1/10 e NA.

Isolados Bacterianos						
	512	105	90	127	BMH	INV
512		+ ¹	-	+	-	-
105	+		+	+	-	-
90	-	+		+	-	-
127	+	+	+		+	+
BMH	-	-	-	+		-
INV	-	-	-	+	-	

¹(+) – compatibilidade; (-) – incompatibilidade.

Os isolados BMH e INV (*Bacillus*) e 512 (gênero *Paenebacillus*) quando pareados com os demais apresentaram a produção de halo de inibição, impossibilitando assim o uso combinado dessas bactérias. Essa incompatibilidade pode estar ligada a capacidade que as bactérias desses gêneros têm de produzir antibióticos. Existem várias substâncias com atividade antimicrobiana produzida por espécies de *Bacillus* e *Paenebacillus* entre elas podemos citar a bacilomicina, bacilisina, fengicina e zwittermicina (MONTEIRO, 2002; SCHULZ et al., 2003; ATHUKORALA et al., 2009; CHEN, 2009).

Segundo Alencar, (2011) a maior parte dos antibióticos produzidos por espécies do gênero *Bacillus* exerce ação contra bactérias Gram-positivas, mas alguns compostos como polomixina, colisina e circulina exibem atividade quase exclusivamente sobre bactérias Gram-negativas.

Essas substâncias produzidas pelas bactérias já eram esperadas pois segundo Jack et al. (1995), a maioria, se não todas as bactérias, são capazes de produzir vários compostos no curso de seu crescimento *in vitro*, que podem ser inibitórios tanto para

si quanto para outras. Por isso, os testes preliminares de compatibilidade são necessários, podendo determinar o sucesso ou fracasso do biocontrole. Segundo De Boer et al. (1999) a aplicação da mistura de diferentes isolados representa uma importante estratégia de controle de doenças, porém, o sucesso dessa prática depende da compatibilidade entre os isolados. A incompatibilidade entre os isolados pode influenciar negativamente no controle da doença, pois estes podem competir entre si por nutrientes e limitar a capacidade de colonização ou atividade de biocontrole. De Boer et al., (1999) demonstrou que *P. putida* RE8 inibiu o crescimento de *P. fluorescens* RS111 *in vitro*, e que essa combinação não melhorou o controle de fusariose vascular do rabanete, enquanto que a combinação entre isolados compatíveis *in vitro*, resultou no melhor controle da doença. Segundo Stockwell et al. (2011) a compatibilidade é um fator importante que determina a eficácia de controle da combinação de bactérias em doenças de plantas. Misturas de bactérias antagonistas com mecanismos compatíveis entre si, proporcionam significativamente melhor controle, com menor variação em termos de eficácia, do que as inoculadas individualmente ou em misturas incompatíveis (STOCKWELL et al. 2011).

Inibição da germinação de esporos e crescimento micelial

Todos os isolados aplicadas de forma individual ou combinada proporcionaram uma redução significativa na germinação de esporos de *A. niger* (Figura 6). Os tratamentos com os isolados 512, 105, BMH, INV e as combinações 512+105, 90+127 e 127+INV proporcionaram maior inibição da germinação de esporos de *A. niger*, com inibição de 99,3%; 98%; 98,5%; 97,5%; 99,3%; 97,5% e 98,3% respectivamente. O isolado 127 (95,7%) e as combinações 512+127 (95,2%), 90+105 (96,7%), 105+127 (95,5%) e 127+BMH (97,0%) também proporcionaram inibição da germinação de esporos de *A. niger*, porém com percentuais de inibição significativamente menores que os tratamentos citados. Os esporos tratados com o isolado 90 tiveram sua germinação inibida em 87,3%, sendo a menor porcentagem de inibição entre os tratamentos com os agentes de biocontrole e suas combinações.

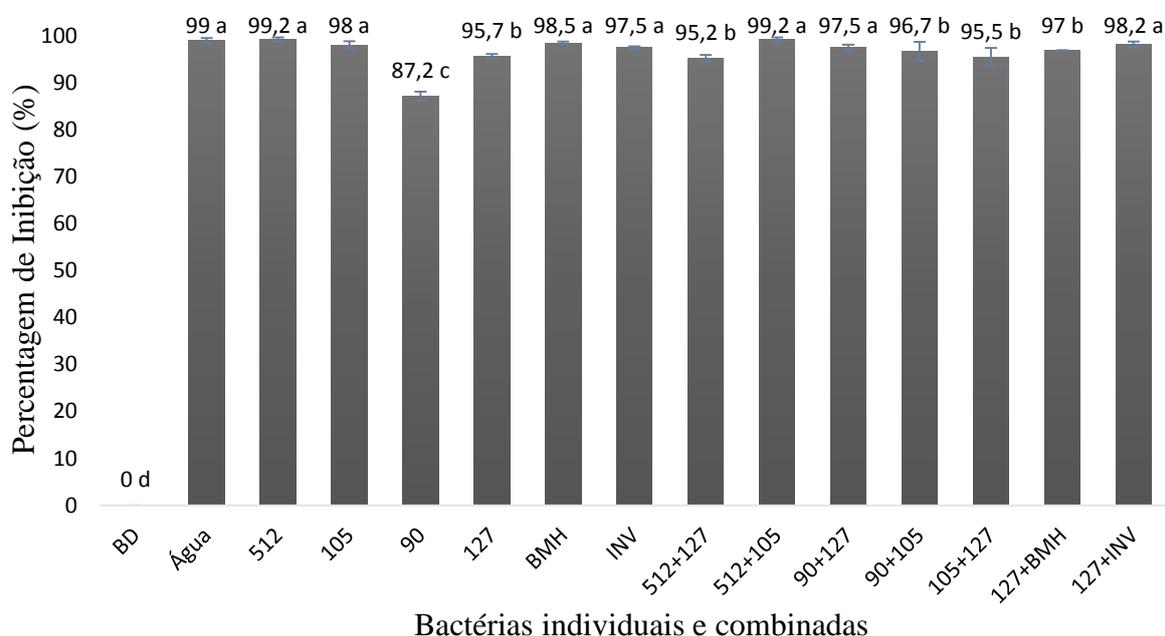


Fig. 4. Percentagem de inibição da germinação de esporos de *A. niger*, tratados com suspensões dos isolados bacterianos, individuais e combinados. Como controle foram usados o meio de cultivo batata-dextrose(BD) e água destilada esterilizada. Os valores médios foram obtidos a partir de 4 repetições, com a contagem aleatória de 100 esporos em cada repetição. Letras diferentes indicam diferenças significativas encontrada entre os tratamentos pelo teste de Scott-Knott. As barras representam o erro padrão da média de quatro repetições.

Os isolados individuais e combinados diferiram significativamente do controle (apenas o fungo sem adição de bactérias) nas variáveis diâmetro da colônia e percentagem de inibição (Tabela 3). O diâmetro da colônia de *A. niger* foi menor com a presença dos isolados 512, BMH, INV e a combinação 512+105, com médias de 1,7; 1,9; 2,1 e 1,9 cm, respectivamente. Os isolados individuais 105, 127, 90 e as combinações 512+127, 90+127, 90+105, 105+127, 127+BMH e 127+INV também causaram redução no diâmetro da colônia de *A. niger*, porém foram significativamente inferiores.

Os isolados individuais e combinados apresentaram inibição significativa no crescimento micelial de *A. niger*. Os isolados 512 e BMH e a combinação 512+105 alcançaram os melhores resultados com percentagens de inibição de 49,9; 44,1 e 43,5%, respectivamente. O isolado INV também proporcionou inibição do crescimento micelial em 35,6%. Os isolados 105, 127, 90 e as combinações 512+127, 90+127, 90+105, 105+127, 127+BMH e 127+INV apresentaram os menores resultados de inibição do crescimento micelial de *A. niger*.

Tabela 3. Bactérias individuais e combinadas e seu efeito no diâmetro da colônia, índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) e percentagem de inibição (PI) de *A. niger*.

Tratamentos	Diâmetro da colônia (cm)	Percentagem de inibição (%)
512	1,7 c	49,9 a
105	2,8 b	19,0 c
127	2,6 b	22,9 c
90	2,8 b	17,5 c
BMH	1,9 c	44,1 a
INV	2,1 c	35,6 b
512 + 127	2,6 b	21,5 c
512 + 105	1,9 c	43,5 a
90 + 127	2,7 b	20,5 c
90 + 105	2,8 b	16,1 c
105 + 127	2,7 b	20,0 c
127 + BMH	2,9 b	14,6 c
127 + INV	2,5 b	22,0 c
Controle	3,4 a	0,0 d
CV%	8,0	18,9

Valores médios de quatro repetições. Médias seguidas pelas mesma letra na coluna pertencem ao mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

A inibição da germinação de esporos e do crescimento micelial são variáveis de grande importância no controle de fungos patogênicos. É por meio da germinação

dos esporos e do crescimento micelial que o fungo infecta o tecido sadio do hospedeiro e se dissemina para outras plantas sadias (AGRIOS, 2005). Esse efeito antagônico pode ter relação com a produção de antibióticos. O isolado BMH possui o gene *bamC* para a produção de Bacilomicina (MAGALHÃES, 2013), enquanto que o isolado 512 possui o gene de resistência a Zwittermicina A (SILVA, 2012). Ambos são antibióticos produzidos por *Bacillus* e *Paenibacillus* e possuem efeito sobre o crescimento e atividade de patógenos de plantas (MOYNE et al., 2001; RAAIJMAKERS et al., 2002).

Os resultados alcançados com as bactérias individuais e combinadas *in vitro* indicam o potencial antagônico destes isolados e suas combinações sobre a germinação de esporos e crescimento micelial de *A. niger*. Esses testes podem ser usados para selecionar os isolados bacterianos e as combinações a serem testados em campo no controle da podridão vermelha do sisal.

Controle da podridão vermelha em plantas de sisal no campo

As plantas tratadas com os isolados 512, 105, 127, 90, BMH, INV e as combinações 127+105 e 127+INV apresentaram significativa redução na incidência da podridão vermelha, com uma média de 50% de redução (Tabela 4). As combinações 127+90, 127+BMH e o tratamento com todas as bactérias combinadas também proporcionaram uma diminuição da incidência, entretanto com valores menores que os citados anteriormente. As plantas tratadas com as combinações 512+105, 512+127 e 90+105 não diferiram significativamente do controle apenas com *A. niger*.

O tratamento das plantas com as bactérias individuais e combinadas também retardou o aparecimento dos sintomas da doença no período de 30 dias (Tabela 4). Os isolados 512, 105, 127, BMH, INV e as combinações 127+90, 127+105, 127+BMH e 127+INV, causaram o retardamento do aparecimento dos sintomas da doença, quando comparados com o controle apenas com *A. niger* e promoveram as menores áreas abaixo da curva do progresso da doença (AACPD). O isolado 90 e as combinações 512+127 e a combinação de todas as bactérias também retardaram o aparecimento dos sintomas da doença nas plantas, entretanto com valores inferiores aos tratamentos mencionados anteriormente. As combinações 512+105 e 90+105 não

retardaram o aparecimento dos sintomas da doença nas plantas, não diferindo significativamente da área abaixo da curva de progresso da doença do controle apenas com *A. niger*.

A severidade da doença foi significativamente reduzida por todas as bactérias individuais e combinadas, sendo diferente do controle apenas com *A. niger* (Tabela 4). As plantas tratadas com os isolados 512, 105, BMH, INV e as combinações 127+105 e 127+INV obtiveram severidade de 23,5%, 23,8%, 27%, 21,8%, 27,1% e 23,2% respectivamente. A severidade também foi reduzida pelas bactérias 90 (36,6%), 127 (43%) e as combinações 127+90 (44,6%), 127+BMH (38,2%), 512+127 (59,2%), todas as bactérias (56,7%). O tratamento das plantas com a combinação 90+105 proporcionou severidade de 79,5%, sendo considerada a menor redução da severidade entre os tratamentos. As plantas tratadas apenas com o patógeno atingiram 100% de severidade da doença (Tabela 4).

A maior eficácia de controle foi alcançada pelo tratamento das plantas com as bactérias 512, 105, BMH, INV e as combinações 127+105 e 127+INV com eficiência de controle acima de 70%, enquanto a menor eficácia de controle ocorreu no tratamento com as combinações 512+105 e 90+105 com eficácia de 23,5% e 20,4% respectivamente (Tabela 5).

