

**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DO SERTÃO PERNAMBUCANO
CAMPUS PETROLINA ZONA RURAL**

CURSO DE BACHARELADO EM AGRONOMIA

**COMPATIBILIDADE E EFEITO DA MISTURA DE AGENTES
MICROBIANOS PARA O CONTROLE DA PODRIDÃO VERMELHA DO
SISAL**

JÉSSICA DE SOUZA LIMA

**PETROLINA, PE
2016**

JÉSSICA DE SOUZA LIMA

**COMPATIBILIDADE E EFEITO DA MISTURA DE AGENTES
MICROBIANOS PARA O CONTROLE DA PODRIDÃO VERMELHA DO
SISAL**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao IF SERTÃO-PE *Campus*
Petrolina Zona Rural, exigido para a obtenção
de título de Engenheiro Agrônomo.

**PETROLINA, PE
2016**

JÉSSICA DE SOUZA LIMA

**COMPATIBILIDADE E EFEITO DA MISTURA DE AGENTES
MICROBIANOS PARA O CONTROLE DA PODRIDÃO VERMELHA DO
SISAL**

Trabalho de Conclusão do Curso apresentado ao IF
SERTÃO-PE *Campus* Petrolina Zona Rural, exigido
para a obtenção de título de Engenheiro Agrônomo.

Aprovada em: 16 de setembro de 2016.

Dr^a. Andréa Nunes Moreira de Carvalho
(IF SERTÃO-PE)

Msc. Márcia Ferreira Queiroz
(UNEB-BA)

Dr^a. Jane Oliveira Perez (Orientadora)
(IF SERTÃO-PE)

RESUMO

A cultura do sisal tem importância significativa para região semiárida da Bahia, sendo fonte de renda para inúmeras famílias. No entanto, a doença podridão vermelha do sisal, causada por *Aspergillus niger* tornou-se um grande problema para a cultura. Na ausência de alternativas convencionais para o seu manejo, o objetivo deste estudo foi avaliar isolados bacterianos e *Penicillium citrinum* previamente selecionados, aplicados de forma combinada ou individual sobre o *A. niger* e no controle da podridão vermelha do sisal. A compatibilidade de seis bactérias e *P. citrinum* foi testada *in vitro*. *Brevibacterium* sp. 90 (B90) e *Bacillus pumilus* 105 (Bp105) não influenciaram o crescimento micelial de *P. citrinum* indicando que esses isolados foram compatíveis. Entretanto, verificou-se reações de incompatibilidade entre os isolados *Paenibacillus* sp. (512), *Serratia rubidae* (127) e *Bacillus* sp. (BMH) com *P. citrinum*. Quando avaliados em ensaios de cultivo pareado, os isolados individuais e as suas misturas inibiram o crescimento e germinação de esporos de *A. niger*. Nos estudos em casa de vegetação os isolados B90 e *P. citrinum* aplicados de forma combinada ou individual reduziram significativamente a incidência da podridão vermelha. O isolado Bp105 não mostrou efeito significativo na redução da incidência, contudo quando combinado com *P. citrinum* a incidência reduziu significativamente. Todos os tratamentos promoveram redução significativa da severidade da doença. Interações sinérgicas entre os agentes de controle biológico não foram observados.

Palavras-chave: *Agave sisalana*, *Aspergillus niger*, misturas microbianas, sinergismo

Aos meus pais, José de Souza Alves e Jeane de Souza pelo amor que a mim dedicaram. Por sempre acreditarem e apoiarem as minhas escolhas. Obrigada pelo cuidado e por serem meu suporte nos momentos mais importantes da minha vida.

Aos meus irmãos, Jefferson e Jamily pelo carinho, amizade e incentivo constantes oferecidos sempre que necessário.

Ao meu noivo Renato Mendes, pelo amor, ajuda, incentivo e companheirismo oferecidos em todas as horas.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela presença constante na minha vida, por iluminar meu caminho e me dar forças para seguir sempre em frente;

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sertão Pernambucano, pela oportunidade de realização do curso;

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária/EMBRAPA Semiárido por fornecer toda a estrutura para realização da pesquisa.

A minha orientadora Dr^a. Jane Oliveira Perez, pelos ensinamentos desde a época de iniciação científica durante o curso de Gestão em Fruticultura Irrigada até os dias atuais- incontestável exemplo de profissional e grande ser humano. Sem o seu incentivo e apoio eu não teria chegado tão longe. Minha admiração por você é imensa.

Ao Dr. Carlos Alberto Tuão Gava, pela coorientação, confiança, amizade e pela disposição em ajudar e contribuir para a realização deste trabalho;

Aos professores do IF SERTÃO-PE, pelos ensinamentos transmitidos e pela contribuição para minha formação como Engenheira Agrônoma;

Aos meus amigos de curso, em especial, ao Eliel Ferreira pelo companheirismo, auxílio na realização dos trabalhos e pelos momentos de descontração, a Rosineide Parente pela ajuda e pelos abraços carinhosos que ajudavam a recarregar minhas energias, a Juliane Alves por toda ajuda e apoio quando mais precisei, e aos demais pela boa convivência durante esses anos;

Aos meus pais, José e Jeane, que me deram não somente a vida, mais principalmente a minha educação e condições de estudo;

Aos meus irmãos Jefferson e Jamily por sempre torcerem por mim;

Ao meu companheiro Renato Mendes pelo estímulo, pela valiosa colaboração em todos os momentos deste trabalho pelo amor e carinho;

Enfim a todos que contribuíram direta e indiretamente para a realização deste trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

Muito obrigada!

“Ama-se mais o que se conquista com esforço”.

(Benjamim Disraeli)

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Página
Figura 1: Escala de notas adotada para avaliar a severidade da podridão vermelha do sisal em mudas inoculadas (SÁ, 2009). (A) nota 0 – Sem sintomas, apenas lesões mecânicas causadas pela perfuração da agulha; (B) nota 1 – Sintoma inicial, lesão maior do que a causada pela agulha, podridão na base da folha mais externa; (C) nota 2 – Sintoma avançado, podridão no interior da planta, planta ainda viva; (D) nota 3 – Planta morta, caule totalmente destruído.....	19
Figura 2: Teste de compatibilidade entre isolados bacterianos e <i>Penicillium citinum</i> em meios de cultura BDA (Batata Dextrose Ágar) e BF (Mishra et al., 2013). *105: <i>Bacillus pumilus</i> ; BMH: <i>Bacillus</i> sp.; 512: <i>Paenibacillus</i> sp.; 127: <i>Serratia rubidaea</i> ; INV: <i>Bacillus</i> sp.; 90: <i>Brevibacterium</i> sp.....	21
Figura 3: Efeito da aplicação de preparações contendo isolados individuais e suas misturas na inibição da germinação de conídios e crescimento micelial de <i>Aspergillus niger</i> NA131. Cont: Controle contendo apenas o patógeno; Bp105: <i>B. pumilus</i> ; B90: <i>Brevibacterium</i> sp.; Pc: <i>P. citrinum</i> . *Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).....	23

SÚMARIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	10
2. REFERENCIAL TEÓRICO	11
3. OBJETIVOS	17
3.1. Objetivos Geral	17
3.2. Objetivos específicos	17
4. MATERIAL E MÉTODOS	18
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
6. CONCLUSÕES	28
REFERÊNCIAS	29

1 INTRODUÇÃO

Originário da região semiárida da Península de Yucatán, no México, o sisal (*Agave sisalana* Perrine ex. Engelm) é uma monocotiledônea tolerante à seca que pertence à família Agavaceae. A fibra dura produzida por esta planta tem múltiplas aplicações que variam de tapeçaria artesanal para a indústria automobilística e da construção. O uso de fibras de sisal aumentou recentemente porque tem muitas vantagens ambientais e tecnológicas (CHANDRAMOHAN e MARIMUTHU, 2011; REIS, 2012).

A produção mundial de fibra de sisal é 281,553 toneladas, cultivada em 313.985 ha. O Brasil é o maior produtor e exportador, com 150,584 toneladas cultivadas em 176.739 ha, que está concentrada na região semiárida do Nordeste do país. A cultura do sisal tem uma cadeia de produção que emprega mais de 0,5 milhões de pessoas, a maioria pequenos agricultores que utilizam mão-de-obra familiar (FAO STAT, 2016).

