

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROTEÇÃO DE PLANTAS**

**JOSEANI CASTRO DA SILVA**

**CONTROLE BIOLÓGICO DA RESINOSE DO COQUEIRO**

Maceió  
2015

**JOSEANI CASTRO DA SILVA**

**CONTROLE BIOLÓGICO DA RESINOSE DO COQUEIRO**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Proteção de Plantas da Universidade Federal de Alagoas, como requisito para obtenção do Título de Doutorado em Proteção de Plantas.

**Comitê de orientação:**

Prof. Dr. Gaus Silvestre de Andrade Lima  
Pesquisador Dr. Eudes de Arruda Carvalho  
Prof. Dra. Gisele Barata da Silva.

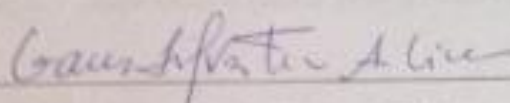
Maceió  
2015

Folha de Aprovação

JOSEANI CASTRO DA SILVA

**CONTROLE BIOLÓGICO DA RESINOSE DO COQUEIRO**


Tese submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Proteção de Plantas da Universidade Federal de Alagoas e **Aprovada** em 25 de fevereiro 2015



Prof. Dr. Gauss Silvestre de Andrade Lima (UFAL)

(Orientador)

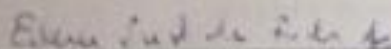
Banca examinadora:



Prof.<sup>a</sup> Dra Edlene Maria da Silva Moraes Santos (FASVIPA) (Examinador externo)



Prof. Dr. Henrique Fonseca Goulart (UFAL) (Examinador externo)



Prof.<sup>a</sup> Dra Edna Peixoto da Rocha Amorim (UFAL) (Examinador interno)

*Primeiramente a Deus, pois sem seu amor e misericórdia este sonho não seria possível;*

*Aos meus pais Raimundo Nonato Moraes da Silva (In Memoriam) e Ana Maria Castro da Silva, meus maiores incentivadores;*

*A minha filha Ana Clara Castro Vellasco que trás brilho à minha vida;*

*Aos meus irmãos Nazaré, Fabio e Ariane Castro por sempre me apoiarem;*

*Aos meus sobrinhos Joao Vitor e Lucas Castro que tanto amo;*

*E às minhas irmãs de coração presenteadas pela vida Vanessa Marques e Diana Castro por serem grandes apoiadoras dos meus sonhos.*

## AGRADECIMENTOS

*As instituições de Ensino e Pesquisa: Universidade Federal de Alagoas, Embrapa Amazônia Oriental, Universidade Federal Rural da Amazônia e Empresa SOCOCO por todo o envolvimento nesta pesquisa;*

*Ao Professor Dr. Gaus Silvestre de Andrade Lima, ao pesquisador Dr. Eudes de Arruda Carvalho e a Prof<sup>ª</sup>. Gisele Barata da Silva pelos ensinamentos, orientação, companheirismo e amizade ao longo destes anos, contribuindo para minha formação;*

*Aos profissionais da SOCOCO, Dr. Paulo Lins, Edilberto Conceição e Samuel Cohen;*

*Ao Professor Dr. Antônio Euzébio Goulart da Universidade Federal de Alagoas responsável pelo Laboratório de Pesquisa em Química dos Produtos Naturais pelo apoio neste estudo;*

*A graduanda em Agronomia Silvia Coelho Nascimento pelo seu apoio, parceria e profissionalismo incondicional;*

*Ao graduando Juscelino Gonçalves Palheta pelo importante apoio nas realizações dos ensaios realizados;*

*A coordenação do Programa de pós-graduação em Proteção de Plantas da Ufal, representada pela Prof. Iraildes Pereira Assunção;*

*As amigas e parceiras de trabalho Jaqueline Figueredo e Sarah Cavalcanti pelo apoio desde o início deste caminho;*

*Aos colegas do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Amazônia Oriental, Ida, Kenny, Manoel, Aline, Lais, Érica, Carina e Cássia pelo apoio e amizade durante estes anos de pesquisas;*

*Aos colegas do Laboratório de Proteção de Plantas da UFRA, Mayara Nascimento e Marcela Rego pelo apoio profissional e amizade;*

*Aos colegas do Laboratório de Fitopatologia Molecular da UFAL, Mayra, Lucas, Janaine, Fred, Aline, Roberto e Leonardo pelo companheirismo;*