Nenhuma das combinações resultou numa interação sinérgica, de acordo com o critério de Limpei et al. (1962). As combinações 127+105 e 127+INV proporcionaram bons resultado na redução da incidência, AACPD, severidade e eficácia de controle, entretanto esses resultados não diferiram significativamente do alcançado pelos isolados 105 e INV.

Apesar de diversos autores terem encontrado melhores resultados no biocontrole de fitopatógenos com combinações dos agentes de biocontrole do que suas aplicações individuais (De BOER et al., 1999; JANISIEWICZ, 1996; De BOER et al., 2003; THILAGAVATHI et al., 2007; ABEYSINGHE, 2009; AKRAMI et al., 2009; STOCKWELL et al., 2011; GOLZARI et al., 2011; SUNDARAMOORTHY et al., 2012; ZANGOEI et al., 2014), esses resultados não foram observados no presente trabalho. As aplicações combinadas não superaram a inibição do patógeno proporcionada pelas aplicações individuais.

Tabela 4. Controle biológico da podridão vermelha causada por *A. niger* por meio de bactérias aplicadas individualmente ou em combinação em condições de campo.

Tratamentos	Incidência da Doença (%)	AACPD	Severidade da doença (%)	Eficácia do Biocontrole (%)	Efeito esperado
CTL H ₂ O ¹	0,0 d	0,0 d	0,0 ± 0,0 f	100,0 a	
CTL ASP ²	100,0 a	1680,0 a	100,0 ± 0,0 a	0,0 f	
512	55,5 c	738,8 c	23,5 ± 1,3 e	76,4 b	
105	57,7 c	536,6 c	23,8 ± 4,4 e	76,1 b	
127	53,3 c	715,5 c	43,0 ± 1,7 d	57,0 c	
90	53,3 c	1011,1 b	36,6 ± 2,0 d	63,3 c	
BMH	55,5 c	661,1 c	27,0 ± 1,0 e	73,0 b	
INV	51,1 c	645,5 c	21,8 ± 6,4 e	78,1 b	
512 + 105	91,1 a	1353,3 a	76,4 ± 5,0 b	23,5 e	94,3
512 + 127	88,8 a	1057,7 b	59,2 ± 6,3 c	40,7 d	89,8
90 + 105	93,3 a	1586,6 a	79,5 ± 3,8 b	20,4 e	91,2
127 + 90	75,5 b	925,5 c	44,6 ± 3,8 d	55,3 c	84,2
127 + 105	48,8 c	598,8 c	27,1 ± 2,5 e	72,8 b	89,7
127 + BMH	68,8 b	816,6 c	38,2 ± 6,8 d	61,7 c	88,3
127 + INV	51,1 c	606,6 c	23,2 ± 1,6 e	76,7 b	90,5
Todas as bactérias	73,3 b	1166,6 b	56,7 ± 8,7 c	43,2 d	
CV (%)	14,8	21,4	10,2	7,5	

¹CTL H₂O – controle com água apenas; ²CTL ASP – controle com apenas o patógeno. Valores médios (médias de três blocos cada bloco com vinte repetições) seguidos pela mesma letra pertencem ao mesmo grupo, pelo teste de Skott-knott, a 5% de probabilidade.

As bactérias antagonistas *Paenibacillus* sp. (512), *Bacillus pumilus* (105), *Brevibacterium* sp. (90), *Serratia rubidaea* (127) e *Bacillus* sp. (BMH e INV) utilizadas no biocontrole da podridão vermelha do sisal, causada pelo fungo *A. niger*, foram pré-

selecionadas em trabalhos anteriores (SILVA, 2012; MAGALHÃES, 2013) e apresentaram bons resultados na redução da doença quando aplicadas individualmente. No presente estudo, podemos reafirmar o potencial que esses isolados possuem para controlar a podridão vermelha do sisal em condições de campo.

Nos testes *in vitro*, todas bactérias apresentaram antagonismo sobre *A. niger*, inibindo a germinação de esporos e o crescimento micelial, enquanto que no teste em campo (*in vivo*) as bactérias confirmaram seu potencial, reduzindo a doença nas plantas tratadas previamente. Esse resultado merece destaque, pois bons resultados nos teste *in vitro* nem sempre são confirmados quando testados em campo (*in vivo*). Neste estudo, apesar de algumas bactérias se sobressaírem em relação a outras, houve uma confirmação entre os resultados obtidos *in vitro* e *in vivo*.

As combinações proporcionaram uma redução na germinação de esporos e no crescimento micelial de *A. niger* nos testes *in vitro*. Em campo, a maior eficácia de controle alcançada pelas combinações foi de 76,7%, enquanto que a menor eficácia foi de 20,4%. Apesar dos resultados significativos alcançados em todos os testes, esses resultados não diferiram daqueles obtidos com o tratamento das plantas com as bactérias individuais.

Nesse caso, não é vantajoso trabalhar com as combinações no controle da podridão vermelha do sisal, sendo recomendado apenas o uso individual dos agentes de biocontrole. A falta de sinergismo entre as combinações e o resultado inferior e semelhante obtido pelas combinações nos experimento, torna essa estratégia de controle inviável nesse patossistema.

CONCLUSÃO

Podemos concluir que as bactérias testadas neste trabalho reduzem a incidência e severidade da podridão vermelha do sisal em plantas multiplicadas em condições de campo e podem ser utilizados para a preparação de formulações para futuras aplicações no campo, para prevenção desta doença. As combinações com essas bactérias não são recomendadas. Apesar de terem sido obtidos resultados no controle da doença, esses foram inferiores ou semelhantes ao obtidos pelas bactérias

individuais. É necessário continuar as investigações na linha de biocontrole, com a finalidade de diminuir ou erradicar as perdas ocasionadas pela podridão vermelha na cultura do sisal, que tem uma enorme importância econômica e social para os produtores familiares do semiárido brasileiro.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, a Financiadora de Estudos e Projetos- FINEP, a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia- FAPESB, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, W. S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology**, v. 18, p. 265-267, 1925.

ABEYSINGHE, S. Effect of combined use of *Bacillus subtilis* CA32 and *Trichoderma harzianum* RU01 on Biological Control of *Rhizoctonia solani* on *Solanum melongena* and *capsicum annum*. **Plant Pathology Journal**, v. 8, n. 1, p. 9-16, 2009.

ABREU, K. C. L. de M. **Epidemiologia da podridão vermelha do sisal no Estado da Bahia**. 2010. 100f. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. Cruz das Almas, 2010.

AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. — 5th ed., Academic Press. 2005. 922p.

AKRAMI, M; IBRAHIMOV, A. Sh; ZAFARI, D. M; VALIZADEH, E. Control *Fusarium* rot of bean by combination of by *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma asperellum* in greenhouse condition. **Agricultural Journal**, v.4, n. 3, p.121-123, 2009.

ALENCAR, A. A. **Produção de bacitracina por *Bacillus licheniformis*(UCP1010) utilizando meio alternativo à base de soro de leite.** 2011, 65f. Dissertação(Mestrado)- Curso de Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais. Universidade Católica de Pernambuco. Recife, 2011.

ALVES, M. O; SANTIAGO, E. G. Tecnologia e relações sociais de produção no setor sisaleiro nordestino. **Revista Econômica do Nordeste**, Fortaleza, v.37, n.3, p.368-381, 2006.

ATHUKORALA, S. N. P; FERNANDO, W. G. D; RASHID, K. Y. Identification of antifungal antibiotics of *Bacillus* species isolated from different microhabitats using polymerase chain reaction and MALDI-TOF mass spectrometry, **Canadian Journal of Microbiology** v. 55, n. 9, p.1021-1032, 2009.

BETTIOL, W; GHINI, R. Controle Biológico. In: BERGAMIN, A. F.; KIMATI, H.; AMORIN, L. **Manual de Fitopatologia. Princípios e Conceitos.** 3.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. p.717-728.

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

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

CAMPBELL, C. L; MADDEN, L. V. **Introduction to plant disease epidemiology.** John Wiley & Sons, New York, 1990, 532p.

CHEN, X; SCHOLZ, R; BORRIS, M; JUNGE, H; MOGEL, G; KUNZ, S; BORRIS, R. Difficidin and bacilysin produced by plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* dare efficient in controlling fire blight disease, **Journal of Biotechnology**, v.140 p.38-44, 2009.

CONAB, 2013. **Companhia Nacional de Abastecimento.** Sisal – safra 2012/2013: comercialização – proposta de ações. Brasília-DF, 01 de outubro de 2012.

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

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

De BOER, M; BOM, P; KINDT, F; KEURENTJES, J. J. B; VAN DER SLUIS, I; VAN LOON, L. C; BAKKER, P. A. H. M. Control of *Fusarium* wilt of radish by combining *Pseudomonas putida* strains that have diferente disease-suppressive mechanisms. **Phytopathology**, v.93, p.626-632, 2003.

De BOER, M; VAN DER SLUIS, I; VAN LOON, L. C; BAKKER, P. A. H. M. Combining fluorescent *Pseudomonas* spp. strains to enhance suppression of *fusarium* wilt of radish. **European Journal of Plant Pathology**, v.105, p.201-210, 1999.

DENNIS, C; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* 1. Production of non-volatile antibiotics. Transactions of the British. **Mycological Society** v.57, p.25–39, 1971.

DUFTY, B. K; WELLER, D. M. Use of *Gaeumanomyces graminis* var. *Graminis* alone and in combination with flourescent *Pseudomonas* spp. To supress take-all of wheat. **Plant Disease**, v.79, p.907-911, 1995.

FERREIRA, D. F; SISVAR (Sistema para análise de variância) para Windows, Versão 4.0. São Carlos. 2000.

FUKUI, R; SCHROTH, M. N; HENDSON, M; HANCOCK, J. G. Interaction between strains of *Pseudomonads* in sugar beet sphermospheres and the relationship to pericarp colonization by *Pythium ultimum* in soil. **Phytopathology** v.84, p.1322– 1330, 1994.

GOLZARI, H; AHMADZADEH, M; PANJEHKEH, N; SALARI, M; SEDAGHATI-KHORAVI, E. The effects of some biocontrol agents and their combination on root-knot disease on tomato. **Insight Plant Disease**, v. 1, n. 1, p. 1-11, 2011.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – **Produção Agrícola Municipal, Culturas Temporárias e Permanentes**, Rio de Janeiro, v. 37, p. 1-91, 2010.

JACK, R. W; TAG, J. R; RAY, B. Bacteriocins of grampositive bacteria. **Microbiological Reviews**, v. 39 n. 2, p.171-2000, 1995.

JANISIEWICZ, W. Ecological diversity, nich overlap, and coexistence of antagonists used in developing mixture for biocontrol of postharvest disease of apple. **Phytopathology**, v. 86, p.473-479, 1996.

JANISIEWICZ, W. J. Biocontrol of postharvest diseases of apples with antagonist mixtures. **Phytopathology**, v. 78, p.194-198, 1988.

LIMPEL, L; SHULDT, P; LAMONT, D. Proc. N.E. **Weed Control Conf**, v. 16, p. 48–3, 1962.

MAGALHÃES, V. C. **Uso de isolados bacterianos no controle da podridão vermelha do sisal**. 2013, 93f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. Cruz das Almas, 2013.

MARTIN, A. R; MARTINS, M. A; MATTOSO, L. H. C; SILVA, O. R. R. F. Caracterização química e estrutural de fibra de sisal da variedade *Agave sisalana*. **Polímeros**, São Carlos, v. 19, n. 1, p. 40-46, 2009.

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

MISHRA, D. S; GUPTA, A. K; PRAJAPATI, C. R; SINGH, U. S. Combination of fungal and bacterial antagonists for management of root and stem rot disease of soybean. **Pakistan Journal of Botany**, v.43, p.2569-2574, 2011.

MONTEIRO, L. **Produção de substâncias bioativas de *Bacillus* spp., contra *Xanthomonas campestris* pv. *campestris***. 2002, 74f. Dissertação (Pós-Graduação em biotecnologia de produtos bioativos). Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2002.

MOYNE, A. L; SHELBY, R; CLEVELAND, T. E; TUZUN, S. Bacillomycin D: an iturin with antifungal activity against *Aspergillus flavus*. **Journal of Applied Microbiology**. v.90, p.622-629, 2001.

PIERSON, E. A; WELLER, D. M. Use of mixtures of fluorescent *Pseudomonads* to suppress take-all and improve the growth of wheat. **Phytopathology** v.84, p.940-947, 1994.