O sisal é uma planta que apresenta poucos problemas fitossanitários relatados nas diferentes regiões do mundo. Ainda assim, no Brasil e Tanzânia a doença conhecida como podridão vermelha do sisal, causada pelo fungo *Aspergillus niger* Van Tieghem tem sido descrita causando sérios prejuízos à cultura (KIMARO et al., 1994; SANTOS et al., 2014).

A podridão vermelha do sisal (PVS) afeta plantas em todos os estágios fenológicos da cultura e induz a uma coloração avermelhada dos tecidos internos do caule, evoluindo para podridão, resultando na morte da planta. Externamente as folhas ficam amareladas e murchas (COUTINHO et al, 2006; GAMA et al, 2014). Desse modo as folhas da planta afetada pela PVS tornam-se impróprias para o desfibramento, diminuindo a produção e gerando prejuízos para os produtores (BARBOSA, 2015).

Devido à importância econômica e social da cultura do sisal, a busca de alternativas de controle da podridão vermelha faz-se necessário para o manejo e

expansão desta cultura. Sendo que até o momento não existe um método de controle eficaz para essa doença, além das patologias relacionadas a fungos veiculados pelo solo, a exemplo da PVS, serem de difícil controle (SÁ, 2009; 2013).

O controle biológico de patógenos de plantas constitui uma promissora estratégia para reduzir os impactos ambientais e os riscos à saúde humana causados pelo uso de agroquímicos. Estudos recentes demonstraram que a aplicação de agentes de controle biológico (ACB) pode ser uma alternativa para o controle da PVS (SILVA, 2012; MAGALHÃES, 2013).

Entretanto, a falta de consistência dos resultados em campo é uma das principais limitações para o uso generalizado de controle biológico (GLARE et al., 2012). Assim, algumas alternativas para aumentar a sua eficiência têm sido estudadas, tais como a aplicação conjunta com fungicidas compatíveis e a combinação de diferentes ACBs (ELAD et al., 1993).

O biocontrole com a mistura de agentes pode aumentar o espectro de ação contra o patógeno alvo, devido ao envolvimento de vários mecanismos, tais como indução de resistência, competição e produção de antibióticos (THILAGAVATHI et al., 2007; MEYER e ROBERTS 2002; SUNDARAMOORTHY et al., 2012).

O presente estudo, portanto, teve como objetivo avaliar isolados bacterianos e *Penicillium citrinum* previamente selecionados, aplicados de forma combinada ou individual sobre o *Aspergillus niger* e no controle da podridão vermelha do sisal.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Agave sisalana* Perrine ex Engelm

Botanicamente, a planta de sisal se caracteriza como uma monocotiledônea, da família Agavaceae, subfamília Agavoidea, gênero *Agave*, subgênero *Euagave*, espécie *Agave sisalana* (MEDINA, 1954). Várias espécies desse gênero se destacam, dentre elas *Agave sisalana* (sisal comum) e *Agave fourcroydes* (henequém), que são mais conhecidas pela importância comercial na produção de fibras no mundo. No entanto, apenas *A. sisalana* é cultivada no Brasil (MOREIRA et al., 1999).

O sisal comum (*A. sisalana*) é a variedade comercial de maior predominância no Brasil, mas o sisal híbrido 11648 resultante do cruzamento de *A. angustifolia* x *A. amaniensis* também é cultivado (SUINAGA et al., 2006). O híbrido 11648 oferece maior produção de fibras (SILVA et al., 2008), porém as fibras não apresentam superioridade tecnológica quando comparada ao sisal comum (AZZINI et al., 1989).

O sisal possui sistema radicular fasciculado, fibroso e em forma de tufo. A planta é acaulescente, ou seja, tem apenas um tronco ou eixo principal sobre o qual estão inseridos as folhas e o broto terminal. Suas folhas são lanceoladas e sem pecíolo (séssil) (MOREIRA, et al., 1999).

As flores são hermafroditas e a polinização é, em geral, realizada por insetos (MOREIRA et al., 1999). Os frutos são cápsulas de coloração verdes e carnosas nos estágios iniciais de formação, tornando-se castanho quando maduro e coloração preta e fibroso quando seco (GONDIM e SOUZA, 1999).

A planta do sisal floresce e frutifica somente uma vez (monocárpica), próximo ao final do ciclo vegetativo, emitindo uma inflorescência denominada de escapo floral

ou, popularmente, “flecha” ou “pendão floral”. Nesta floração, são produzidos flores, frutos e sementes, ou apenas os bulbilhos, enquanto vai ocorrendo a morte do sisal (MOREIRA et al., 1999; SILVA et al., 2008).

O sisal se propaga assexuadamente através de rebentões e bulbilhos. Os rebentões (filhotes) são mudas que nascem ao lado da planta-mãe e se ligam a ela através de rizomas. Os bulbilhos são pequenas plantas que se desenvolvem nos pendões florais, após a queda das flores (ABREU, 2010).

Esta Agavaceae apresenta metabolismo CAM (Metabolismo Ácido das Crassuláceas) tem os estômatos em criptas que aumentam a resistência ao fluxo de vapor de água no processo de transpiração, além de possuir epiderme fortemente cutinizada (BELTRÃO e AMORIM NETO, 1999). A planta de sisal utiliza em média apenas 50 a 100g de água/grama de fitomassa produzida, plantas com outras rotas de metabolismo fotossintético utilizam em média de 300 a 1000g (TAIZ e ZEIGER, 2004).

O pleno desenvolvimento do sisal ocorre em regiões com clima quente, com grande intensidade de luz e precipitações pluviais anuais entre 600 a 1500mm (BELTRÃO e AMORIM NETO, 1999). Dependendo das condições edafoclimáticas, o início da fase de produção ocorre após 36 meses de cultivo da planta, ou quando as folhas atingem cerca de 140 cm de comprimento, podendo resultar em fibras de 90 e 120 cm. As folhas são geralmente coletadas em intervalos de 6 a 8 meses durante toda a vida útil da planta (8 a 10 anos) (BASU et al., 2012). Após esse período, ocorre o surgimento do escapo floral (“flecha”) e a planta completa seu ciclo e morre (SILVA e BELTRÃO, 1999).

Normalmente, o sisal comum (*A. sisalana*) possui uma produção média de 180 a 250 folhas/ciclo por planta e cada folha contém cerca de 1000 a 1200 feixes de fibra (MURHERJEE e SATYNARAYANA, 1994). O sisal híbrido 11648 apresenta uma produção média superior de 600 folhas/ciclo por planta (SILVA e BELTRÃO, 1999).

2.2 Importância econômica do sisal

Do sisal, utiliza-se principalmente a fibra das folhas com elevados teores de celulose e lignina. Entre as fibras de origem vegetal, a do sisal é certamente a mais

importante, e representa, aproximadamente, 70% da produção mundial anual de fibras desse tipo (MARTIN et al., 2009).

Quando beneficiada, as fibras são destinadas à indústria de cordoaria (cordas, cordéis, fios, tapetes) (BASU et al., 2012), também usada na confecção de artesanatos (ALVES et al., 2008) e como matéria-prima para a indústria de papel e celulose (GUTIÉRREZ et al., 2008). Recentemente têm sido aplicadas na indústria automobilística, naval, moveleira e na construção civil, constituindo um mercado em expansão (LI et al., 2000; AGOPYAN et al., 2005; REIS, 2012).

Entre os maiores produtores mundiais da fibra de sisal, o Brasil se mantém como maior produtor com área cultivada de 252.849 ha e produção estimada em 181.443 t (IBGE, 2015), seguido da Tanzânia, Quênia, Madagascar e China (FAO STAT, 2016). O Brasil também é o maior exportador de fibras e manufaturados de sisal e exporta principalmente para os Estados Unidos, China e Portugal. As exportações brasileiras do complexo sisal em 2013 foram de 60,1 mil toneladas e totalizaram US\$ 81 milhões em divisas para o país (CONAB, 2014).

O estado da Bahia é, atualmente, o principal produtor brasileiro de sisal tendo em 2015, explorado mais de 184 mil ha e colhido 175.226 toneladas o que corresponde mais de 96% de toda a produção brasileira. Com menor destaque os estados da Paraíba (3,0 %), Ceará (0,4%) e Rio Grande do Norte (0,1%) que também são produtores de sisal (IBGE, 2015).