*Aos colegas doutorandos da UFAL, Jaqueline Figueredo, Quitéria Santos, Hully Monaisy, Vanessa Melo, Ellen Carine Valente, Deyse Ferreira Rocha, Danilo César Oliveira, Wellington Costa da Silva, Jorge Portella, por terem sido uma excelente turma não somente de estudantes, mas também de amigos;*

*A CAPES, pelo apoio financeiro através de bolsa de doutorado.*

*...Plante seu jardim e decore sua  
alma ao invés de esperar que  
alguém lhe traga flores...*

Verônica Shoffstal

## RESUMO

A resinose causada pelo fungo *Thielaviopsis paradoxa* é uma importante doença da cultura do coqueiro, que vem disseminando-se gradativamente e causando grandes perdas em áreas de plantio, com isso, torna-se cada vez mais importante, estudos da doença. Diante de tal problemática este trabalho objetivou obter conhecimento sobre o patossistema da resinose do coqueiro, bem como, selecionar microrganismos com potencial biocontrolador da doença e os mecanismos de ação utilizados para tal. Após coleta de amostras oriundas de plantas doentes, os isolados de *T. paradoxa* obtidos foram selecionados através de teste de patogenicidade, e o isolado TC.060 que apresentou maiores valores de severidade também apresentou maior tamanho de lesão externa e interna quando inoculado através de pulverização na ráquis previamente ferida. Isolados de *Bacillus* spp. e *Trichoderma* spp. obtidos a partir de amostras de rizosfera de plantas sintomáticas e assintomáticas em área de cultivo foram selecionados in vitro, como potenciais no controle do patógeno. Dentre os microrganismos obtidos, 7% dos isolados pertencem ao gênero *Bacillus* spp. e 9 % ao gênero *Trichoderma* spp. O potencial destes isolados para o controle biológico da resinose do coqueiro foi confirmado através da produção enzimática. Todos os isolados de *Bacillus* sp. avaliados apresentaram produção de protease. Enquanto a produção de quitinase foi positiva para os isolados de *Bacillus* sp. B.01 e B.0. A produção de  $\beta$ -1,3 glucanase foi observada apenas pelo B.57. Os isolados de *Trichoderma* sp. não apresentaram atividade enzimática. Os perfis voláteis analisados por GC-MS identificaram 16 VOCs potenciais no biocontrole de doenças em plantas, tais como, dióxido de carbono, 2-propanona, etanol, ácido acético, fenol, benzeno, benzaldeído, 2-etil-hexanol. Os isolados B.01, B.02 e B.04 produziram mais VOCS que os demais isolados. Os compostos benzaldeído, fenol e 2-etil-hexano foram produzidos por todos os isolados de *Bacillus* sp., enquanto 2-nonanona e 2-decanona foram produzidos exclusivamente por B.01 e B.02. Este estudo demonstrou que isolados de *Bacillus* spp. avaliados produzem compostos voláteis com potencial antifúngicos, bem como apresentam atividade enzimática eficiente em degradar a parede celular de *T. paradoxa*.

**Palavras-chave:** *Cocos nucifera*. Fitossanidade. Manejo. Microrganismos. Antagonistas.

## ABSTRACT

The stem bleeding is important disease in coconut crop caused by the fungus *Thielaviopsis paradoxa*, which has been gradually growing and causing high losses in plantation areas, it becomes very important the study of the disease. Faced with this problem this work aimed to gain insight into the pathosystem of coconut stem bleeding and select microorganisms with potential biocontrol of the disease and the mechanisms used for this. After collecting samples from diseased plants, the isolates obtained of *T. paradoxa* were selected by the pathogenicity test, the TC.060 isolated that had higher severity values and also showed larger external and internal injury when inoculated by spraying of the previously wound rachis. *Bacillus* spp. and *Trichoderma* spp. obtained from rhizosphere samples from symptomatic and asymptomatic plants that growing in vitro were selected area as potential for pathogen control. Among the microorganisms obtained, 7% of the isolates belong to the genus *Bacillus* spp. and 9% to the genus *Trichoderma* spp. The potential of these isolates for biological control of the coconut Resinose was confirmed by enzyme production. All isolates of *Bacillus* sp. assessed had protease production. While the production of chitinase was positive for *Bacillus* sp. B.01 and B.0. The production of  $\beta$ -1,3-glucanase was observed only at B.57. The *Trichoderma* sp. showed no enzyme activity. The volatiles profiles analyzed by GC-MS identified 16 potential biocontroler's VOCs of diseases on plants, such as carbon dioxide, 2-propanone, ethanol, acetic acid, phenol, benzene, benzaldehyde, 2-ethylhexanol. The isolated B.01, B.02 and B.04 produced more VOCS the other strains. The benzaldehyde compounds, phenol and 2-ethylhexane were all produced by *Bacillus* sp., While 2-decanone and 2-nonanone were produced exclusively by B.01 B.02 and. This study demonstrated that isolates of *Bacillus* spp. assessed produce volatile compounds with antifungal potential and present efficient enzymatic activity to degrade the cell wall of *T. paradoxa*.