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

RAUPACH, G. S; KLOEPPER, J. W. Mixtures of plant growth promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple cucumber pathogens. **Phytopathology**, v.88, p. 1158-1164, 1998.

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

SANTOS, P. O; SILVA, A. C. M da; CORRÊA, É. B; MAGALHÃES, V. C; SOUZA, J. T. Additional species of *Aspergillus* causing bole rot disease in *Agave sisalana*. **Tropical Plant Pathology**, v. 39, n.4, p.331-334, 2014.

SCHULZ, D; PEREIRA, M. A; BONELLI, R. R; NUNES, M. M; BATISTA, C. R.V. Bacteriocinas: mecanismos de ação e uso na conservação de alimentos. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v.14, n. 2, p.9-35, 2003.

SILVA, A. C. M. da. **Densidades populacionais, diversidade e atividade de bactérias endofíticas de sisal contra *Aspergillus Níger***. 2012, 96f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. Cruz das Almas, 2012.

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

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

STOCKWELL, V. O; JOHNSON, K. B; SUGAR, D; LOPER, J. E. Mechanistically compatible mixtures of bacterial antagonists improve biological control of fire blight of pear. **Phytopathology**, v.101, p.113-123, 2011.

SUNDARAMOORTHY, S; RAGUCHANDER, T; RAGUPATHI, N; SAMIYAPPAN, R. Combinatorial effect of endophytic and plant growth promoting rhizobacteria against wilt disease of *Capsicum annum* L. caused by *Fusarium solani*. **Biological Control**, v. 60, p.59-67, 2012.

THILAGAVATHI, R; SARAVANAKUMAR, D; RAGUPATHI, N; SAMIYAPPAN, R. A combination of biocontrol agents improves the management of dry root rot (*Macrophomina phaseolina*) in greengram. **Phytopathology Mediterranea**, v.46, p.157–167, 2007.

ZANGOEI, E; ETEBARIAN, H. R; SAHEBANI, N. Biological control of apple gray mold by mixtures of *Bacillus Subtilis* and yeast isolates. **African Journal of Food Science**, v. 8, n. 3, p.155-163, 2014.

CAPÍTULO 2

COMPORTAMENTO DE *Aspergillus niger* E PROGRESSO DA PODRIDÃO VERMELHA DO SISAL EM DIFERENTES TEMPERATURAS¹

¹ Artigo a ser ajustado e submetido ao comitê editorial do periódico científico Industrial Crops and Products, em versão na língua inglesa.

COMPORTAMENTO DE *Aspergillus niger* E PROGRESSO DA PODRIDÃO VERMELHA DO SISAL EM DIFERENTES TEMPERATURAS

RESUMO: A podridão vermelha do sisal é o principal problema fitossanitário da cultura do sisal e tem contribuído para a diminuição da produção nacional. Foi avaliado o efeito da temperatura (12, 18, 24, 30, 36 e 42°C) no crescimento e esporulação de *A. niger* e no progresso da doença em plantas de sisal. As colônias de *A. niger* mantidas nas temperaturas de 12 e 42°C apresentaram baixo crescimento micelial e não houve esporulação. A temperatura ótima para o crescimento e esporulação de *A. niger* foi de 28°C. Os sintomas externos da doença apareceram seis dias após inoculação com *A. niger*, nas plantas sob as temperaturas mais elevadas de 24 a 42°C, enquanto que na temperatura de 18°C, os sintomas externos foram observados apenas 15 dias após inoculação de *A. niger*. Na temperatura de 12°C, as plantas não apresentaram sintomas externos da doença, no período avaliado de 30 dias. A área abaixo da curva do progresso da doença foi maior para a temperatura de 42°C, seguida das temperaturas de 36, 30 e 24°C e com menores valores para a temperatura de 18 e 12°C. A incidência e severidade da doença foram maiores nas temperaturas de 24, 30, 36 e 42°C, não diferindo entre si, com incidência e morte das plantas de 100%. Nas temperaturas de 12 e 18°C, a incidência foi de 5 e 45%, respectivamente, enquanto que a severidade foi 0,25 e 17,2%, respectivamente. Conclui-se que a temperatura influenciou no desenvolvimento de *A. niger*, com temperatura ótima de crescimento e esporulação a 28°C e na incidência e severidade da podridão vermelha do sisal, com maior progresso da doença nas temperaturas entre 24 a 42°C.

Palavras-chave: Incidência; Severidade; Crescimento micelial; Esporulação.

BEHAVIOR OF *Aspergillus niger* AND PROGRESS OF SISAL BOLE ROT DISEASE AT DIFFERENT TEMPERATURES

SUMMARY: Bole rot is the main phytosanitary problem of sisal and significantly contributes to the decline of sisal production in Brasil. In this study the effect of different temperatures (12, 18, 24, 30, 36 e 42°C) on growth and sporulation of *A. niger* and on disease progress were evaluated. Colonies of *A. niger* grown at 12 and 42°C showed slow growth and no sporulation. The optimum temperature for growth and sporulation of *A. niger* was 28°C. External disease symptoms appeared six days after inoculation with *A. niger*, in plants grown at temperatures between 24 and 42°C, while at 18°C, the symptoms appeared after 15 days after inoculation. At 12°C, plants did not show any external symptoms within the 30-day evaluation period. The area under the disease progress curve was higher at 42°C, followed by 36, 30 and 24°C and was lower for temperatures between 18 and 12°C. Disease incidence and severity were higher at 24, 30, 36 and 42°C, did not differ significantly amongst them, and showed values of 100% for disease incidence and plant death. At 12 and 18°C, disease incidence varied between 5 and 45%, respectively, while the severity was 0.25 and 17.2%, respectively. In conclusion, the temperature affected growth of *A. niger*, with the optimum temperature of 28°C for growth and sporulation and the bole rot disease incidence and severity in sisal plants, with a faster disease progress at temperatures between 24 and 42°C.

Keywords: Incidence; Severity; Mycelial growth; Sporulation.

INTRODUÇÃO

O sisal (*Agave sisalana* Perrine ex Engelm) é cultivado para a produção de fibra, sendo esta a principal fibra dura comercializada no mundo. Originário do México, foi introduzido na região semiárida do Nordeste brasileiro em 1903, onde é cultivado em cerca de 263,472 ha (IBGE, 2011; SANTOS et al., 2014). O Brasil é o maior produtor e exportador mundial da fibra de sisal e, em 2013 a produção brasileira de sisal foi de 82,3 mil toneladas, sendo a Bahia responsável por 95,8% dessa produção (CONAB, 2013).

Apesar da planta possuir características morfológicas que conferem uma barreira natural à penetração de micro-organismos, isso não impede que a planta seja afetada por doenças capazes de causar sérios prejuízos (BOCK, 1965 citado por SILVA et al., 2008). Nesse sentido, merece destaque a podridão vermelha do sisal causada pelo fungo *Aspergillus niger* (COUTINHO et al. 2006a; COUTINHO et al., 2006b; SOARES et al., 2006; SANTOS et al., 2014), que é o principal problema fitossanitário da cultura do sisal e tem contribuído para a diminuição da produção nacional.

A planta de sisal afetada pela podridão vermelha apresenta sintomas externos com folhas murchas e amareladas e sintomas internos caracterizados pelo apodrecimento do caule que apresenta uma descoloração parda a avermelhada (BATISTA et al., 2010). Os sintomas evoluem para a morte e tombamento das plantas de sisal. A doença ocorre em todos os estádios fenológicos, desde o rebento à plantas no final do ciclo produtivo (SILVA et al., 2008). Na Bahia, a podridão vermelha do sisal tem prevalência de 100% em todas as áreas produtoras com incidência média variando de 5% a 40% (ABREU, 2010).

O estabelecimento de uma doença depende da interação entre ambiente, patógeno e hospedeiro. Dentre as variáveis climáticas, a temperatura é o fator ambiental que afeta mais intensamente o início e o progresso de doenças infecciosas em plantas (SILVEIRA et al., 2001). Temperaturas mais altas ou mais baixas que a faixa ótima de temperatura para a planta reduzem o nível de resistência tornando-as predispostas a doenças (AGRIOS, 2005). Patógenos diferem em suas preferências

por alta ou baixa temperatura, uma vez que a mesma afeta o seu crescimento (SILVEIRA et al., 2001).

Não foram encontrados na literatura científica estudos desse patossistema sobre o fator temperatura no desenvolvimento da podridão vermelha do sisal. Este trabalho teve por objetivo avaliar o efeito da temperatura sobre o crescimento e esporulação de *A. niger* e no progresso, incidência e severidade da podridão vermelha em plantas de sisal.

MATERIAL E MÉTODOS

Crescimento micelial e esporulação de *Aspergillus niger in vitro*

O isolado 131 de *Aspergillus niger* pertencente a coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia Agrícola do Centro de Ciências Agrárias, ambientais e biológicas da UFRB (CCAAB-UFRB) foi utilizado para a realização do experimento *in vitro*.

A cultura de *A. niger* foi multiplicada em meio Batata Dextrose Ágar (BDA) por 7 dias a 28°C. Dessa cultura, preparou-se uma suspensão de esporos com duas leves raspagens da borda da colônia com alça de platina e os esporos obtidos foram transferidos para microtubos de 2 mL contendo ágar-água (0,1g ágar para 100 mL de água). Dessa suspensão, foram aplicados 5 µL no centro de placas de Petri de 9 cm de diâmetro, com meio BDA. As placas foram vedadas com filme PVC e incubadas por um período de oito dias, em câmara tipo BOD, nas temperaturas de 12, 18, 24, 30, 36 e 42°C, e fotoperíodo de 12 h luz/12 h escuro. Avaliou-se o crescimento do micélio, mensurando-se o diâmetro da colônia em intervalos de 24 h. Os dados foram utilizados para o cálculo do Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM), com a equação proposta por Oliveira, (1991): $IVCM = \sum(D - D_a)/N$ (D = diâmetro atual da colônia, D_a = diâmetro da colônia do dia anterior, N = número de dias após a inoculação). Para quantificação dos esporos nas colônias fúngicas, foram adicionados 20 mL de água destilada esterilizada e duas gota de Tween 20® nas placas e a cultura foi raspada com uma alça de Drigalsky esterilizada. A contagem dos esporos foi

realizada em câmara de Neubauer, em microscópio ótico com aumento de 40 X, e os resultados foram expressos em concentração de esporos por cm² de colônia.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), com 6 tratamentos e 10 repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância ($P < 0,05$) e quando constatada significância, fez-se análise de regressão linear e não-linear para selecionar os modelos com os melhores ajustes às curvas de crescimento e esporulação do fungo, com base no coeficiente de determinação (R^2). Para as análises estatísticas foi utilizado o Software SISVAR 4.0 (FERREIRA, 2000).

Progresso da podridão vermelha do sisal em diferentes temperaturas

Obtenção de suspensão de esporos de *Aspergillus niger*

Para a obtenção da suspensão de esporos de *A. niger*, a cultura foi crescida em meio BDA por 7 dias a 28°C. Após esse período, foram adicionados 20 mL de água destilada esterilizada e duas gotas de Tween 20® em cada placa contendo a cultura e, utilizando uma alça de Drigalsky esterilizada, as colônias foram raspadas e a suspensão contendo os esporos foi filtrada em gaze e transferida para um frasco de Erlenmeyer. Para a contagem de esporos, uma parte dessa suspensão homogeneizada foi transferida para uma câmara de Neubauer e os esporos foram contados em microscópio ótico com aumento de 40 X. Em seguida ajustou-se a concentração de esporos com água destilada esterilizada para 1×10^7 esporos mL⁻¹.

Produção das plantas de sisal

As plantas foram produzidas a partir de bulbilhos coletados na região produtora de sisal. Os bulbilhos foram inicialmente plantados em bandejas de plástico, com solo, por 60 dias, com irrigações periódicas. Após esse período, plantas com altura de 20 a 25 cm foram selecionadas e transplantadas para copos descartáveis (capacidade de 400 mL) contendo solo esterilizado. As plantas foram irrigadas e mantidas por 15 dias em casa de vegetação, com irrigação a cada dois dias, para aclimação antes da instalação do experimento.

Implantação experimental

Para cada condição de temperatura, foram utilizadas 30 plantas de sisal. As plantas foram perfuradas em dois pontos equidistantes no caule, a uma profundidade de aproximadamente 2 a 3 milímetros, com uma agulha hipodérmica descartável, para formar as lesões de penetração do fungo. Nas 20 primeiras foram inoculados 100 μL da suspensão de esporos de *A. niger* ($1 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$) e as outras dez foram tratadas com água destilada esterilizada, constituindo-se assim o controle (sem patógeno). Em seguida as plantas foram mantidas nas câmaras de crescimento tipo BOD, com as temperaturas de 12, 18, 24, 30, 36 e 42°C, e fotoperíodo de 12 h luz/12 h escuro por 30 dias. A cada 2 dias as plantas foram irrigadas com 50 ml de água destilada.