O cultivo de sisal se concentra em áreas de pequenos produtores, com predomínio da agricultura familiar (CONAB, 2014). Desse modo, a cultura do sisal assume grande importância socioeconômica contribuindo para a geração de empregos e renda, além da fixação do homem no campo (MARTIN et al., 2009). Estima-se que a atividade do sisal no Nordeste, cultivado em cerca de 112 municípios envolva cerca de 800 mil pessoas (LESSA, 2007).

A produtividade do sisal varia muito no Brasil, mas em 2010, após alguns investimentos, chegou a 1.200 kg ha⁻¹, porém é considerada baixa quando comparada a outros países produtores (SEAGRI, 2011). Por exemplo, os países africanos apresentam rendimento médio de 2.000 kg ha⁻¹ (VERDE, 2007).

Vários fatores têm contribuído para a baixa produtividade da agaveicultura brasileira dentre os quais: períodos longos de estiagem; baixo valor pago pela fibra; práticas inadequadas de plantio e tratamentos culturais incorretos; falta de máquinas modernas para colheita e desfibramento; e nos últimos anos, a podridão vermelha do

sisal, tem ameaçado ainda mais a sustentabilidade dessa cultura (COUTINHO et al., 2006; SANTOS et al., 2014).

2.3 Podridão vermelha do sisal

O sisal é uma planta bastante rústica e apresenta poucos problemas fitossanitários relatados nas diferentes regiões do mundo. Ainda assim algumas pragas e doenças têm sido descritas causando sérios prejuízos à cultura.

Dentre as doenças que afetam o sisal, apenas duas foram relatadas até o momento no Brasil: a antracnose causada pelo fungo *Colletotrichum agaves* Cav. (MEDINA, 1954) que não se constitui em problema de importância econômica e a podridão vermelha do sisal que tem afetado a produção sisaleira sendo este o principal problema fitossanitário dessa cultura (COUTINHO et al., 2006; LIMA et al., 1998; SANTOS et al., 2014).

A podridão vermelha do sisal é disseminada em 100% dos plantios na Bahia e a incidência varia entre as regiões de cultivo, sendo que em algumas não ultrapasse 5% da área enquanto em outras pode alcançar 65% (ABREU et al., 2007). O cenário é ainda mais preocupante em virtude da sua capacidade de destruição, pois as folhas tornam-se impróprias ao desfibramento e as plantas morrem, inviabilizando a atividade para o agricultor (COUTINHO et al., 2006).

Embora exista controvérsia com relação a identidade do agente etiológico, dois fungos já foram relatados causando a podridão vermelha do sisal no Brasil: *Botryodiplodia theobromae* (Pat) (sin: *Lasiodiplodia theobromae*) (LIMA et al., 1998) e *Aspergillus niger* Tiegh (COUTINHO et al., 2006). No entanto, nesses relatos, os fungos foram identificados com base em observações morfológicas e apenas a espécie *A. niger* teve a patogenicidade confirmada.

Assim sendo, o fungo *A. niger* é relatado como o principal agente causador da podridão vermelha tanto pela frequência de ocorrência quanto pela severidade da doença (COUTINHO et al., 2006). Além do *A. niger* outras espécies do gênero da seção *Nigri* como *Aspergillus brasiliensis* e *Aspergillus tubingensis* foram identificadas com base em análises morfológicas, testes de patogenicidade e análises filogenéticas mostrando-se capazes de desenvolverem os sintomas da podridão vermelha do sisal (SANTOS et al., 2014).

A podridão vermelha é caracterizada por apresentar coloração avermelhada que se estende desde o caule até a base da folha, amarelecimento e murcha das folhas, aliado ao apodrecimento do tronco, o qual começa a se desprender facilmente do chão levando a planta à morte (COUTINHO et al., 2006).

Estudos realizados em mudas de sisal confirmam que é necessário a presença de lesão no caule para a penetração e infecção do *A. niger* nos tecidos das plantas. Porém, a infecção do patógeno não ocorre em raízes, mesmo quando lesionadas. Ferimentos ocasionados devido ao corte das folhas para o desfibramento e aqueles causados por instrumentos utilizados para a realização de tratamentos culturais, dão origem a suposição de que esse seja um dos mecanismos de penetração e disseminação do patógeno (BATISTA et al., 2010).

Atualmente não existem produtos químicos registrados e cultivares conhecidas resistentes a podridão vermelha. As principais medidas de manejo da doença se baseiam no controle cultural. Assim são preconizados o arranquio e queima de plantas com sintomas da doença; desinfestação de ferramentas de trabalhos; uso rebentos provenientes de campos saudáveis para implantação de novas áreas; uso de bulbilhos no caso de não existência de materiais confiáveis; e utilização do resíduo do desfibramento oriundos de plantas saudáveis como adubação orgânica para evitar estresses nutricionais à planta e manter por maior tempo a umidade do solo (SUINAGA et al., 2006; SILVA et al., 2008).

2.4 Controle biológico da podridão vermelha

O controle biológico de microrganismos consiste na “redução da soma de inóculo ou das atividades determinantes da doença provocada por um patógeno, realizada por um ou mais organismos que não seja o homem” (COOK e BAKER, 1983; COOK, 1993).

Este método de controle consiste na introdução/aplicação artificial de microrganismos antagônicos que podem ser alóctones ou autóctones que, conseqüentemente, ativam seus mecanismos de ação, como exemplos, antibiose, competição, parasitismo, predação, hipovirulência e indução de defesas do hospedeiro (BETTIOL, 1991; MELLO, 1998).

Para a podridão vermelha do sisal, o controle biológico pode ser uma vantagem competitiva por se tratar de cultura ecológica, livre de resíduos químicos e conhecido como sisal orgânico (LEAL et al., 1997).

O primeiro trabalho com agentes de controle biológico contra a podridão vermelha do sisal foi realizado por Sá (2009), identificando isolados de *Trichoderma* com potencial para controle de *Aspergillus niger*. Desde então diversos trabalhos têm sido realizados utilizando esse método de controle, e alguns agentes têm se mostrado promissores para o biocontrole dessa doença (SILVA, 2012; DAMASCENO, 2012; MAGALHÃES, 2013; SÁ, 2009; 2013).

Magalhães (2013) mostrou que bactérias do gênero *Bacillus* possuem potencial para o biocontrole da podridão vermelha do sisal. Neste estudo o gene *bamC* foi detectado nos isolados de *Bacillus* sp. (BMH e INV) sugerindo que os mesmos podem produzir o antibiótico Bacilomicina, provavelmente o principal mecanismo de ação envolvido na antibiose a *A. niger*.

Em estudos realizados por Damasceno (2012) foi verificado que o tratamento das mudas de sisal com *Penicillium citrinum* em intervalos de 48 e 72 horas antes da aplicação do patógeno promoveu uma significativa diminuição de 100% da severidade da doença em condições experimentais.

Em alguns casos o controle biológico de doenças tem apresentado resultados inconsistentes em condições de campo, possivelmente devido as influências de fatores bióticos e abióticos que podem impor limitações à eficiência dos ACB (ZORZETTI et al., 2014). Diversos autores têm documentado que a inoculação de um único agente para o controle de doenças parece não apresentar resultados satisfatórios em todas as condições do ambiente (MEYER e ROBERTS, 2002; THILAGAVATHI et al., 2007).

Como vários fatores afetam o desempenho dos ACBs, o uso combinado de diferentes microrganismos pode torná-los mais eficientes, permitindo melhores resultados em campo (MEYER e ROBERTS 2002). O biocontrole com misturas de agentes pode ampliar o espectro de ação devido ao envolvimento de múltiplos modos de ação contra o patógeno alvo, tais como produção de antibióticos, indução de resistência e competição por espaço e nutrientes (MEYER e ROBERTS 2002; SUNDARAMOORTHY et al., 2012). As misturas incluem bactérias e fungos filamentosos e leveduriformes (LEIBINGER et al., 1997; JANISIEWICZ e BORS, 1995) bactérias e bactérias (SUNDARAMOORTHY et al., 2012).