**Keywords:** *Cocos nucifera*. Plant health. Management. Microorganisms. Antagonists.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Teste de patogenicidade em mudas de coqueiro previamente feridas e inoculadas com diferentes isolados de <i>Thielaviopsis paradoxa</i> .....	38
<b>Figura 2</b>	Avaliação da profundidade da lesão em ráquis de mudas de coqueiro previamente feridas e inoculadas com diferentes isolados de <i>Thielaviopsis paradoxa</i> .....	39
<b>Figura 3</b>	Micélio e conídios de <i>Thielaviopsis paradoxa</i> isolado de estipe de coqueiros sintomáticos em área de plantio comercial no Estado do Pará.	46
<b>Figura 4</b>	Sintomas da resinose em mudas de coqueiro inoculadas com isolados de <i>Thielaviopsis paradoxa</i> .....	47
<b>Figura 5</b>	Teste de patogenicidade em mudas de coqueiro inoculadas com diferentes isolados de <i>Thielaviopsis paradoxa</i> .....	48
<b>Figura 6</b>	Resinose do coqueiro em plantas inoculadas com diferentes métodos de inoculação.....	50
<b>Figura 7</b>	Produção de compostos voláteis por isolados de <i>Bacillus</i> spp.....	55
<b>Figura 8</b>	Interação de hifas entre isolados de <i>Trichoderma</i> spp. e <i>Thielaviopsis paradoxa</i> .....	58
<b>Figura 9</b>	Produção de compostos voláteis por isolados de <i>Trichoderma</i> spp. na inibição do Crescimento micelial e esporulação de <i>Thielaviopsis paradoxa</i> .....	59
<b>Figura 10</b>	Área Abaixo da Curva de Progresso da Severidade (AACPS) da resinose do coqueiro em mudas tratadas com diferentes isolados de <i>Bacillus</i> spp. e <i>Trichoderma</i> spp. Ensaio 1.....	61
<b>Figura 11</b>	Área Abaixo da Curva de Progresso da Severidade (AACPS) da resinose do coqueiro em mudas tratadas com diferentes isolados de <i>Bacillus</i> spp. e <i>Trichoderma</i> spp. Ensaio 2.....	63
<b>Figura 12</b>	Dessorção térmica TD20 (Shimadzu Japan) (a); Cromatografo Gasoso acoplado a Espectrômetro de Massas.....	78
<b>Figura 13</b>	Cultivo de isolados de <i>Bacillus</i> spp. em meio NA.....	79
<b>Figura 14</b>	Produção de quitinase por isolado de <i>Bacillus</i> spp.....	81
<b>Figura 15</b>	Produção de $\beta$ -1,3-glucanase por isolado de <i>Bacillus</i> spp.....	82
<b>Figura 16</b>	Produção de protease por isolados de <i>Bacillus</i> spp.....	83

<b>Figura 17</b>	Cromatograma correspondendo a compostos orgânicos voláteis produzidos por isolados de <i>Bacillus</i> spp.....	84
------------------	--	----

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Teste de confrontação direta de <i>Thielaviopsis paradoxa</i> após 72 horas com isolados de <i>Bacillus</i> spp.....	53
<b>Tabela 2</b>	Testes de Confrontação Direta de <i>Thielaviopsis paradoxa</i> após 14 dias com isolados de <i>Trichoderma</i> spp.....	56
<b>Tabela 3</b>	Produção de enzimas hidrolíticas por isolados de <i>Bacillus</i> spp. e <i>Trichoderma</i> spp.....	81
<b>Tabela 4</b>	Perfil volátil GC / MS de isolados <i>Bacillus</i> spp. biocontroladores da resinose do coqueiro.....	85