Para avaliação do progresso da podridão vermelha do sisal, foram observados e registrados os sintomas externos da doença nas plantas, a cada três dias, após a inoculação do patógeno. Para avaliação dos sintomas da podridão vermelha do sisal, utilizou-se a escala de notas ilustrada na Figura 1.

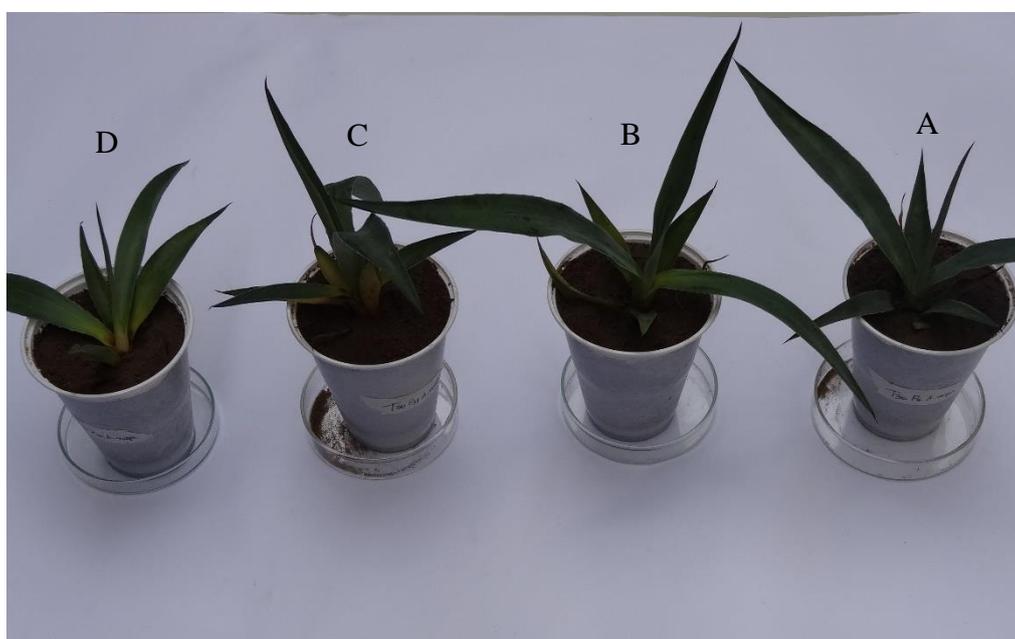


Fig. 1. (A) Nota 0- planta sem sintomas; (B) Nota 1- planta com amarelecimento inicial no caule e nas folhas; (C) Nota 2- plantas com amarelecimento e apodrecimento do caule planta ainda viva; (D) Nota 3- planta morta com apodrecimento do caule e folhas sem firmeza do caule.

Os dados foram transformados no índice da doença conforme McKinney (1923), com a seguinte equação: Índice de severidade da doença = Σ (grau da escala x frequência)/(n°. Total de unidades x grau máximo da escala). Esses dados foram utilizados para encontrar os modelos matemáticos que melhor ajuste aos dados. Os modelos testados foram: monomolecular ($Y=b_1*(1-b_2 *exp(-rt))$), logístico ($Y=b_1/(1+b_2*exp(- rt))$) e Gompertz ($Y=b_1*exp(-b_2 exp(-rt))$), em que Y é a incidência ou severidade da doença, b_1 representa a assíntota máxima estimada pelo modelo, b_2 é a constante de integração igual a $1-y_0$ (y_0 =inóculo inicial), r representa a taxa de progresso da doença e t , o tempo. As curvas de progresso da doença foram ajustada no programa Jasoncurve 2D v5.01.

Trinta dias após a inoculação das plantas, foi avaliada a temperatura interna dos tecidos das plantas, com um termômetro digital de precisão tipo espeto. As avaliações foram feitas em cinco plantas selecionadas aleatoriamente entre as inoculadas com a suspensão de *A. niger* e cinco plantas tratadas com água destilada. Nesse mesmo período, avaliou-se a incidência da doença para cada tratamento, observando-se o número de plantas com e sem sintomas, para o cálculo da porcentagem de plantas sintomáticas. Para avaliação da severidade da doença, as plantas foram coletadas e fez-se o corte transversal de toda a planta para observação dos sintomas internos. Utilizou-se a escala de notas descrita por Sá (2009) e ilustrada na Figura1B. Os dados de severidade foram transformados para Índice da Doença, conforme McKinney (1923) sendo calculado pela equação:

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

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, composto por seis tratamentos (temperaturas) com 20 repetições (plantas inoculadas com *A. niger*) e um controle (dez plantas sem inoculação do patógeno).



Fig. 2. Escala de notas adotada para avaliar a severidade da podridão vermelha do sisal em mudas inoculadas. **(A)** Nota 0 - planta sadia; **(B)** Nota 1 - sintoma inicial de vermelhidão nas base das folhas com sintomas mais externos; **(C)** Nota 2 -vermelhidão dos tecidos internos do caule; **(D)** Nota 3 - planta morta.

Os dados de progresso da doença foram analisados por regressão linear e não-linear para selecionar os modelos com os melhores ajustes às curvas de progresso da doença com base no coeficiente de determinação (R^2). Os dados de AACPD, incidência e severidade foram submetidos à análise de variância ($P < 0,05$) e, quando constatada significância, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Utilizou-se o programa estatístico SISVAR 4.0 (FERREIRA, 2000).

Frequência de *A. niger* em tecidos de caule de plantas assintomáticas

Para a avaliação da presença de *A. niger* em tecidos de caule de plantas de sisal sem sintomas de podridão vermelha, foram analisadas aleatoriamente cinco plantas de cada tratamento, sem sintomas da doença durante todo o período de incubação de 30 dias. Para o isolamento de *A. niger*, os tecidos do caule foram

cortados na região próxima aos pontos de inoculação, com um bisturi esterilizado. Após o corte dos tecidos do caule, fez-se a desinfestação destes com álcool 70% por 1 min, hipoclorito de sódio 1% por 1 min e três lavagens com água destilada esterilizada. Os pedaços de tecido desinfestado foram colocados em placas de Petri com meio BDA salino (6% de NaCl), sendo estas vedadas com filme PVC e incubadas a 28°C por 5 a 7 dias. Após incubação, foi avaliada a colonização pelo fungo, com base na contagem do número de fragmentos que apresentavam crescimento de *A. niger*, em relação ao número total de fragmentos analisados por placa, sendo os dados expressos em porcentagem (%).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Crescimento e esporulação de *Aspergillus niger in vitro*

Estudos referentes ao efeito da temperatura no crescimento micelial de fungos patogênicos vêm sendo realizados com o intuito de encontrar estratégias de controle mais eficazes para as culturas afetadas (WHITING et al., 2001; SHEHU e BELLO 2011; DIAS et al., 2005; MAIA et al., 2011; POLTRONIERI et al., 2013).

Para o *A. niger*, agente causal da podridão vermelha do sisal, observou-se um efeito significativo da temperatura nos parâmetros de crescimento do fungo ($P > 0,05$). Houve um crescimento linear da colônia na faixa de temperatura de 12 a 30°C, ocorrendo um decréscimo no seu crescimento na faixa de 36 a 42°C (Figura 2A). A temperatura ótima para o crescimento *A. niger* foi estimada em 27,7°C, com índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) estimado de 0,73 cm/dia. As temperaturas extremas de 12 e 42°C não favoreceram o crescimento de *A. niger*, sendo a taxa de crescimento de aproximadamente 0,1 cm/dia.

Em relação ao diâmetro da colônia, a temperatura ótima de crescimento foi estimada em 28,4°C, com um diâmetro médio de 6,82 cm. Nas temperaturas de 12 e 42°C, houve crescimento micelial, mas com o menor diâmetro das colônias, alcançando 1 e 1,5 cm, respectivamente, durante oito dias de incubação (Figura 2B).

A esporulação do fungo sofreu influência da temperatura, semelhante ao observado para o crescimento da colônia, com esporulação nas colônias crescidas nas temperaturas variando de 18, 24, 30 e 36°C. A temperatura de 28,1°C foi estimada como ótima para a esporulação de *A. niger*, com a média de $4,93 \times 10^7$ esporos por

cm² de colônia (Figura 2C). Nas temperaturas extremas de 12 e 42°C, o fungo apresentou baixo crescimento micelial e não esporulou, apresentando colônias de coloração branca.

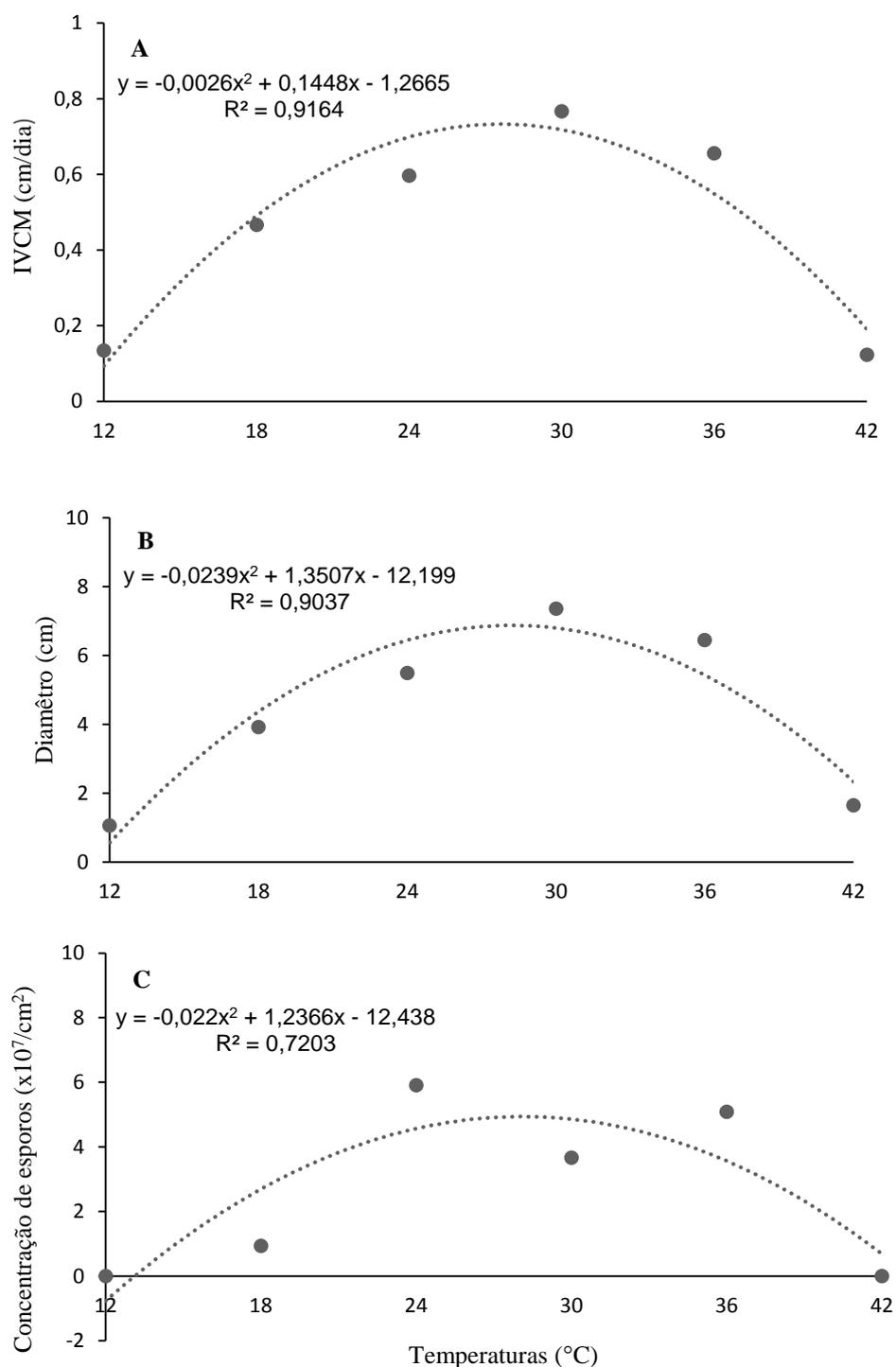


Figura 2. Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) (A), Diâmetro da colônia (B) e Concentração de esporos (x10⁷/cm²) (C) de *A. niger* durante oito dias de incubação em BOD nas diferentes temperaturas sob alternância luminosa (12 h luz/12 h escuro).