Nos últimos anos, o interesse pela aplicação de combinações de ACB contra patógenos de planta tem aumentado expressivamente em busca dos efeitos aditivos ou sinérgicos, no entanto as interações podem também ser antagônicas (XU et al., 2011). Para produzir um efeito sinérgico, o efeito combinado dos agentes deve ser maior do que os efeitos individuais, matematicamente quando o efeito da mistura dos agentes é igual à soma dos efeitos individuais. Em uma interação sinérgica, dos ACBs observa-se efeito superior à soma (MENDOZA e SIKORA, 2009; XU et al., 2011). O efeito antagônico é considerado uma interação negativa, na qual o efeito combinado é menor que os efeitos individuais (GUETSKY et al., 2002).

Neste contexto, Barbosa (2015) testou diversas combinações de isolados bacterianos que são antagônicos ao *A. niger* nas condições edafoclimáticas da região sisaleira da Bahia. Os resultados mostraram que as combinações reduziram significativamente a severidade dos sintomas da podridão vermelha em mudas de sisal, porém nenhuma das combinações avaliadas resultou numa interação sinérgica.

Atualmente, buscam-se alternativas, como a mistura de ACBs e outras estratégias para o aumento da eficiência de controle da podridão vermelha do sisal. Além disso, outros estudos complementares devem ser realizados para avaliar a forma e o período de aplicação dos agentes; o preparo de formulações eficientes para armazenamento e manuseio; potencial de uso curativo dos ACBs; estratégia para sua utilização no manejo integrado da podridão vermelha do sisal em campo.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Avaliar isolados bacterianos previamente selecionados e *Penicillium citrinum* aplicados de forma combinada ou individual sobre o *Aspergillus niger* e no controle da podridão vermelha do sisal.

3.2 Objetivos específicos

- Identificar a compatibilidade entre isolados bacterianos e *P. citrinum* para o controle da podridão vermelha do sisal;
- Elaborar misturas de isolados bacterianos compatíveis com *P. citrinum* para a inibição da germinação de esporos e crescimento micelial de *A. niger*;
- Verificar a eficiência de preparações contendo isolados individuais de bactérias e *P. citrinum* e suas misturas para o controle da podridão vermelha em mudas de sisal.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material vegetal

Mudas de sisal (*A. sisalana*) do tipo bulbilhos foram obtidos a partir de plantas saudáveis em campo no município de Campo Formoso, Bahia - Brasil. Os bulbilhos foram plantados em tubetes com 500 cm³ e mantidos em um viveiro por 90 dias. Após o período de crescimento, foram selecionadas plantas de sisal com 25 cm de altura e sem ferimentos visíveis.

4.2 Obtenção e cultivo de microrganismos

O fungo *Aspergillus niger* (isolado NA131) foi isolado a partir de plantas de sisal sintomáticas a partir de um campo de produção e foi depositado na coleção de microrganismos da Universidade Federal Recôncavo da Bahia (UFRB). O isolado NA131 foi cultivado a 28°C de 7 a 10 dias em BDA (Batata Dextrose Ágar, Himedia). Após o crescimento, os conídios foram coletados pela adição de 20 mL de solução de Triton X-100 (0,05%), seguida de raspagem das colônias com auxílio de alça de Drigalski, sendo obtida uma suspensão padronizada de 10⁷ conídios mL⁻¹.

Todos os antagonistas foram selecionados com base na sua eficiência no controle da podridão vermelha de sisal em estudos anteriores e pertencem a coleção de culturas da UFRB (Tabela 1). Os isolados *Brevibacterium* sp. 90 (B90), *Bacillus pumilus* 105 (Bp105), *Serratia rubidaea* 127, *Paenibacillus* sp. 512 foram isolados como endófitos de sisal. *Bacillus* sp. INV e *Bacillus* sp. BMH foram obtidos a partir de amostras de solo de campos de cultivo de sisal.

Os isolados bacterianos foram cultivados em 100 mL de caldo nutriente em frascos de 250 mL e incubados a 28 °C em agitador orbital a 120 rpm durante 24 h. As células bacterianas foram recolhidas por centrifugação a 12000 rpm durante 3 min, o sobrenadante foi removido, e as células foram lavadas duas vezes em NaCl a 0,85%. Finalmente, cada suspensão bacteriana foi padronizada para 10^9 UFC mL⁻¹, o que foi confirmado por contagem de colônias em ágar nutriente (dados não mostrados).

Penicillium citrinum foi isolado do caule de plantas de sisal em experimentos anteriores realizados por Damasceno (2012) (Tabela 1). Este isolado pertence a coleção de microrganismos do Laboratório de Microbiologia Agrícola da UFRB. O inóculo para a realização dos experimentos foi obtido através da adição de 20 mL de uma solução de Triton X-100 a 0,05% em placa de Petri contendo meio de cultura BDA e o fungo crescido por 10 dias a 28 °C. A suspensão foi ajustada para a concentração 10^7 conídios mL⁻¹.

Tabela 1: Identificação e origem dos antagonistas de *Aspergillus niger* utilizados nos experimentos.

Microrganismos	Código	Origem	Referência
<i>Brevibacterium</i> sp.	90	Sisal	SILVA (2012)
<i>Bacillus pumilus</i>	105	Sisal	SILVA (2012)
<i>Serratia rubidaea</i>	127	Sisal	SILVA (2012)
<i>Paenibacillus</i> sp.	512	Sisal	SILVA (2012)
<i>Bacillus</i> sp.	INV	Solo	MAGALHÃES (2013)
<i>Bacillus</i> sp.	BMH	Solo	MAGALHÃES (2013)
<i>Penicillium citrinum</i>	Pc	Sisal	DAMASCENO (2012)

4.3 Compatibilidade *in vitro* entre os microrganismos antagonistas

A compatibilidade dos antagonistas foi avaliada pela técnica de cultivo pareado. Os microrganismos foram co-inoculados em meio de BDA e meio BF descrito por Mishra et al. (2013) (100g de batata, 2,5g de NaCl, 2,5g peptone, 0,75 g extrato de levedura, 0,75g extrato de carne, 20g de ágar bacteriológico, e 1 litro de água destilada). Os conídios de *P. citrinum* foram raspados de colônias de 10 dias de idade

com alça de platina e depositados em microtubos contendo solução ágar-água (1%) e homogeneizado em vortex. Em seguida, uma alíquota de 6 μL dessa suspensão foi adicionada no centro das placas contendo meio BDA ou meio BF. Após 48 horas, uma alíquota de 6 μL de cada suspensão bacteriana foi colocada em discos de papel filtro esterilizado (5 mm de diâmetro) numa distância de 40 mm da colônia de *P. citrinum*. O tratamento controle continha apenas o *P. citrinum* nos meios de cultura. Em seguida, as placas foram incubadas a 28°C e diariamente examinados o crescimento micelial e halos de inibição. Neste ensaio, a compatibilidade foi definida como a ausência de halos de inibição. O experimentado foi repetido duas vezes, utilizando quatro repetições para cada tratamento, onde cada repetição foi representada por uma placa de Petri.

4.4 Efeitos dos agentes de biocontrole e suas combinações na germinação de conídios de *A. niger*

Para este experimento foram utilizadas as bactérias antagonistas compatíveis com *P. citrinum* selecionadas no experimento anterior. Cem microlitros de suspensões de *Brevibacterium* sp. (90), *B. pumillus* (105) (10^9 UFC mL^{-1}) e *P. citrinum* (10^6 conídios mL^{-1}) foram transferidas para poços de placas de Elisa. Para os tratamentos resultantes das combinações foram adicionados 100 μL de uma preparação contendo partes iguais das suspensões de cada antagonista. Em todos os poços, foram adicionados 100 μL da suspensão de conídios *A. niger* (10^6 conídios mL^{-1}) e 50 μL de meio BD (Batata Dextrose).

O tratamento controle continha apenas a suspensão de conídios do patógeno (100 μL) e o meio BD (50 μL). As placas foram fechadas e incubadas a 28°C por 16 horas. Quando o tratamento controle apresentou 70% de germinação, foi aplicada uma gota de lactofenol para paralisar a germinação, e as amostras foram mantidas sob refrigeração (4°C). A germinação de conídios foi avaliada por uma contagem aleatória de 100 esporos para cada repetição usando um microscópio óptico (400X). Só foram considerados como conídios germinados, os conídios com tubos germinativos maior ou igual ao seu diâmetro. O experimentado foi repetido duas vezes, utilizando quatro repetições de cada tratamento na mesma placa. Cada repetição foi representada por um poço da placa de Elisa.