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	14
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1	A CULTURA DO COQUEIRO.....	15
2.2	<i>Thielaviopsis paradoxa</i> .....	16
2.3	RESINOSE DO COQUEIRO.....	17
2.4	CONTROLE BIOLÓGICO.....	21
2.4.1	<i>Bacillus</i> spp. ....	22
2.4.2	<i>Trichoderma</i> spp. ....	24
3	REFERÊNCIAS.....	26

### **ESTUDO DA RESINOSE DO COQUEIRO E SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS PARA O CONTROLE BIOLÓGICO.....**

	RESUMO .....	33
	ABSTRACT.....	34
1	INTRODUÇÃO.....	35
2	OBJETIVOS.....	36
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
3.1	Isolamento do patógeno.....	37
3.2	Teste de patogenicidade.....	37
3.3	Métodos de Inoculação.....	39
3.4	Isolamento dos agentes de controle biológico.....	40
3.5	Controle “in vitro” de <i>Thielaviopsis paradoxa</i> por isolados de <i>Bacillus</i> spp.....	41
3.5.1	Confrontação direta.....	41
3.5.2	Produção de compostos voláteis por <i>Bacillus</i> spp. para inibição do crescimento micelial e esporulação de <i>T. paradoxa</i> .....	42

3.6	Controle “in vitro” de <i>T. paradoxa</i> por isolados de <i>Trichoderma</i> spp.....	42
3.6.1	Confrontação Direta.....	42
3.6.2	Interação de hifas.....	43
3.6.3	Produção de compostos voláteis por <i>Trichoderma</i> spp. para inibição do crescimento micelial e esporulação de <i>T. paradoxa</i> .	43
3.7	Controle da resinose do coqueiro por isolados de <i>Bacillus</i> spp. e <i>Trichoderma</i> spp. em casa-de-vegetação.....	44
3.7.1	Ensaio 1.....	45
3.7.2	Ensaio 2.....	45
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
4.1	Isolamento do patógeno.....	46
4.2	Teste de patogenicidade.....	46
4.3	Métodos de Inoculação.....	49
4.4	Isolamento dos agentes de controle biológico.....	52
4.5	Controle “in vitro” de <i>Thielaviopsis paradoxa</i> por isolados de <i>Bacillus</i> spp.....	52
4.5.1	Confrontação direta.....	52
4.5.2	Produção de compostos voláteis por <i>Bacillus</i> spp. para inibição do crescimento micelial e esporulação de <i>T. paradoxa</i> .....	54
4.6	Controle “in vitro” de <i>Thielaviopsis paradoxa</i> por isolados de <i>Trichoderma</i> spp.....	56
4.6.1	Confrontação Direta.....	56
4.6.2	Interação de hifas.....	57
4.6.3	Produção de compostos voláteis por <i>Trichoderma</i> spp. para inibição do crescimento micelial e esporulação de <i>T. paradoxa</i> .	58
4.7	Controle da resinose do coqueiro por isolados de <i>Bacillus</i> spp. e <i>Trichoderma</i> spp. em casa-de-vegetação.....	60
4.7.1	Ensaio 1.....	60

4.7.2	Ensaio 2.....	62
5	CONCLUSÕES.....	65
6	REFERENCIAS .....	66
	<b>MECANISMOS DE AÇÃO DE ISOLADOS DE <i>Bacillus</i> spp. E <i>Trichoderma</i> spp. NO CONTROLE BIOLÓGICO DE <i>Thielaviopsis paradoxa</i>.....</b>	<b>72</b>
	RESUMO.....	72
	ABSTRACT.....	73
1	INTRODUÇÃO.....	74
2	OBJETIVOS.....	75
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	76
3.1	Caracterização enzimática.....	76
3.1.1	Produção de Quitinase.....	77
3.1.2	Produção de $\beta$ -1,3 glucanase.....	77
3.1.3	Produção de Protease.....	77
3.2	Extração e identificação de compostos voláteis (VOC's) de isolados de <i>Bacillus</i> spp. e <i>Trichoderma</i> spp.....	78
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	80
4.1	Caracterização enzimática.....	80
4.1.1	Produção de Quitinase.....	80
4.1.2	Produção de $\beta$ -1,3 glucanase.....	81
4.1.3	Produção de Protease.....	82
4.2	Extração e identificação de compostos voláteis (VOC's) de isolados de <i>Bacillus</i> .....	83
5	CONCLUSÕES.....	88
6	REFERENCIAS .....	89
	ANEXO.....	<b>92</b>

## INTRODUÇÃO GERAL

A cultura do coqueiro (*Cocos nucifera* L.) é de grande importância econômica em diversos países de clima tropical, e o Brasil ocupa a posição de 4º maior produtor (FAOSTAT, 2014). Os principais produtos comercializados no Brasil são a água e o leite de coco, e coco ralado, e subprodutos são o óleo e a torta de coco seco (MEDEIROS, 2010).