Vários autores relataram diferentes faixas de temperatura para o crescimento de *A. niger*. Schuster et al. (2002) relatam que o *A. niger* cresce em faixa de temperatura variando de 6 a 47°C, com temperatura ótima entre 35 e 37°C. Shehu e Bello (2011) descreveram a faixa ótima de temperatura para o crescimento de *A. niger* entre 30 e 35°C, enquanto que Alborch et al. (2011) encontraram uma ampla faixa de temperatura ótima de crescimento variando de 25 a 40°C. Para Palacios-Cabrera et al. (2005), *A. niger* cresce na faixa de temperatura entre 25 a 41°C, com preferência por temperaturas acima de 30°C e sem crescimento na temperatura de 8°C.

De modo geral, a literatura indica que *A. niger* tem sua faixa ótima de crescimento entre 25 a 40°C, com maior preferência por temperaturas mais elevadas de 30 a 35°C. Essa variação nas faixas de temperatura ótima de crescimento do fungo, pode estar associada a temperatura do ambiente em que o fungo foi isolado, considerando-se que o fungo encontra-se adaptado as condições ambientais. O isolado 131 de *A. niger*, testado no presente trabalho, foi isolado de plantas de sisal (*Agave sisalana* Perrine ex Engelm), com sintomas de podridão vermelha, na região semiárida da Bahia. Esta região do nordeste brasileiro é caracterizada por temperaturas médias elevadas com média anuais entre 26 e 28°C (PEREIRA JUNIOR, 2007).

A temperatura influencia o crescimento micelial e a esporulação do fungo, atuando como um fator regulador do seu crescimento no ambiente e, conseqüentemente, no desenvolvimento e disseminação dessa doença. Tanto o micélio como os esporos são estruturas de disseminação deste patógeno.

Anderson e Smith (1971) observaram que temperaturas elevadas de 41 e 44 °C resultaram numa maior produção dos conidióforos do que conídios (esporos) por *A. niger*, além de afetar a germinação de esporos e causar deformações nas estruturas reprodutivas impossibilitando a produção de esporos. Não foram encontrados relatos na literatura científica sobre o efeito de temperaturas baixas, a exemplo de 12°C, na taxa de crescimento e esporulação de *A. niger*.

Nas análises microscópicas das estruturas da colônia de *A. niger*, submetidas as temperaturas variando entre 12 e 42°C, foi observado que na temperatura de 12°C houve a produção de estruturas reprodutivas como conidióforos e fiáldes e em

algumas lâminas foram encontrados alguns esporos imaturos e maduros. Na colônia submetida a temperatura de 42°C houve uma maior produção de conidióforos e em algumas lâminas foram visualizadas fialides, mas não houve a produção de esporos. Constatou-se ainda que não ocorreram, em ambas temperaturas, modificações nas hifas do fungo (Anexo C).

Culturas de *A. niger* incubadas a 12 e 42°C por 8 dias e posteriormente transferidas para 28°C retomaram o crescimento e a esporulação, atingindo a borda da placa de Petri após 4 dias de incubação. Estas observações indicam que as temperaturas extremas causaram um estado de latência, entretanto sem causar a morte celular e, com a mudança de temperatura, neste caso para a temperatura ótima de 28°C, o fungo retomou o crescimento e esporulação.

Influência da temperatura no progresso da podridão vermelha do sisal

Os modelos matemáticos testados no ajuste das curvas de progresso da podridão vermelha do sisal sob diferentes temperaturas (monomolecular, logístico e Gompertz) mostraram coeficientes de determinação (R^2) muito similares para as temperaturas mais elevadas de 24, 30, 36 e 42°C. Devido a este resultado e por ter apresentado o coeficiente de determinação mais elevado, escolheu-se o modelo monomolecular para a comparação das temperaturas (Tabela 1). Nenhum modelo se ajustou para as temperaturas mais baixas de 12 e 18°C.

Tabela 1. Coeficiente de determinação(R^2), parâmetros a, b e projeção da doença em tempo(t) para o alcance da severidade nas plantas de acordo com as temperaturas, estimados pelo modelo monomolecular.

Temperaturas(°C)	Severidade da doença			
	R^2	a	b	t (dias)
12	---	---	---	---
18	---	---	---	---
24	0,997	$5,97 \times 10^{-12} \pm 3,6 \times 10^{-11}$	$0,3396 \pm 0,022$	23
30	0,999	$2,93 \times 10^{-9} \pm 7,4 \times 10^{-9}$	$0,3349 \pm 0,013$	23
36	0,996	$2 \times 10^{-4} \pm 0,00028$	$0,3399 \pm 0,022$	20
42	0,997	$2,5 \times 10^{-2} \pm 0,0147$	$0,6876 \pm 0,054$	9

O parâmetro a apresenta a precocidade do aparecimento dos sintomas quando comparadas as temperaturas observa-se na tabela que quanto maior a temperaturas mais rápido é o surgimento de sintomas nas plantas. No parâmetro b e a velocidade que com que surge novas plantas doentes, nas temperaturas 24, 30 e 36°C o surgimento de novas plantas com sintomas são praticamente a mesma, enquanto na temperatura de 42°C o surgimento de novas plantas e duas vezes maior que as demais temperaturas. O parâmetro t faz uma projeção de acordo com os dados, fazendo uma estimativa em cada temperatura de quanto tempo que é necessário para as 99% das plantas alcance os sintomas, observa-se que a temperatura mais elevada de 42°C em apenas 9 dias para 99% ficarem doentes.

A temperatura mais elevada testada, 42°C, apresentando os primeiros sintomas aos seis dias após a inoculação, com índice da doença de 64 % e alcançando índice de 100% após 12 dias de inoculação com *A. niger*, com todas as plantas mortas (Anexo A). Na temperatura de 36°C, as plantas também apresentaram sintomas seis dias após inoculação, com índice da doença de 35 % e alcançando a índice de 100%, 18 dias após inoculação. As plantas mantidas nas temperaturas de 24 e 30°C, apresentaram os primeiros sintomas da doença seis dias após a inoculação, com índice da doença de 1 e 6% respectivamente, alcançando índice de 100% apenas 24 dias após a inoculação (Figura 3).

As plantas mantidas sob a temperatura de 18°C apresentaram os primeiros sintomas 15 dias após serem inoculadas, com índice da doença de 2%, e ao final do período de avaliação as plantas atingiram índice da doença de apenas 16% (Figura 3), indicando que essa temperatura não favorece o desenvolvimento da doença nas plantas. Quando comparada com as temperaturas mais elevadas que atingiram índice da doença de 100% nas plantas antes dos 30 dias, houve uma redução no índice da doença de 84%.

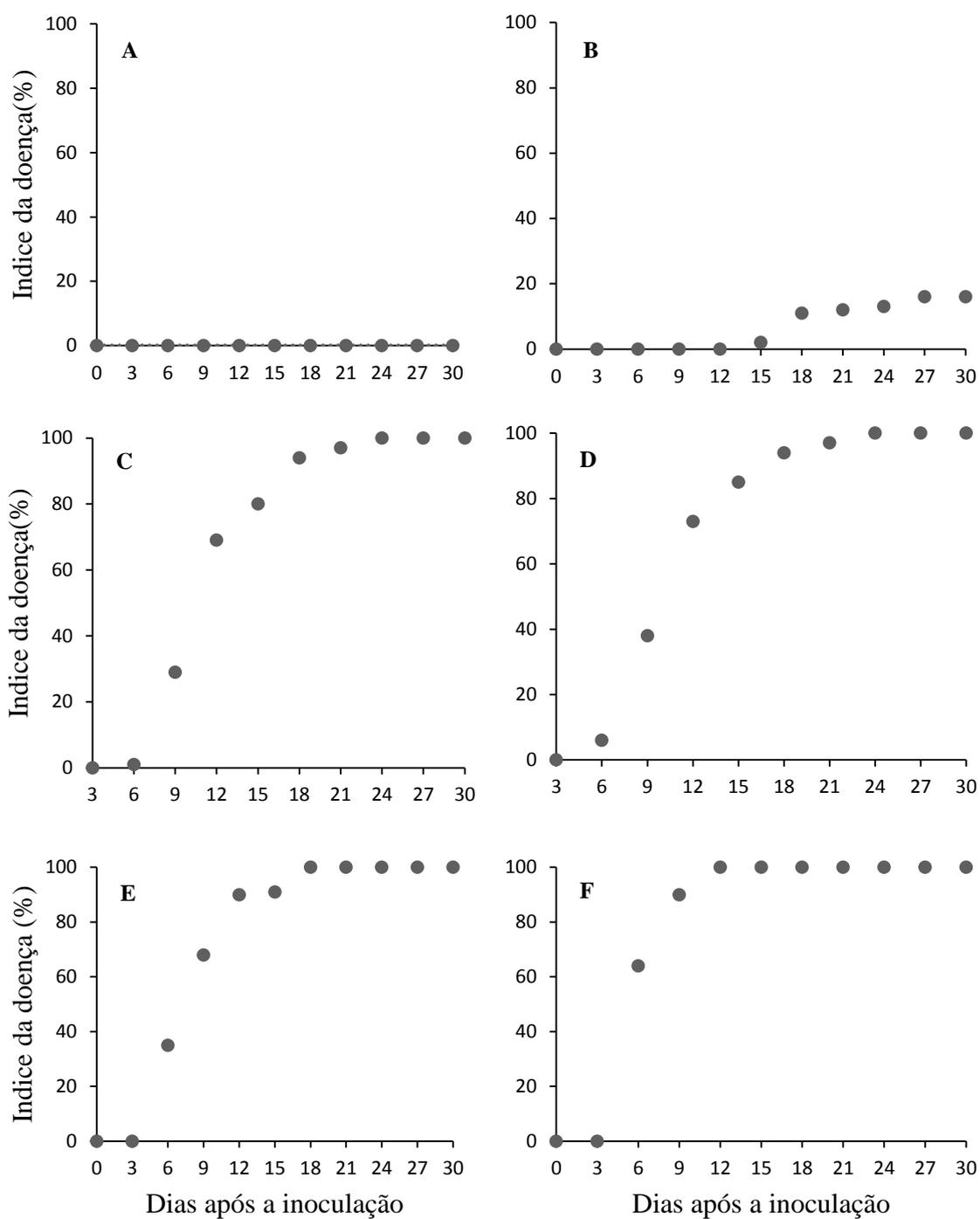


Figura 3. Progresso da podridão vermelha em plantas de sisal inoculadas com *A. niger* e mantidas nas temperaturas de 12°C (A), 18°C (B), 24°C (C), 30°C (D), 36°C (E) e 42°C (F) e alternância luminosa (12 h luz/12 h escuro).

Na temperatura de 12°C não houve o surgimento de sintomas externos durante todo o período de avaliação, estando as plantas no final do experimento

assintomáticas e vigorosas (Figura 4). Esse resultado indica que temperaturas muito baixas impede o desenvolvimento da doença nas plantas de sisal.

As mudas tratadas com água destilada e incubadas nas mesmas temperaturas, durante todo o período de avaliação, não apresentaram sintomas da doença e nem morreram, comprovando que a causa da morte das plantas não foi pela temperatura e sim pelo patógeno (Figura 4).