4.5 Inibição do crescimento micelial de *A. niger*

Os antagonistas foram testados isoladamente e em combinações contra o crescimento micelial de *A. niger* (isolado NA131) pela técnica de cultivo pareado. A partir de colônias com 10 dias de idade, crescidas em meio BDA, foi feita uma suspensão de esporos de *A. niger* em solução de ágar-água (1%), em seguida uma alíquota de 6 μL dessa suspensão foi adicionada no centro de cada placa contendo meio de BDA. Após 24 horas, foram adicionadas as placas 6 μL da suspensão de cada antagonista *Brevibacterium* sp. (90), *B. pumillus* (105) e *P. citrinum* e suas misturas em discos de papel filtro esterilizado (5mm). Esses discos foram colocados a uma distância de 40 mm do patógeno. Foi utilizado um tratamento controle contendo apenas *A. niger* NA131. Após as inoculações, as placas foram incubadas em ambiente com temperatura controlada 28°C e o crescimento de *A. niger* foi registrado a cada 48 h por 18 dias. O delineamento foi inteiramente casualizado com 5 repetições para cada tratamento, onde cada repetição foi representada por uma placa de Petri.

4.6 Ensaio em casa de vegetação

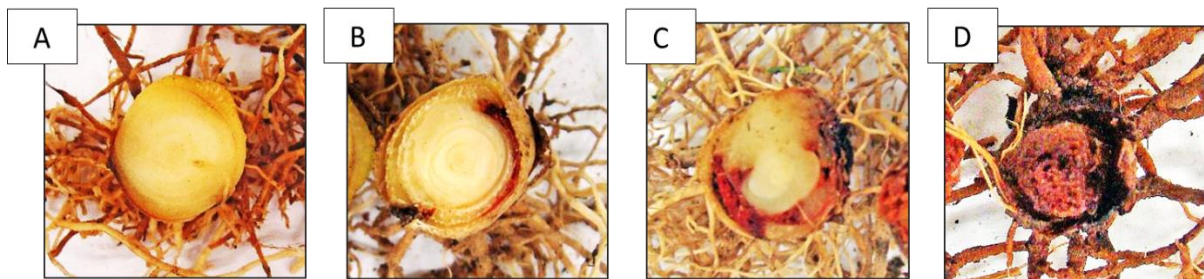
Após realizados os testes *in vitro* foram instalados experimentos em casa de vegetação para avaliar o potencial das combinações no controle do *A. niger* (isolado NA131). Os tratamentos foram: (1): *Brevibacterium* sp. 90 (B90); (2): *B. pumillus* 105 (Bp105); (3): *P. citrinum* (Pc); (4): B90 + Pc; (5): Bp105 + Pc; (6): *A. niger*; (7): água destilada. As combinações foram obtidas por mistura de quantidades iguais (v/v) de suspensões bacterianas contendo 10^9 UFC mL^{-1} e *P. citrinum* 10^7 conídios mL^{-1} .

Plantas de sisal foram selecionadas com tamanho uniforme (25 cm), cultivadas como descrito anteriormente. Dois ferimentos equidistantes de 1 mm de diâmetro foram feitos na base do caule de cada planta, utilizando uma agulha de seringa. Duzentos microlitros de suspensões dos ACBs individuais e as suas misturas foram inoculados com pipeta nas perfurações. A inoculação de *A. niger* foi feita após 24 horas, utilizando 200 μL de uma suspensão contendo 10^7 conídios mL^{-1} .

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado com 25 repetições para cada tratamento. Após 30 dias as plantas foram colhidas e cortadas transversalmente

(0,5 cm acima do ponto da inoculação), avaliando-se a incidência da doença pela porcentagem de plantas com sintomas da doença em relação ao total de plantas avaliadas e a severidade dos sintomas no caule determinada por meio da escala de notas de 0 a 3, conforme proposta por Sá (2009) (Figura 1).

Figura 1: Escala de notas adotada para avaliar a severidade da podridão vermelha do sisal em mudas inoculadas (SÁ, 2009). (A) nota 0 – Sem sintomas, apenas lesões mecânicas causadas pela perfuração da agulha; (B) nota 1 – Sintoma inicial, lesão maior do que a causada pela agulha, podridão na base da folha mais externa; (C) nota 2 – Sintoma avançado, podridão no interior da planta, planta ainda viva; (D) nota 3 – Planta morta, caule totalmente destruído.



4.7 Tratamento de dados e análise estatística

Os dados de severidade foram transformados para índice de severidade da doença (ID) conforme McKinney (1923), utilizando a equação: $ID = \sum \frac{(G \times F)}{(N \times 3)} \times 100$; na qual ID – índice de doença; G – grau atribuído a severidade (nota); F- frequência; N – número de plantas avaliadas; 3 – nota máxima.

Os dados coletados foram submetidos à avaliação da normalidade da distribuição pelo teste de Lilliefors e de homogeneidade de variância pelo teste Levene (HILL e LEWICKI, 2006). Para a análise de variância, os dados obtidos em porcentagem foram transformados usando a fórmula: $X'_{ij} = \arcseno\left(\frac{X_{ij}}{100}\right)$ no entanto, os resultados apresentados foram apresentados como valores não transformados. As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). A análise estatística foi realizada utilizando o software Statistica for Windows v. 7.0 (Statsoft Inc.).

A eficiência de controle foi calculada usando a equação: Eficiência = $(T-t) \times 100/T$, sendo: T- incidência no controle; t- incidência no tratamento. Utilizou-se ainda,

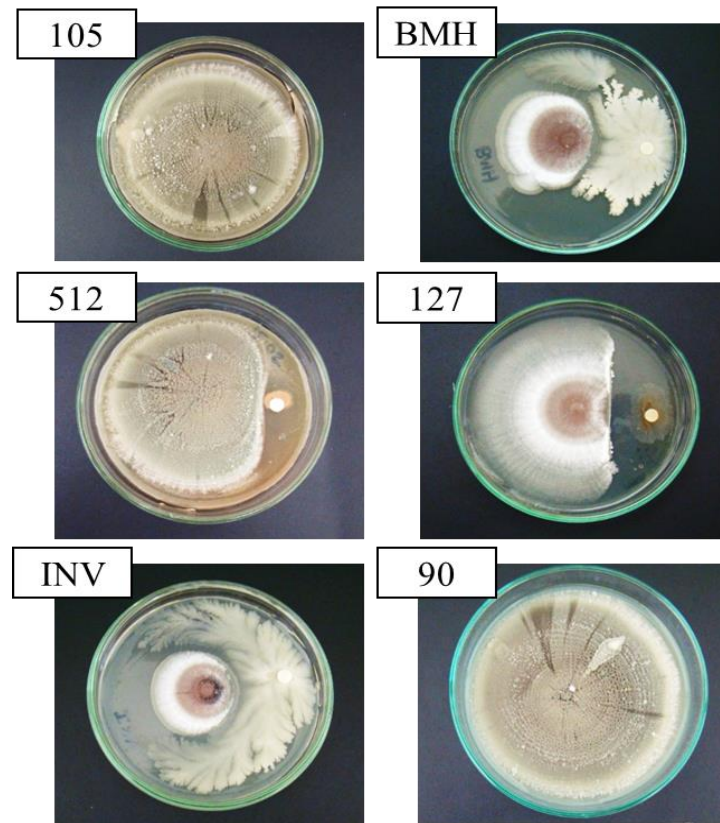
as fórmulas de Abbott para determinar o efeito das interações dos agentes de biocontrole nas combinações testadas: $E(exp) = \frac{(X + Y) - (X \cdot Y)}{100}$ e $FS = E(obs)/E(exp)$. Na qual, X e Y indicam a eficiência de controle de cada agente de biocontrole quando aplicado sozinho. E(exp)= eficiência de controle esperada pela combinação; E(obs)= eficiência de controle observada pela combinação e FS= fator de sinergismo alcançado pela combinação. Assim: FS >1 significa ocorrência de sinergismo; FS<1 representa interação antagônica; FS=1 indicativo de interação aditiva entre os agentes de controle biológico (LEVY et al., 1986).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Várias misturas de agentes microbianos têm sido empregadas com sucesso contra vários patógenos de plantas em estudos anteriores. As misturas incluem, por exemplo bactérias e fungos (LEIBINGER et al., 1997; JANISIEWICZ e BORS, 1995) e bactérias (SUNDARAMOORTHY et al., 2012). Neste contexto, misturas de ACBs foram testadas contra *A. niger* agente causador da podridão vermelha do sisal. Diversos autores sugerem que as combinações de ACBs devem ser compatíveis para obter resultados mais consistentes de controle biológico (RAAIJMAKERS et al., 1995).