Dentre os fatores limitantes à produção de coco, a ocorrência de patógenos é responsável pela redução do potencial produtivo (COSTA et al., 2002. MEDEIROS, 2010). A doença resinose, cujo agente etiológico é o fungo *Thielaviopsis paradoxa* (de Seynes), anamorfo do ascomiceto *Ceratocystis paradoxa* (de Seynes) tem apresentado elevada importância nos últimos anos, desde o primeiro relato no Brasil no ano de 2004 (WARWICK et al., 2004).

Não há registro de produto fitossanitário para controle da resinose (Agrofit, 2014) e ainda, a preocupação de órgãos governamentais e da sociedade com o impacto da agricultura no meio ambiente torna exímia a busca por métodos de controle de doenças, tal como, o controle biológico. Buscando assim, o desenvolvimento de sistemas de cultivo mais sustentáveis e menos dependentes do uso de produtos químicos, envolvendo manejo dos recursos naturais e evitando a degradação do meio ambiente (BIRD et al., 1990; MORANDI e BETTIOL, 2009).

Fungos e bactérias são os principais agentes antagonistas usados para o controle biológico. Micoparasitas como fungos do gênero *Trichoderma* e bactérias do gênero *Bacillus* têm apresentado ampla gama de estratégias para sobrevivência em condições adversas de ambiente. As principais interações antagonistas entre microrganismos que atuam como agentes de controle biológico são: competição, parasitismo e antibiose (BEDENDO et al, 2011).

O gênero *Bacillus* apresenta diversas vantagens, como rapidez com que se desenvolve em meio de cultura e na natureza, produção de endósporos resistentes às condições adversas, crescimento em ampla faixa de temperatura, adaptação a várias condições ambientais e a produção de inúmeros antibióticos (LAZARETTI et al., 1995) que o torna importante agente de biocontrole.

Fungos do gênero *Trichoderma* dispõem de mecanismos para o controle de fitopatógenos como parasitismo, antibiose e competição (HARMAN, 2005) proporcionando vantagens como parasita de hifas e escleródios e plasticidade adaptativa em condições

climáticas distintas (MUKHERJEE et al., 1995; SILVA, 2010). *Trichoderma* spp. é naturalmente encontrado no solo, fator favorável no controle de doenças.

## 1 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 A CULTURA DO COQUEIRO

O coqueiro, pertencente à ordem Arecales e família Arecaceae, é uma planta tropical, encontrado em mais de 200 países em pequenos, médios e grandes plantios, distribuídos na Ásia, África e América. Esta monocotiledônea, conhecida vulgarmente como coco-da-baía, é originária das ilhas de clima tropical e subtropical do Oceano Pacífico, tendo o sudeste Asiático como sua principal referência de centro de origem e de diversidade (FOALE e HARRIES, 2009).

Dentro do gênero *Cocos*, distinguem-se duas principais variedades: a variedade típica Nar. (variedade gigante) e variedade nana Griff (variedade anão), sendo os híbridos resultantes dos cruzamentos entre essas variedades, os coqueiros mais cultivados. O coqueiro gigante é bastante explorado, sendo uma variedade rústica, de crescimento rápido e fase vegetativa longa, iniciando o florescimento entre 5 a 7 anos, em condições ecológicas ideais, chegando a florescer, no entanto, até com 10 anos após o plantio. Esta variedade atinge 20 a 30 m de altura, podendo produzir até 80 frutos/planta/ano, e com vida econômica de 60 a 70 anos. No Brasil é muito empregado *in natura* para uso culinário, bem como na agroindústria de alimentos para leite e farinha de coco, entre outros. O coqueiro anão constitui-se na variedade de coqueiro mais utilizada comercialmente para produção de água de coco, apesar de poder ser empregada também na agroindústria de alimentos e/ou do fruto seco *in natura*, com produtividade estimada de 8 toneladas/ha de polpa. O coqueiro híbrido intervarietal anão x gigante é uma cultivar de ampla utilidade comercial, podendo ser empregada para produções de água de coco e de fibras, e principalmente, para produção de polpa ou albúmen sólido (ARAGÃO et al., 2001).