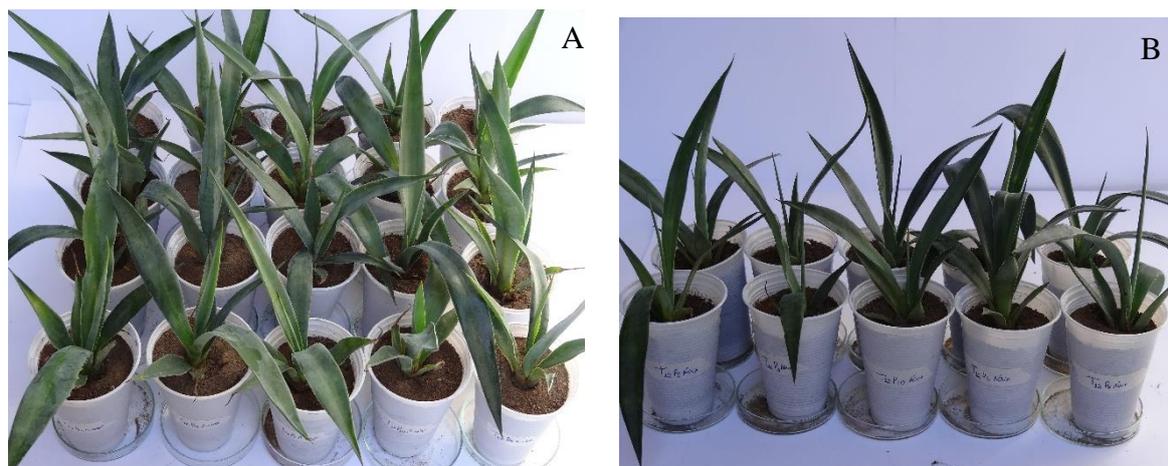


Figura 4. Plantas de sisal mantidas na temperatura de 12°C: A- inoculadas com *A. niger* e B- Tratadas com água.

A incidência da doença variou de 5 a 100% nas plantas sob as diferentes temperaturas. Não houve diferença significativa entre as temperaturas 24, 30, 36 e 42°C, obtendo incidência de 100%. A temperatura de 18°C promoveu a incidência de doença nas plantas de 45%, enquanto a temperatura de 12°C não proporcionou o desenvolvimento da doença, tendo a incidência alcançado apenas 5%.

A severidade da doença alcançou 100% nas temperaturas de 24, 30, 36 e 42°C. Nas temperaturas mais baixas houve menor severidade da doença, com valores de 17,2% e 0,25% de severidade nas plantas mantidas nas temperaturas de 18 e 12°C, respectivamente.

Tabela 1. Incidência (%) e Severidade (%) da podridão vermelha em plantas de sisal inoculadas com *A. niger* e mantidas em câmara de crescimento tipo BOD com diferentes temperaturas e sob alternância luminosa (12 h luz/12 h escuro), por um período de 30 dias.

Temperaturas (°C)	Incidência (%)¹	Severidade (%)²
12	5 c	0,25±0,5 c
18	45 b	17,25±8,92 b
24	100 a	100±0,0 a
30	100 a	100±0,0 a
36	100 a	100±0,0 a
42	100 a	100±0,0 a
CV %	7,95	5,22

¹Soma do número de mudas sintomáticas dividido pelo número total de vinte plantas;

²Valores determinados seguindo a escala de notas descrita por Sá, (2009). Valores médios de vinte repetições (20 plantas). Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Na Tabela 3 estão apresentados os valores das temperaturas internas das plantas mantidas nas diferentes temperaturas durante 30 dias. Observa-se que não ocorreram grandes discrepâncias entre as temperaturas internas dos tecidos das plantas de sisal e as temperaturas das câmaras de crescimento e entre as plantas inoculadas com *A. niger* e aquelas tratadas apenas com água destilada. A diferença foi de aproximadamente 1 a 2°C entre a temperatura externa na câmara de crescimento e a interna nos tecidos das plantas de sisal. Portanto, pode-se sugerir que o comportamento de *A. niger* observado no cultivo deste em meio de cultura (etapa *in vitro*), sob as mesmas temperaturas, pode ter ocorrido também nos tecidos internos da planta (etapa *in vivo*).

Tabela 3. Temperaturas médias do tecido interno do caule das plantas de sisal inoculadas com *A. niger* e plantas tratadas apenas com água destilada, mantidas em câmaras de crescimento com diferentes temperaturas, sob alternância luminosa (12 h luz/12 h escuro), durante 30 dias.

Temperaturas externas (°C)	Temperaturas interna (°C)	
	Mudas inoculadas com <i>A. niger</i>	Mudas tratadas com Água destilada
12	13,82±0,36*	12,35±0,42*
18	17,35±0,40	16,2±0,29
24	23,32±0,64	23,22±0,91
30	30,32±1,04	31,45±1,29
36	34,65±0,35	36,42±1,08
42	39,2±0,23	40,87±0,85

*Médias com desvio padrão de cinco mudas de sisal analisadas aleatoriamente.

Esses resultados comprovam que a temperatura é um fator limitante para o desenvolvimento da doença, a incidência e severidade da podridão vermelha do sisal em plantas de sisal. As temperaturas mais elevadas, 24, 30, 36 e 42°C proporcionaram o surgimento de sintomas externos mais rapidamente, com seis dias após inoculação do patógeno e os sintomas foram mais severos nessas temperaturas. Em temperaturas mais baixas, os sintomas externos surgiram 15 dias após inoculação do patógeno e a severidade da doença foi baixa, quando comparada com as temperaturas mais elevadas.

Essas informações estão de acordo com as observações de campo e estudos de casa de vegetação. Nos períodos mais frios do ano, entre os meses de maio e setembro, não se observa o progresso da doença na região semiárida na Bahia. Da mesma forma, a incidência da doença é baixíssima ou esta não ocorre em plantas inoculadas e mantidas em casa de vegetação.

Estes dados são importantes pois apesar do sisal apresentar boa resistência às condições ambientais adversas do semiárido (MEDINA, 1954), essa região é

caracterizada por possuir temperaturas médias elevadas com médias anuais entre 26 e 28°C (PEREIRA JUNIOR, 2007), com temperaturas mínimas acima de 15°C e as máximas podendo atingir 40°C dependendo do relevo (ARAÚJO, 2011). A temperatura média anual da região semiárida está dentro da faixa ótima de desenvolvimento da doença e de crescimento e esporulação de *A. niger* (Figuras 2). É necessário adotar algumas medidas preventivas ou curativas para evitar que a doença continue a avançar nas áreas produtoras de sisal.

Apesar das temperaturas mais baixas testadas causarem baixa incidência da doença, quando avaliada a frequência de colonização de *A. niger* nos tecidos do caule das plantas assintomáticas, obteve-se a frequência de 50 e 82% dos tecidos colonizados pelo *A. niger* nas plantas mantidas nas temperaturas de 12 e 18°C. Estes dados sugerem que o *A. niger* estava presente nos tecidos internos das plantas, embora não tenha causado sintomas externos e internos de podridão nas plantas expostas à temperatura de 12°C. Este fungo causou baixa severidade e alguns sintomas externos nas plantas expostas a temperatura de 18°C, durante o período de avaliação. Estes dados levam a postular a hipótese de que o fungo permanece numa fase latente nessas condições, não causando sintomas externos e baixa severidade. Entretanto, uma mudança para condições favoráveis ao seu crescimento e colonização, o fungo pode causar a doença. Nesse caso, podemos alertar sobre a obtenção de mudas de sisal (rebentos) para o plantio de novas áreas e replantio nas áreas afetadas pela podridão vermelha, pois embora sem sintomas visíveis e aparentemente saudáveis, as plantas podem estar infectadas e colonizadas pelo patógeno e, em determinadas condições ambientais, manifestar a doença.

Na temperatura de 12°C houve uma relação entre os resultados *in vitro* sobre *A. niger* e os resultados de incidência, severidade e progresso da doença. Essa temperatura não proporciona o crescimento e esporulação de *A. niger* e nenhum sintoma interno ou externo da doença foi observado nas plantas de sisal. Embora na temperatura de 42°C o agente etiológico não tenha apresentado crescimento e esporulação satisfatórios em condições *in vitro*, no estudo nas plantas de sisal, o mesmo causou a doença, alcançando os maiores valores em todas as variáveis estudadas. Esse fato pode estar relacionado ao estresse que as plantas sofreram por estarem expostas a uma temperatura constante muito elevada, embora o sisal suporte altas temperaturas (BELTRÃO, 2006). Nesse tratamento, as plantas apresentaram

sintoma severos de amarelecimento, murcha das folhas e com aspecto de queima das folhas, enquanto que nas temperaturas de 24 a 36°C, as plantas murcharam, o caule apodreceu, mas sem alteração na coloração das folhas (Figura 5).

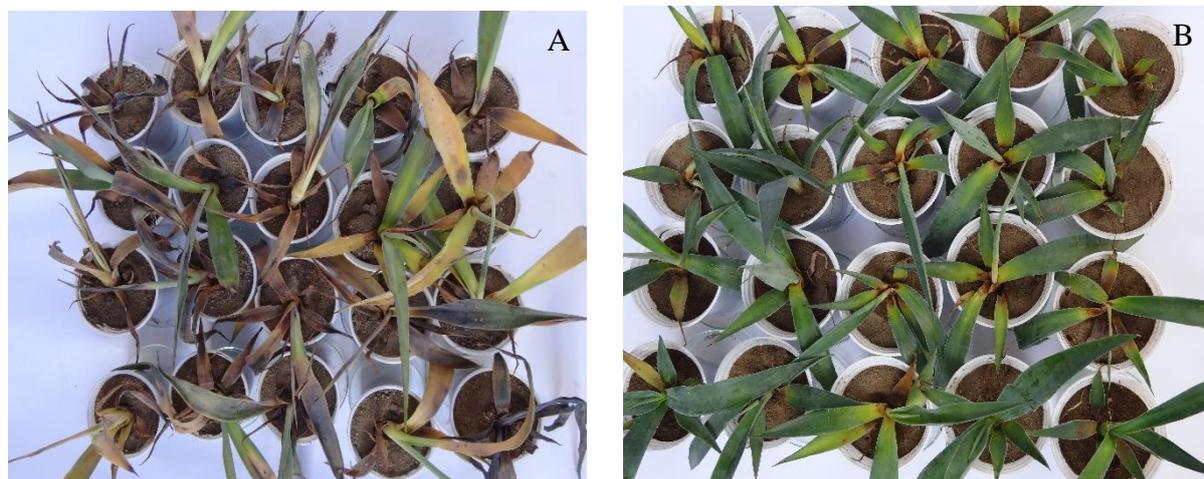


Figura 5. Plantas de sisal inoculadas com *A. niger* e mantidas nas temperaturas de 42 (A) e 30°C (B) durante o período de 30 dias.

Para Bergamin Filho et al. (1995) os fatores do ambiente podem determinar o grau de predisposição do hospedeiro, influenciando desde o estabelecimento da doença na cultura até o desencadeamento da epidemia. Para Agrios, (2005) quando fatores abióticos como a temperatura, ocorrem em níveis acima ou abaixo de um determinado intervalo tolerado pelas plantas, favorecem o surgimento de doenças. As doenças de plantas ocorrem mais rapidamente quando a temperatura é ótima para o patógeno, mas acima ou abaixo da ideal para o hospedeiro, enquanto que temperatura abaixo ou acima da ótima para o agente patogênico, ou próxima da ideal para o hospedeiro torna o desenvolvimento da doença mais lento (AGRIOS, 2005). Dessa forma, trabalhos que visem determinar condições mais favoráveis ao patógeno e as condições que predispõem a planta ao patógeno são imprescindíveis para se traçar estratégias para o seu controle (SILVEIRA et al., 2004; DIAS et al., 2005; SOARES et al., 2008). O presente trabalho demonstra cientificamente, o quanto o fator ambiental temperatura influencia na ação do patógeno e no progresso da podridão vermelha em plantas de sisal.

A podridão vermelha do sisal tem ameaçado a sustentabilidade da cultura do sisal, sendo um dos fatores que afetam a sua produção no Estado da Bahia. Os resultados deste trabalho são pioneiros e darão subsídios para a melhor compreensão do patossistema *Agave sisilana* – *Aspergillus niger* e para se traçar estratégias de controle mais eficientes na diminuição da incidência da doença nas áreas produtoras de sisal na Bahia.

Conclui-se que a temperatura afeta o desenvolvimento de *A. niger* e o progresso da podridão vermelha do sisal. Temperaturas abaixo de 18°C retardam o progresso, enquanto que temperaturas acima de 24°C favorecem o desenvolvimento da doença e o crescimento e esporulação do agente causal, *A. niger*.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, a Financiadora de Estudos e Projetos- FINEP, a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia- FAPESB, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, K. C. L. de M. **Epidemiologia da podridão vermelha do sisal no Estado da Bahia**. 2010. 100f. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. Cruz das Almas, 2010.

ANDERSON, G.; SMITH, J. E. The Production of Conidiophores and Conidia by Newly Germinated Conidia of *Aspergillus niger* (Microcycle Conidiation). **Journal of General Microbiology** v.69, p.185-197. 1971.

AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. — 5th ed., Academic Press. 2005. 922p.