No presente estudo, seis isolados bacterianos foram selecionados para testar a sua compatibilidade *in vitro* com *P. citrinum* em meio de cultura BDA e meio BF (Figura 2). Verificou-se uma interação significativa ($p < 0,05$) entre os isolados bacterianos e os meios de cultura sobre a inibição do crescimento micelial de *P. citrinum* (Tabela 2).

Figura 2: Teste de compatibilidade entre isolados bacterianos e *Penicillium citrinum* em meios de cultura BDA (Batata Dextrose Ágar) e BF (Mishra et al., 2013).



Brevibacterium sp. 90 (B90) e *Bacillus pumilus* 105 (Bp105) não reduziram o crescimento micelial de *P. citrinum*, não sendo observados halos de inibição. Ambos os isolados bacterianos e *P. citrinum* cresceram juntos, tanto no meio BDA quanto em meio BF e isso indicou que esses isolados eram compatíveis. Conforme estes resultados os isolados B90 e Bp105 não produziram qualquer elemento antibiótico sobre o crescimento de *P. citrinum*.

Entretanto, reações de incompatibilidade foram observadas pelos isolados *Paenibacillus* sp. (512), *S. rubidae* (127) e *Bacillus* sp. (BMH) com *P. citrinum* que causaram uma expressiva redução do crescimento micelial do fungo em BDA. No meio BF, a maioria dos isolados reduziram significativamente e de forma mais intensa do que no meio BDA, incluindo *Bacillus* sp. (INV), que não afetou significativamente o crescimento micelial de *P. citrinum* em meio BDA.

Autores têm demonstrado que a incompatibilidade entre agentes microbianos 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 (BABOSA, 2015; MEYER e ROBERTS, 2002).

De modo geral, a taxa de inibição do crescimento micelial foi mais intensa em meio BF, provavelmente devido à disponibilidade de um teor mais elevado e variado de nutrientes. Os meios de cultura são mais ricos em açúcares e aminoácidos que grandes quantidades de solo, rizosfera de plantas e do espaço intercelular dos tecidos vegetais. Assim, ensaios *in vitro* são apenas um indicativo da produção de compostos antibióticos.

Tabela 2: Crescimento micelial de *Penicillium citrinum* no ensaio de cultivo pareado com bactérias antagonistas ao *Aspergillus niger* NA131 em meios de cultura BDA (Batata Dextrose Ágar) e BF (Mishra et al., 2013).

Tratamentos	BDA (mm)	BF (mm)
<i>P. citrinum</i>	90,00aA	90,00aA
<i>B. pumilus</i> 105	90,00aA	90,00aA
<i>Bacillus</i> sp. BMH	71,00bA	36,25cB
<i>Bacillus</i> sp. INV	86,25aA	39,00bB
<i>Brevibacterium</i> sp. 90	86,25aA	87,50aA
<i>Paenibacillus</i> sp. 512	69,25bA	56,00bB
<i>Serratia rubideae</i> 127	73,50bA	57,75bB

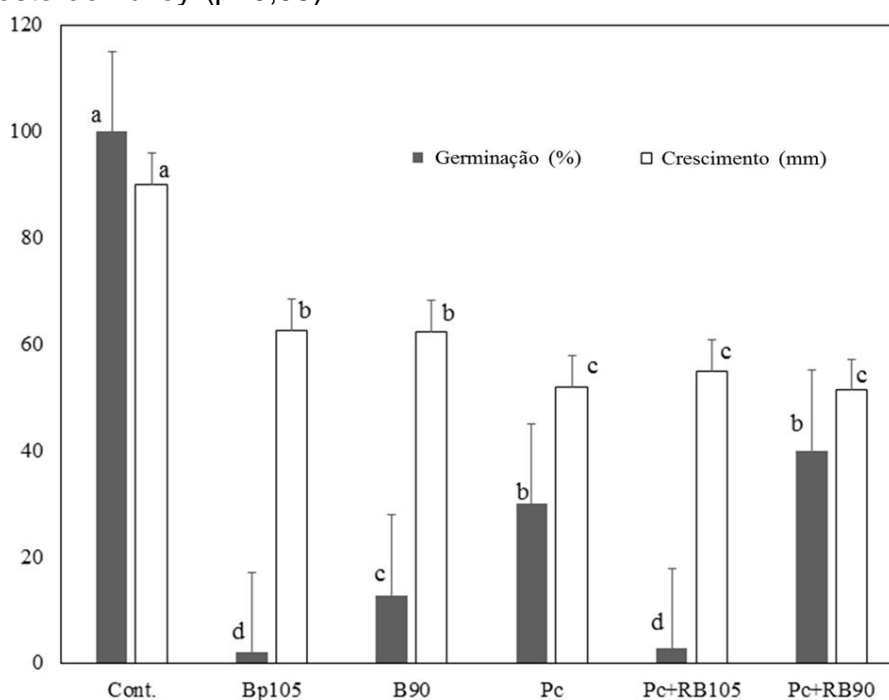
*Números seguidos de letras minúsculas na coluna e por letras maiúsculas na linha não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Em geral, todos os tratamentos resultaram em redução significativa da germinação de esporos de NA131 (Figura 3). A aplicação individual de *P. citrinum* (*Pc*) resultou numa inibição de 70%, enquanto *B. pumilus* 105 (*Bp*105) e *Brevibacterium* sp. 90 (*B*90) inibiu 98 e 87,2% de germinação de NA131, respectivamente. No entanto, *P. citrinum* misturado com os isolados bacterianos não aumentou a inibição dos conídios. Quando *Pc* foi misturado com *Bp*105, os resultados foram semelhantes para as bactérias aplicadas de forma individual; e na combinação *Pc* + *B*90, a germinação de NA131 foi semelhante ao *Pc* aplicado sozinho.

Resultados semelhantes foram obtidos no ensaio de placa com cultivo pareado de *P. citrinum* e os isolados bacterianos no crescimento micelial de NA131 (Figura 3).

A inoculação dos ACBs de forma individual inibiu o crescimento da colônia de NA131 em 30,4, 30,7 e 42,2% para Bp105, B90, e *Pc*, respectivamente. As misturas de *Pc* e isolados bacterianos não aumentaram significativamente a inibição do crescimento micelial quando comparado ao *Pc* sozinho.

Figura 3: Efeito da aplicação de preparações contendo isolados individuais e suas misturas na inibição da germinação de conídios e crescimento micelial de *Aspergillus niger* NA131. Cont: Controle contendo apenas *A. niger*; Bp105- *B. pumilus*; B90- *Brevibacterium* sp.; *Pc*- *P. citrinum*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).



Bacillus spp. são conhecidos pela produção metabólitos com atividade antifúngica, entre eles lipopeptídeos que alteram a permeabilidade de membranas de esporos fúngicos (LIU et al., 2014). Bacillomycin D, por exemplo, provocou desestruturação da membrana celular causando extravasamento de conteúdo celular de micélio e esporos de *Aspergillus flavus* (GONG et al., 2014). De forma similar, *Penicillium* spp. são produtores de ácidos graxos e peptídeos com atividade antimicrobiana do grupo dos benzoyl aminoácidos (YANG et al., 2015). Bactérias do gênero *Brevibacterium*, por sua vez, são conhecidas pela produção de ácido láctico e de polipeptídeos antifúngicos (GUPTA e VAKHLU, 2015).