Em virtude de sua dispersão e adaptabilidade, o cultivo do coqueiro e sua utilização se dão de forma expressiva em todo o mundo, com os mais variados produtos, tanto de forma *in natura*, com o consumo do fruto, quanto industrializada, como fornecimento de matéria-

prima para combustível, ração para animais e fibra empregada em estofamentos de veículos, colchões e tapeçaria (SIQUEIRA et al., 2002).

A introdução do coqueiro no Brasil ocorreu principalmente devida sua adaptação aos solos arenosos da costa brasileira, permitindo ocupação de um ecossistema com poucas possibilidades para outras culturas agrícolas (SIQUEIRA et al., 2002). A produção de coco está distribuída em grande parte do território nacional cuja área plantada no ano de 2013 foi de 257.168 hectares, sendo aproximadamente 215 mil na região Nordeste e 24 mil hectares na região Norte. Os principais estados produtores são Bahia, Ceará, Sergipe, Pará, Rio Grande do Norte, Alagoas e Espírito Santo, com área plantada de 79.976; 44.219; 39.022; 23.975; 17.194; 13.247 e 11.264 hectares, respectivamente (IBGE, 2014). O Estado do Pará é o 4º maior estado produtor com produção de aproximadamente 214 mil frutos/ano e produtividade média de 10.135 frutos/ha e Alagoas passou da posição de 10º maior Estado produtor no ano de 2013 para posição de 6º maior Estado produtor no ano de 2014, com produção de 51.507 frutos/ano e produtividade média de 3.912 frutos/ha (IBGE, 2014).

A ocorrência de patógenos em todas as regiões produtoras, e em intensidade variável, é responsável pela redução geral de até 50% do potencial produtivo da cocoicultura (COSTA et al., 2002. MEDEIROS, 2010). Dentre as doenças, destaca-se a resinose, cujo agente etiológico é o fungo *Thielaviopsis paradoxa* (de Seynes), anamorfo do ascomiceto *Ceratocystis paradoxa* (de Seynes). Esta doença tem apresentado elevada importância nos últimos anos, desde o primeiro relato no Brasil no ano de 2004 (WARWICK et al., 2004). Este patógeno foi disperso gradualmente, e sua ocorrência já foi registrada nos Estados da Bahia, Alagoas, Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte (FERREIRA et al., 2007) e Pará, onde no ano de 2008, no município de Moju, foram descritos os primeiros casos da doença (TREMACOLDI E LINS, 2011).

## **2.2 *Thielaviopsis paradoxa***

*Ceratocystis paradoxa* é um fungo pertencente ao filo Ascomycota, ordem Microascales e família Ophiostomataceae e, em sua fase anamórfica, corresponde ao fungo *Thielaviopsis paradoxa* (INDEX FUNGORUM, 2014). Possui grande número de plantas hospedeiras e sobrevive saprofiticamente sem apresentar grandes dificuldades de sobrevivência de um ano para o outro (MEDEIROS, 2010).



O fungo *C. paradoxa* apresenta ascas clavadas, 25 x 10 µm, localizadas irregularmente no interior de peritécios de corpo esférico com 200-350 µm de diâmetro, imersos no tecido, agregados ou isolados, de coloração parda a escura por onde os ascósporos com 7-10 µm de comprimento por 25 µm de largura são liberados a medida que se formam nas ascas (MICHEREFF, 2008). Em sua fase anamórfica, há a formação de dois tipos de conídios: os microconídios, que são conídios pequenos e medem de 10-15 x 3,5-5 µm sendo inicialmente hialinos formando-se em cadeias e após liberados escurecem, assumindo uma forma elíptica perfeita, estes microconídios são produzidos no interior de conidióforos em forma de clava, eretos, hialinos, longos e afilados; os macroconídios por sua vez desenvolvem-se em cadeias, sendo formados no interior de conidióforos curtos e assumem a forma elíptica de tamanho 3 a 4 vezes maior que o microconídio. Ocorrendo ainda a formação de clamidósporos de paredes espessas (MICHEREFF, 2008).