ALBORCH, L; BRAGULAT, M. R; ABARCA, M. L; CABAÑES, F. J. Effect of water activity, temperature and incubation time on growth and ochratoxin A production

Aspergillus niger and *Aspergillus carbonarius* on maize kernels. **International Journal of Food Microbiology**, v.147, p. 53-57, 2011.

ALVES, M. O; SANTIAGO, E. G. Tecnologia e relações sociais de produção no setor sisaleiro nordestino. **Revista Econômica do Nordeste**, Fortaleza, v.37, n.3, p.368-381, 2006.

ARAÚJO, S. M. S. de. A região semiárida do nordeste do Brasil: Questões ambientais e possibilidades de uso sustentável dos recursos. **Revista rios eletrônica**. n. 5 dezembro de 2011.

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. **Circular Técnica 92**. Petrolina, Dezembro de 2010.

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

CAMPBELL, C.L. & MADDEN, L.V. **Introduction to plant disease epidemiology**. Wiley-Interscience, New York. 1990, 532p.

BERGAMIN FILHO, A; KIMATI, H; AMORIM, L. **Manual de fitopatologia**; 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v.1, 1995, 919 p.

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

CONAB, 2013. **Companhia Nacional de Abastecimento**. Sisal – safra 2012/2013: comercialização – proposta de ações. Brasília-DF, 01 de outubro de 2012.

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

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

DIAS, M. B; POZZA. E. A; ABREU, M. S; MIRANDA, E. O. Efeito da temperatura no crescimento micelial, produção e germinação de conídios de *Colletotrichum* spp. isolados de *Coffea arabica* L. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, n. 3, p. 545-552. 2005.

FERREIRA, D. F. SISVAR (Sistema para análise de variância) para Windows, Versão 4.0. São Carlos. 2000.

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

LOCK, G. W. **Sisal**. London: Longmans, 1962. 355p.

MAIA, F. G. M; ARMESTO, C; ZANCAN, W. L. A; MAIA, J. B; ABREU, M. S. de. Efeito da temperatura no crescimento micelial, produção e germinação de conídios de *Colletotrichum* spp. isolados de mangueira com sintomas de antracnose. **Bioscience Journal**, v. 27, n. 2, p. 205-210. 2011.

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

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

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

PALACIOS-CABRERA, H; TANIWAKI, M. H; HASHIMOTO, J. M; MENEZES, H. C. de. Growth of *Aspergillus ochraceus*, *A. carbonarius* and *A. niger* on culture media at different water activities and temperatures. **Brazilian Journal of Microbiology**. p. 24-28. 2005.

PEREIRA JUNIOR, J. S. Nova delimitação do semiárido brasileiro, 2007. Biblioteca Digital da Câmara dos Deputados. <http://bd.camara.gov.br/bd/handle/bdcamara/1604> acesso em 19 de setembro de 2014.

POLTRONIERI, T. P. de S; AZEVEDO, L. A. S. de; SILVA, D. E. M. da. Efeito da temperatura no crescimento micelial, produção e germinação de conídios de *Colletotrichum gloeosporioides*, isolados de frutos de palmeira juçara (*Euterpe edulis* Mart). **Summa phytopathol**, vol.39, n.4, p.281-285. 2013.

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

SANTOS, P. O; SILVA, A. C. M da; CORRÊA, É. B; MAGALHÃES, V. C; SOUZA, J. T. Additional species of *Aspergillus* causing bole rot disease in *Agave sisalana*. **Tropical Plant Pathology**, v. 39, n.4, p.331-334, 2014.

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

SHEHU, K; BELLO, M. T. Effect of Environmental Factors on the Growth of *Aspergillus* Species Associated with Stored Millet Grains in Sokoto. **Nigerian Journal of Basic and Applied Science**, v.19, n. 2, p.218-223, 2011.

SILVA, M. H. S. da. Aspectos bioecológicos de *Aspergillus niger*, fungo causador da podridão vermelha do sisal. 2012. 99f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Cruz das Almas, 2012.

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

SILVEIRA, N. S. S; MICHEREFF, S. J; MARIANO, R. L. R; TAVARES, L. A; MAIA, L. C. Influência da temperatura, período de molhamento e concentração do inóculo de fungos na incidência de podridões pós-colheita em frutos de tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.26, p.33-38, 2001.

SILVEIRA, E. B; MARIANO, R. L. R; MICHEREFF, S. J; OLIVEIRA, S. M. A. Influência da temperatura, umidade, concentração de inóculo de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* e idade do fruto no desenvolvimento da mancha-aquosa em melão. **Fitopatologia Brasileira** v. 29, p. 034-038, 2004.

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

SOARES, A. R; LOURENÇO, S. A; AMORIM, L. Infecção de goiabas por *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum acutatum* sob diferentes temperaturas e período de molhamento, **Tropical Plant Pathology**, v. 33 n. 4, p. 265-272, 2008.

WHITING, E. C., KHAN, A., and GUBLER, W. D. Effect of temperature and water potential on survival and mycelial growth of *Phaeoconiella chlamydospora* and *Phaeoacremonium* spp. **Plant Disease**, v. 85, n. 2, p.195-201, 2001.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As combinações de bactérias apresentaram inibição do crescimento micelial e germinação de esporos de *A. niger* e promoveram o controle da podridão vermelha do sisal em condições de campo. Entretanto, quando comparados os resultados destas combinações de bactérias com a utilização das bactérias isoladas não houve diferença significativa, não sendo recomendado o uso combinado desses isolados para o biocontrole da podridão vermelha do sisal. Nesse caso, recomenda-se o uso dessas bactérias de forma isolada ao invés da combinação destas.

As bactérias *Paenibacillus* sp., *Bacillus pumilus* e *Bacillus* sp. (BMH e INV) apresentaram resultados significativos na inibição da germinação de esporos e crescimento micelial de *A. niger*. As plantas de sisal mantidas em condições de campo, após inoculação com esses isolados e o patógeno, diminuíram significativamente a incidência da doença em aproximadamente 45%. A severidade da doença nas plantas foi de aproximadamente 25% e a eficiência de controle desses isolados foi acima de 70%.

Esses micro-organismos pertencentes a coleção do Laboratório de Fitopatologia e Microbiologia Agrícola da UFRB podem ser usados em trabalhos futuros para formulação de bioprodutos na prevenção da podridão vermelha em plantas de sisal.

A temperatura ótima para o crescimento e esporulação de *A. niger* é de 28°C. As temperaturas de 12 e 42°C afetaram o crescimento e esporulação de *A. niger*. As culturas mantidas nessas temperaturas durante oito dias apresentaram colônias de coloração branca e diâmetro de 1,5 cm, sem esporulação. No estudo de microscopia ótica dessas culturas, nessas temperaturas, observou-se que não ocorreram modificações nas hifas, mas houve pouquíssima ou nenhuma esporulação, embora em alguns casos tenha sido observado a produção de fiálide e alguns esporos.

Os sintomas da doença nas plantas foram afetados pela temperatura, sendo as mais elevadas, entre 24 a 42°C as que proporcionaram o aparecimento de sintomas externos mais rapidamente, com seis dias após inoculação de *A. niger* e alcançaram os maiores valores de incidência e severidade da doença. A temperatura de 18°C retarda o surgimento dos sintomas externos, com sintomas apenas 15 dias após a

inoculação de *A. niger*, enquanto que na temperatura de 12°C as plantas não apresentaram sintomas durante todo o período de avaliação.

Esses informações indicam que a temperatura é um fator limitante no desenvolvimento da podridão vermelha em plantas de sisal, tendo melhor desenvolvimento em temperaturas elevadas. Na temperatura baixa (12 a 18°C) a doença não tem um significativo desenvolvimento ou não ocorre.

É preciso continuar as pesquisas voltadas para a melhor compreensão desse patossistema e suas interações, para que se possam traçar estratégias integradas de controle e prevenção desta doença no sisal.

ANEXO A

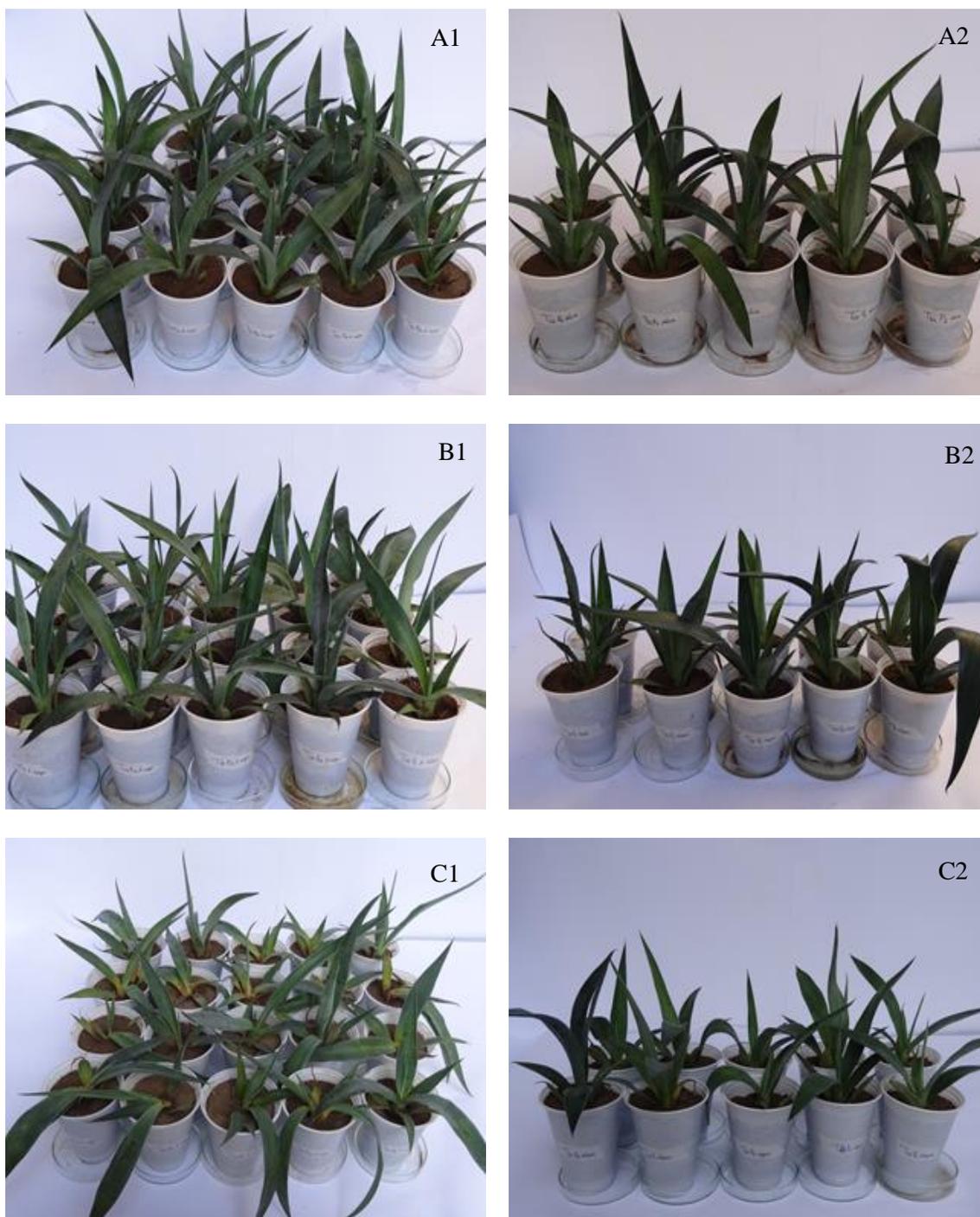


Figura 6. Mudas de sisal em copos descartáveis de 400 mL inoculadas com 100 μ L da suspensão de esporos de *A. niger* e aplicadas com 100 μ L de água destilada esterilizada, submetidas as diferentes temperaturas de incubação sob alternância luminosa (12 h claro/12 h escuro) aos 30 dias, sendo: 1- Mudas inoculadas com *A. niger* e 2- Mudas tratadas com água. Nas temperaturas: A- Temperatura de 12°C; B-Temperatura de 18°C; C- Temperatura de 24°C.