Assim, a aplicação conjunta de microrganismos antagonistas, com esse conjunto de ferramentas bioquímicas ampliaria a inibição da germinação de esporos

e crescimento micelial de fungos fitopatogênicos (SUNDARAMOORTHY et al., 2012; THILAGAVATHI et al., 2007). No entanto, neste estudo a combinação dos isolados *in vitro* não resultou no incremento significativo da eficiência.

Nos estudos em casa de vegetação, verificou-se que a incidência da podridão vermelha nos tratamentos contendo B90 e *Pc* e da sua combinação reduziram significativamente a incidência da podridão vermelha do sisal (68, 64 e 68%, respectivamente) (Tabela 3). *B. pumillus* 105 não apresentou efeito significativo sobre a incidência, contudo no tratamento em combinação com *Pc* a incidência foi significativamente menor que o controle. Por outro lado, todos os tratamentos promoveram redução significativa da severidade da doença, em relação ao controle com apenas o patógeno (Tabela 3).

Tabela 3: Incidência e severidade da podridão vermelha em mudas de sisal (*Agave sisalana*) após tratamento com agentes de biocontrole e suas misturas. E(exp) (Eficiência de controle esperada pela mistura) FS (Fator de sinergismo alcançado pela mistura).

Tratamentos	Incidência	Severidade	Eficiência de controle	E(exp) (Abbott)	FS (Abbott)
<i>A. niger</i>	100,00a	100,00a	0,00	-	
<i>B. pumilus</i> 105	80,00a	36,00b	20,00	-	
<i>Brevibacterium</i> sp. 90	32,00b	10,67c	68,00	-	
<i>P. citrinum</i>	36,00b	12,00c	64,00	-	
<i>Pc</i> + 105	44,00b	22,67bc	56,00	71,20	0,79
<i>Pc</i> + 90	32,00b	13,33c	68,00	88,48	0,77

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Resultados similares aos obtidos neste estudo foram observados por Sundaramoorthy et al. (2012) que, ao aplicarem algumas misturas de *Pseudomonas* spp. e *Bacillus* spp., não obtiveram aumento da eficiência de controle da murcha em pimenteira (*Capsicum annum* L.) causado por *F. solani*. Por outro lado, existem relatos de que misturas de antagonistas demonstraram aumento do desempenho em relação a aplicações de ACBs isolados (MEYER e ROBERTS 2002).

Existem diversas abordagens para a detecção de efeitos aditivos ou sinérgicos resultantes da combinação de diferentes agentes de controle, no entanto em todas o efeito combinado dos ACBs deve ser maior do que os seus efeitos individuais

(MENDOZA e SIKORA 2009). Neste trabalho, apesar da redução na incidência e severidade dos sintomas da podridão vermelha pelas combinações dos ACBs em casa de vegetação, os valores do fator de sinergismo (FS) foram inferiores ao requerido para sugerir efeito aditivo ou sinérgico para o (FS<1). De fato, os resultados estimados para as misturas dos ACBs pelas fórmulas Abbott foram menores do que 1 (SF <1), indicando um efeito antagonista entre ACBs (Tabela 3).

A principal vantagem da utilização de preparações contendo combinações de ACBs é o aumento na adaptação a diferentes hospedeiros, climas e solos, e, possivelmente, contra uma ampla gama de agentes patogênicos (FRAVEL, 2005). Sob restritiva condições ambientais ou pressões biológicas para uma das estirpes ACBs, a estirpe mais tolerante da preparação poderia assumir o controle.

Combinações de ACBs com diferentes mecanismos de controle biológico pode também fornecer uma expressão mais consistente de efeitos benéficos. Mesmo para microrganismos incompatíveis *in vitro*, há uma possibilidade de que eles poderiam ter sucesso no ambiente, por colonizar diferentes nichos na planta ou habitat, e aumentando a sua eficiência no controle. A combinação de *Trichoderma atroviride*, por exemplo, um agressivo colonizador do solo, com estirpes de *Pseudomonas* spp. obtidas da rizosfera resultou num aumento significativo do controle do apodrecimento da raiz de abacate (RUANO-ROSA et al., 2014).

Portanto, com base nestas considerações, seria necessário a realização de experimentos em campo em diferentes épocas e local para afirmar com maior precisão a eficiência das combinações de *P. citrinum* e as bactérias *B. pumilus* 105 e *Brevibacterium* sp. 90.

6 CONCLUSÕES

Bacillus pumilus 105 e *Brevibacterium* sp. 90 foram compatíveis com *Penicillium citrinum*.

B. pumilus 105 e *Brevibacterium* sp. 90 e *P. citrinum*, utilizados de forma combinada ou individual, inibiram a germinação de esporos e crescimento micelial de *Aspergillus niger*.

Os isolados *Brevibacterium* sp. e *P. citrinum* reduziram a incidência da doença; entretanto todos os isolados reduziram a severidade da podridão vermelha do sisal;

Não houve sinergia da mistura dos isolados compatíveis no controle da podridão vermelha do sisal em casa de vegetação.

REFERÊNCIAS

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

AGOPYAN, V., SAVASTANO J. R. H., JOHN, V. M., CINCOTTO, M.A. Developments on vegetable fibre-cement based materials in Sao Paulo, Brazil: an overview. **Cement Concrete Comp.** v. 27, p. 527–536, 2005.

ALVES, S.B.; LOPES, R.B. **Controle microbiano de pragas na América Latina: avanços e desafios**. Piracicaba: FEALQ, 2008. 414 p.

AZZINI, A.; CIARAMELLO, D.; SALGADO, A. L. B. de.; ZULLO, M. A. T. Caracterização tecnológica de híbridos de sisal. **Bragantina**, Campinas, v. 48, n.1, p. 113-124, 1989.

BAKER, R. **An overview of current and future strategies and models for biological control**. In: **Biological Control of Soil-borne Plant Pathogens**. Homby, D. ed. CAB International, London, pp 375-388, 1990.

BARBOSA, L. O., 2015. **Podridão vermelha do sisal: progresso da doença em diferentes temperaturas e controle biológico utilizando misturas de bactérias**. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias). Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Cruz das Almas - BA , Brasil, 2015.

BASU, G.; ROY A. N.; SATAPATHY, K. K.; ABBAS, SkMdJ.; MISHRA, L. CHAKRABORTY, R. Potentiality for value-added technical use of Indian sisal. **Ind Crops Prod.** v. 36, p. 33–40, 2012. doi:10.1016/j.indcrop.2011.08.001

BATISTA, D. da C; SILVA, F. M; SOUZA, W. C. O. de; BARBOSA, M. A. G; COSTA, V. S. de O; BRANDÃO, W. N; TERAQ, D. Manejo da Podridão Vermelha do Tronco do Sisal. **Circular Técnica 92**. Petrolina, Dezembro de 2010.

BELTRÃO, N. E. M.; AMORIM NETO, M. S. Ecofisiologia do sisal. In: SILVA, O.R.R.F. da; BELTRÃO, N.E. de M. (Org.). **O agronegócio do sisal no Brasil**. Brasília, D. F.: Embrapa – SPI; Campina Grande: Embrapa, p. 35-40, 1999.

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

CHANDRAMOHAN, D., MARIMUTHU, K. A review on natural fibers. **IJRRAS**, v.8, p. 194-206, 2011.

CONAB, 2014. **Companhia Nacional de Abastecimento**. Sisal – Conjuntura mensal: Janeiro 2014. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_02_12_11_46_10_sisaljaneiro2014.pdf. Acesso jun 2015.

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

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

COUTINHO, W. M.; SUASSUNA, N. D.; LUZ, C. M.; SUINAGA, F. A.; SILVA, O. R. R. F. Bole rot of sisal caused by *Aspergillus niger* in Brazil. **Fitopatol bras**. v. 31, p. 605-605, 2006. doi:10.1590/S0100-41582006000600014

DAMASCENO, C. L. **Potencial de *Penicillium citrinum* para o controle de *Aspergillus niger*, agente causal da podridão vermelha do sisal** / Caroline Lopes Damasceno. 2012. 69 f. Monografia (Graduação) Cruz das Almas, BA, 2012.

ELAD, Y., ZIMAND, G., ZAQS, Y., ZURIEL. S., CHET, I. Use of *Trichoderma harzianum* in combination or alternation with fungicides to control cucumber gray mold (*Botrytis cinerea*) under commercial greenhouse conditions. **Plant Pathol.** 42, 324-332, 1993.