Este patógeno sobrevive no solo, em restos de cultura, se dispersando por insetos e solo contaminado, através de fissuras naturais de crescimento do vegetal, por ferimentos e por ferramentas usadas na colheita ou erradicação de plantas doentes (NELSON, 2005). Apresenta como hospedeiros, o coqueiro (*C. nucifera* L.) (WARWICK et. al., 2004), o dendezeiro (*Elaeis guineenses* Jacq.) (ALBUQUERQUE et al., 1979), bananeira (*Musa* sp.) (CORDEIRO e KIMATI, 1997), abacaxizeiro (*Ananas comosus* L.) (FERRARI, 2009) e a cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) (CROFT et.al., 2000; CHAPOLA, 2010). O fungo pode sobreviver por longos períodos no solo, sobretudo em resíduos vegetais, desenvolvendo-se em ambientes úmidos e secos. Em palmeiras no início da infecção - nas quais também pode ocorrer através de fissuras naturais do estipe - desenvolve-se na região mais superficial do estipe, provocando uma lesão externa que progride de fora para dentro dos tecidos, causando bloqueio dos vasos responsáveis pela condução da seiva (FERREIRA et al., 2007).

### **2.3- RESINOSE DO COQUEIRO**

O fungo *Thielaviopsis paradoxa* [*Ceratocystis paradoxa* (de Seynes) Moreau] é o agente etiológico da resinose do estipe do coqueiro ou “stem bleeding”, doença que se tornou importante na cultura do coqueiro em diversos países. Foi descrita pela primeira vez em coqueiro no Sri Lanka em 1906. Na Índia, provocou grandes danos à produção e foi definido

o seu agente etiológico como *Thielaviopsis paradoxa* (NAMBIAR et al., 1986). Na Indonésia, a doença causou danos em híbridos reduzindo a produção. Foi relatada no Havaí, segundo Nelson, 2005, e na Venezuela, de acordo com Parra et al., 2003, *T. paradoxa* também causou graves danos aos plantios de coqueiro onde a severidade da doença é elevada, citados por TALAMINI et al., 2012.

A partir de seu primeiro registro no Brasil, no Estado de Sergipe, em 2004 (WARWICK et al., 2004), o patógeno foi disperso gradualmente e sua ocorrência foi registrada nos estados da Bahia, Alagoas, Pernambuco, Paraíba e Rio Grande do Norte. No Estado do Ceará, foi confirmada a ocorrência em 2010 em propriedade comercial e no Estado do Pará, os primeiros casos da doença foram descritos em 2008, em coqueiros híbridos em área de plantio comercial no Município de Moju (TREMACOLDI E LINS, 2011). Focos da doença também foram encontrados em propriedades no Estado do Rio de Janeiro (TALAMINI et al., 2012).

A resinose é caracterizada por manchas avermelhadas e enegrecidas no estipe, provocadas pela exsudação de seiva a partir das rachaduras no estipe das plantas e que se torna escura ao entrar em contato com ar, diferentemente da resina cristalina observada em exsudações por ferimentos, sem a presença do patógeno. Abaixo das lesões, o tecido torna-se amarelado e enegrecido com o progresso da doença. Como consequência ocorre redução na frequência de emissão de folhas e no tamanho das folhas mais novas, afinamento do tronco na região próximo à copa, folhas amarelo-pardacentas frágeis e sujeitas à quebra, inflorescência e frutos secam e ficam enegrecidos, os quais vão caindo gradativamente (WARWICK e PASSOS, 2009), ainda outro sintoma encontrado em algumas plantas é a emissão de raízes aéreas. A infecção inicia-se normamente na base do estipe, favorecida por elevada umidade, mas também pode ser iniciada em diferentes partes do estipe, como a parte mediana e superior (FERREIRA, 2007) causando bloqueio dos vasos responsáveis pela condução da seiva (FERREIRA et al., 2007).

As palmeiras, de um modo geral, são suscetíveis a *T. paradoxa* e sujeitas a grandes perdas (TALAMINI et al., 2012). A transmissão entre plantas pode ocorrer pelas raízes, por solo contaminado, por respingos de água na base do estipe e por ferramentas de trabalho, e a disseminação a longas distâncias pode ocorrer via insetos (FERREIRA et al., 2007). A distribuição da doença no campo apresentou padrão agregado com forte magnitude de dependência espacial (NASCIMENTO, et al., 2014). Esta doença é favorecida por ocorrência de chuvas pesadas seguidas de estiagem, por elevada precipitação pluviométrica, por solo com excesso de salinidade e planta em desequilíbrio nutricional (FERREIRA, 2007).