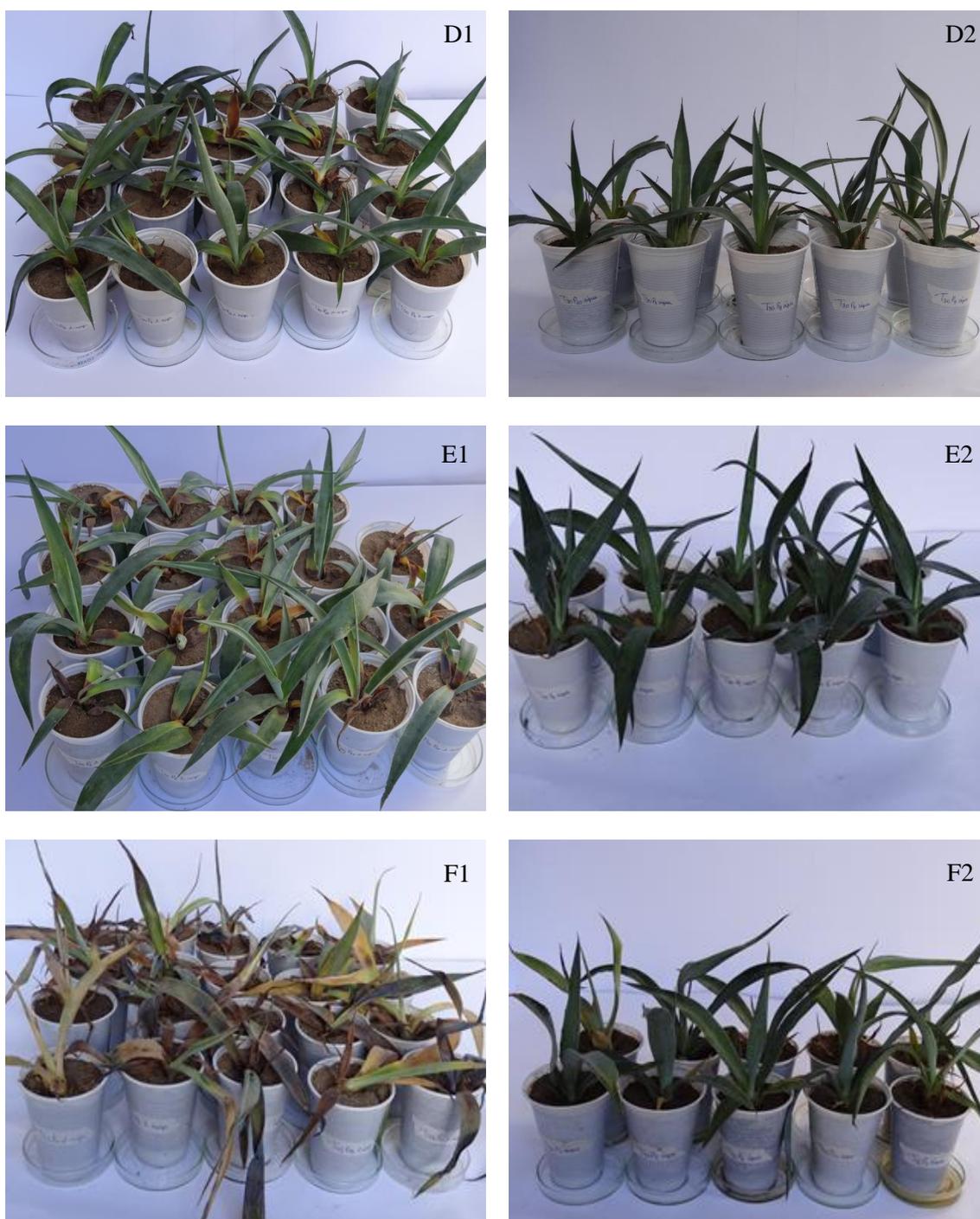


Figura 7. Mudas de sisal em copos descartáveis de 400 mL inoculadas com 100 μ L da suspensão de esporos de *A. niger* e aplicadas com 100 μ L de água destilada esterilizada, submetidas as diferentes temperaturas de incubação sob alternância luminosa (12 h luz/12 h escuro) aos 30 dias, sendo: 1- Mudas inoculadas com *A. niger* e 2- Mudas tratadas com água. Nas temperaturas: D- Temperatura de 30°C; E-Temperatura de 36°C; F- Temperatura de 42°C.

ANEXO B

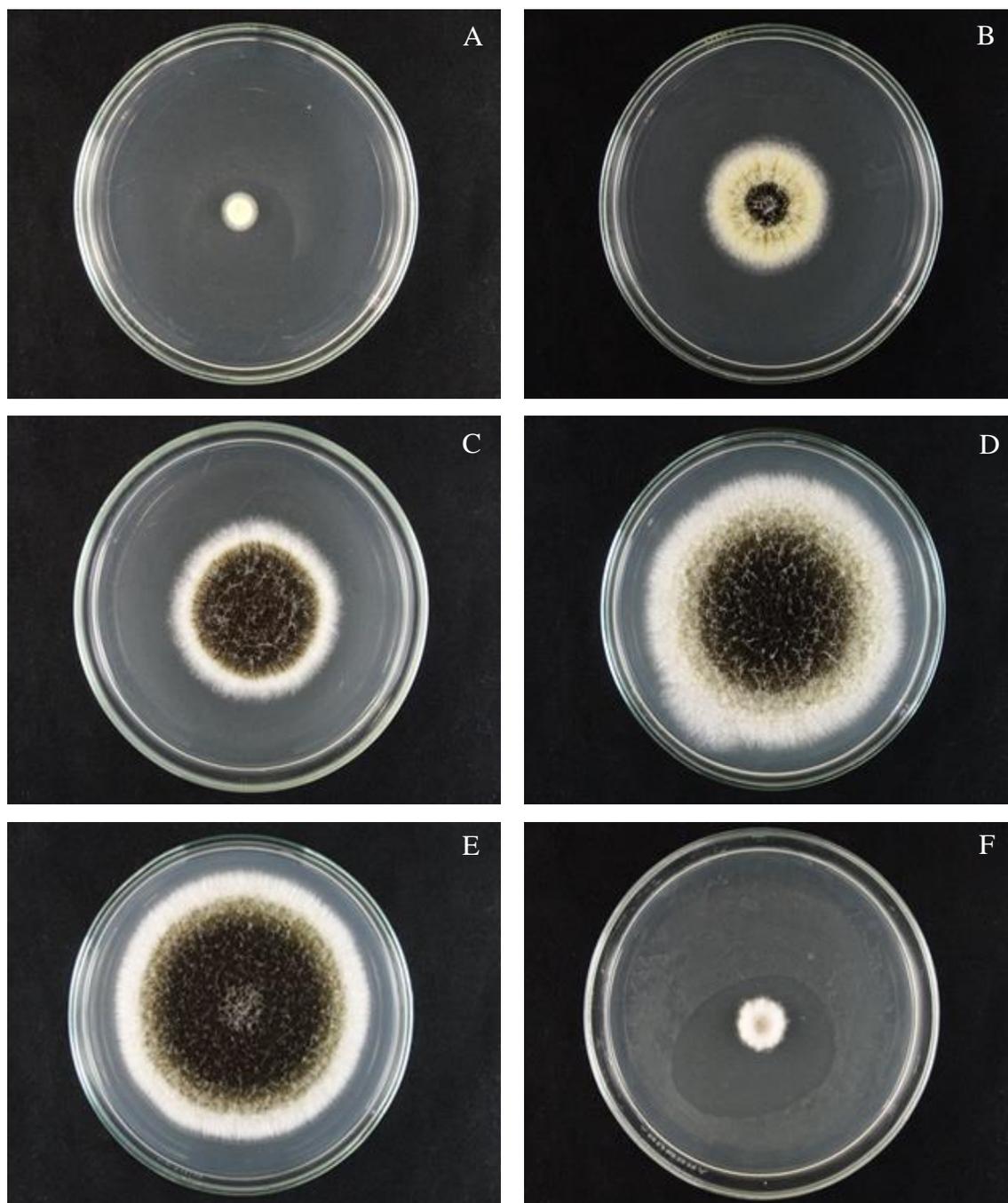


Figura 8. Crescimento de *Aspergillus niger* em placa de Petri com meio BDA, submetidos as diferentes temperaturas de incubação sob alternância luminosa (12 h luz/12 h escuro) aos 8 dias: A- Temperaturas de 12°C, B- Temperaturas de 18°C, C- Temperaturas de 24°C, D- Temperatura de 30°C, E- Temperatura de 36°C, F- Temperatura de 42°C.

ANEXO C

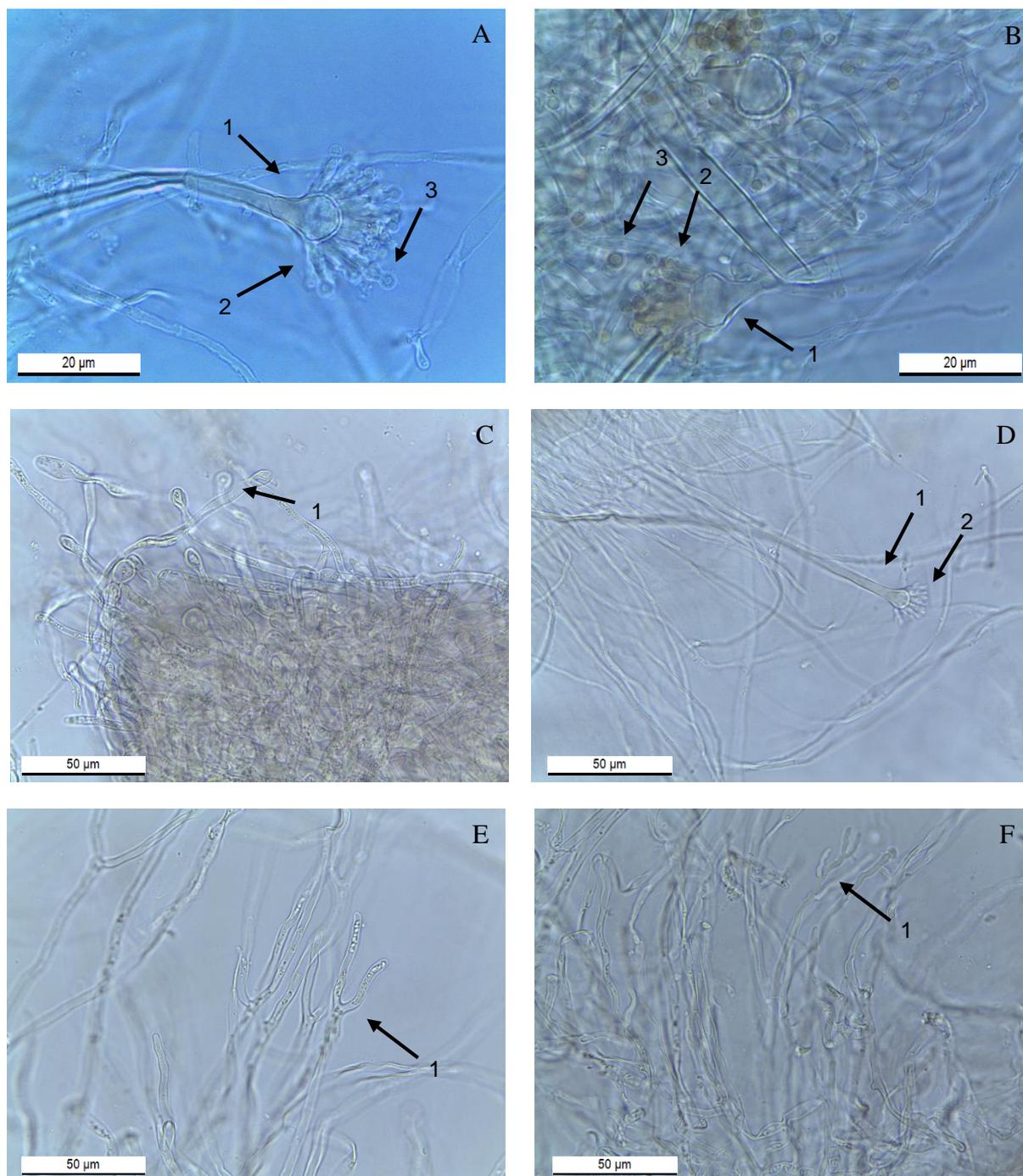


Figura 9. *Aspergillus niger* submetido as temperaturas de 12 e 42°C sob alternância luminosa (12 h claro/12 h escuro) aos 8 dias: A e B - Temperaturas de 12°C (1- Conidioforo; 2- Fiálide; 3- Esporos) C e D- Temperaturas de 42°C (1-Conidioforo; 2- Fiálide) E e F Hifas de *A. niger* das temperaturas de 12 e 42°C respectivamente.