FAO (2016) **FAOSTAT** database. <http://faostat.fao.org/>. Acessado Jul 2016.

Fravel, D.R., 2005. Commercialization and implementation of biocontrol. **Annu. Rev. Phytopathol.** 43, 337-359.

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 p. 649–656, 2015.

GONG Q, ZHANG, C, LU F, ZHAO H, BIE X, LU Z. Identification of bacillomycin D from *Bacillus subtilis* fmbJ and its inhibition effects against *Aspergillus flavus*. **Food Control** v. 36, p.8–14, 2014. doi:10.1016/j.foodcont.2013.07.034

GUETSKY R., SHTIENBERG D., ELAD Y., FISCHER E., DINOOR A. Improving biological control by combining biocontrol agents each with several mechanisms of disease suppression. **Phytopathology** v.92, p.976-985, 2002.

GUPTA R, VAKHLU J. Bacterial biocontrol agents. In: Harzevili, F. D., Chen, H. (Eds) *Microbial biotechnology: progress and trends*. Boca Raton: CRC Press, pp 317-326, 2015.

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

HILL, T., LEWICKI, P., 2006. **Statistics – Methods and applications**. Statsoft Inc., Tulsa, USA, 2006.

IBGE, 2015. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Levantamento sistemático da produção agrícola**. Janeiro, 2015.

JANISIEWICZ W. J.; BORS, B. Development of microbial community of bacterium and yeast antagonists to control wound invading postharvest pathogens of fruits. **Applied Environmental Microbiology**. v. 61, p.3261–3267, 1995.

JANOUSEK, C.N., LORBER, J.D., GUBLER, W.D. Combination and rotation of bacterial antagonists to control powdery mildew on pumpkin. *J. Plant Dis. Prot.* 116, 260-262, 2009.

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

LEAL, E., SILVA, G.B., COSTA. I.C., SILVA, L.G., PEREIRA, M., QUEIROGA, O.M., MIRANDA, O.V.; **Sistema agroindustrial do sisal na Paraíba**. Campina Grande: Universidade Federal da Paraíba, p.41, 1997.

LEIBINGER W.; BEUKER B.; HALM M.; MENDGEN K. Control of postharvest pathogens and colonization of the apple surface by antagonistic microorganisms in the field. **Phytopathology**. v. 87, p. 1103–1110, 1997.

LESSA, R. Sisal - **Uma Cultura de Fibra**. RUMOS, janeiro/fevereiro, 2007.

LEVY Y, BENDERLY M, COHEN Y, GISI U, BASSAND D (1986) The joint action of fungicides in mixtures; comparison of two methods for synergy calculation. **Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 04/2008**. v. 16, p.651-657, 1986. doi:10.1111/j.1365-2338.1986.tb00338.x

LI, Y., MAI, Y.-W., YE, L., Sisal fibre and its composites: a review of recente developments. **Composites Science and Technology**. v.60, p. 2037–2055, 2000.

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, p.109-112, 1998.

MAGALHÃES, V. C. **Uso de bactérias de Restinga no controle da podridão vermelha do sisal**. 2013. 92 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, BA, 2013.

MARTIN, M. A.; MATTOSO, L. H. C.; SILVA, O. R. R. F. Caracterização Química e Estrutural de Fibra de Sisal da Variedade Agave sisalana. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, 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.

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

MELLO, I. S. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: MELLO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Controle Biológico**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, v.1, p.17-67, 1998.

MENDOZA, A. R., SIKORA, R. A. Biological control of *Radopholus similis* in banana by combined application of the mutualistic endophyte *Fusarium oxysporum* strain 162, the egg pathogen *Clonostachys rósea* strain 251 and the antagonistic bacteria *Bacillus firmus*. **Biological Control**. v. 54, p. 263–272, 2009.

MEYER, S. L. F., ROBERTS, D. P. Combinations of biocontrole agentes for management of plant- parasitic nematodes and soilborne plant-pathogenic fungi. **Journal of Nematology**. v. 34. p.1-8, 2002.

MISHRA, D.S., KUMAR, A., PRAJAPATI, C.R., SINGH, A.K., SHARMA, S.D. Identification of compatible bacterial and fungal isolate and their effectiveness against plant disease. **J. Environ. Biol**. v. 34, p. 183-189, 2013.

MOREIRA, J. A. N.; VIEIRA, R. M. de. Melhoramento genético do sisal. In: SILVA, O. R. R. F. da; BELTRÃO, N. E. de M. **O Agronegócio do sisal no Brasil**. Brasília, D. F.: Embrapa – SPI; Campina Grande: Embrapa – CNPA, p. 25-34, 1999.

MURHERJEE, P. S.; SATYANARAYANA, K. G. Structure and properties of some vegetable fibres, part 1. Sisal fibre. **Journal of Materials Science**, v.19, p.3925-3934, 1994.

REIS, J. M. L. Sisal fiber polymer mortar composites: Introductory Fracture Mechanics Approach. **Construction and Building Materials**. v. 37, p. 177-180, 2012. doi:10.1016/j.conbuildmat.2012.07.088

RUANO-ROSA D., CAZORLA F., M., BONILLA, N. MARTÍN-PÉREZ. R., VICENTE, A. DE, LÓPEZ-HERRERA C. J. Biological controlo f avocado White root rot with combined applications of *Trichoderma* spp. and rhizobacteria. **Eur J Plant**. v.138, p.751-762, 2014. doi: 10.1007/s10658-013-0347-8

SÁ, J. O. **Controle biológico da podridão vermelha do sisal (*Agave sisalana* Perrine) com *Trichoderma* spp. e Actinobactérias**. 2013. 136 f. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias), Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2013.

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

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

SEAGRI, 2011. **Secretaria da Agricultura, Pecuária, Irrigação, Pesca e Aquicultura**. Disponível: <http://www.seagri.ba.gov.br/noticias/2011/01/06/aumenta-produtividade-de-sisal-na-bahia>. Acesso: 15 jul de 2015.

SILVA FILHO, J. L.; CARVALHO, O. S.; COSTA, L. B. da **Cultivo do Sisal no Nordeste Brasileiro**, Circular Técnica n. 123, Embrapa Algodão, Campina Grande, PB, 2008. p. 24.

SILVA, A. C. M. **Densidades populacionais, Diversidade e atividade de bactérias endofíticas de sisal contra *Aspergillus niger***. 2012. 96 f. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2012.

SILVA, O. R. R. F. da.; BELTRÃO, N. E. M de. **O agronegócio do sisal no Brasil**. Brasília: Embrapa-SPI; Campina Grande: Embrapa-CNPA, p. 205, 1999.

SILVA, O. R. R. F., COUTINHO, W. M., CARTAXO, W. V., SOFIATTI, V., FILHO, J. L. S. da, CARVALHO, O. S., COSTA, L. B. da (2008) **Cultivo do Sisal no Nordeste Brasileiro**. Circular técnica n. 123, Embrapa, Campina Grande, PB, 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, p. 42, 2006.

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.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Porto Alegre, Artmed, 2004.

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

VERDE, M. C. L. **Estudo de caso: desenvolvimento sustentável da região sisaleira: Valente-Bahia** – Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Administração Municipal- IBAM, 82p, 2007.

XU X-M.; JEFFRIES P.; PAUTASSO M.; JEGER M. J. Combined Use of Biocontrol Agents to Manage Plant Diseases in Theory and Practice. **Phytopathology** v. 101, p.1024-1031, 2011.

YANG Y, YANG F, MIAO C, LIU K, LI Q, QIN, S, ZHAO, K DING, A. Antifungal metabolites from the rhizospheric *Penicillium* sp. YIM PH 30003 associated with *Panax notoginseng*. *Phytochemistry Letters* v.11, p.249–253, 2015. [doi:10.1016/j.phytol.2015.01.010](https://doi.org/10.1016/j.phytol.2015.01.010)

ZORZETTI J.; SANTORO, P. H.; CONSTANSKI K. C.; NEVES P. M. O. J. Sensibilidade de conídios de *Beauveria bassiana* a fatores abióticos após sucessivos cultivos *in vitro*. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, n. 4, p. 1773-1784, 2014.