Em estudos realizados em *Rhynchophorus palmarum* L., considerado possível vetor da resinose, foram observados propágulos de *T. paradoxa* em 40% dos ovipositores, em 50% das patas centrais, 35% das patas traseiras, 60% dos rostros+antenas e 45% das asas e das patas dianteiras (MELO et al., 2010). Quando realizados isolamentos, a partir da parte externa e tubo digestivo de *R. palmarum*, foi obtido 96% e 77% de crescimento micelial de *T. paradoxa* respectivamente, sendo ainda comprovada a patogenicidade dos isolados em plantas de coqueiro. A perda da longevidade do patógeno dentro do inseto foi comprovada após 7 dias, na ausência de nova fonte de infecção (COSTA e CARVALHO et al., 2011). *T. paradoxa* também foi isolado da parte externa de *Homalinotus coriaceus* (WARWICK et al., 2012).

As técnicas de manejo realizadas para o controle da resinose tem sido: frequente monitoramento da plantação com tratamento de plantas doentes por podas cirurgicas ou cirurgias com remoção de tecidos lesionados, seguido de pincelamento com piche ou alcatrão vegetal, sendo tratadas também as plantas vizinhas ainda que saudáveis. A aplicação destes produtos após a cirurgia impede a liberação dos odores fermentados, impedindo a entrada de outros patógenos e a atração de insetos vetores, além de auxiliarem na cicatrização do estipe. Em plantas severamente infectadas, recomenda-se a erradicação manual ou química, com o uso de herbicidas (FERREIRA, 2007). Quanto ao tratamento químico, ainda não existem produtos fitossanitários registrados para o tratamento da resinose do coqueiro (MAPA).

Em se tratando do controle alternativo, produtos à base de cobre também foram avaliados para controle da resinose, onde após o pincelamento da pasta bordalesa em plantas afetadas e em plantas vizinhas ao redor do foco, até a altura de um metro do estipe, foi observada redução significativa de até 66,4% no progresso da resinose, demonstrando efeito preventivo e curativo no controle da doença (WARWICK et al., 2012).

A resistência de plantas também vem sendo objeto de estudo para controle da resinose do coqueiro. Avaliações foram realizadas em área com ocorrência natural da resinose, e resultados preliminares indicaram incidência da doença em todas as cultivares de coqueiro anão avaliadas e em seis das oito cultivares híbridas. Contudo, foi relatada possível resistência em duas cultivares, cujo parental masculino é o Gigante da Polinésia (FERREIRA et al., 2009).

Outra alternativa ao controle da resinose vem sendo o estudo de agentes de controle biológico, devido serem capazes de se estabelecerem, colonizarem e se dispersarem no ecossistema tornando-se alternativa para diminuir o potencial de inóculo de patógenos habitantes do solo (MELLO et al., 2007), com menor risco ao meio ambiente. Alguns fungos são de grande importância econômica para a agricultura, uma vez que são capazes de atuarem como agentes de controle de doenças de várias plantas cultivadas, promotores de crescimento

e indutores de resistência de plantas à doença (MOHAMED e HAGGAG, 2006; SILVA, 2010). São citados fungos com a capacidade de produzir enzimas que degradam paredes celulares de outros fungos e produção de substâncias antifúngicas (antibióticos), apresentando diversas estratégias de sobrevivência que as tornam altamente competitivas no ambiente e extraordinária capacidade de proliferação na rizosfera (MELO, 1996; RESENDE et al., 2004; SILVA, 2010). Ademais, certos isolados se mostraram resistentes aos fungicidas, característica que os fazem potenciais agentes biorremediadores (RESENDE et al., 2004; LOUZADA et al., 2009).

Outros microrganismos potenciais no controle de doenças são as bactérias, uma vez que apresentam uma ampla gama de estratégias de sobrevivência em condições adversas de ambiente e em competição direta com outros microrganismos, como antibiose direta, parasitismo, competição por nichos e nutrientes, e ainda indução de resistência (BETTIOL, 1991; HALFELD-VIEIRA, 2002; MORAES, 2010). O controle biológico torna-se, portanto, uma importante ferramenta no manejo integrado de doenças, buscando uma agricultura sustentável (MICHEREFF et al., 2005) e resolução de problemas relacionados à ocorrência de doenças de plantas, com base na conservação dos recursos naturais, aumento da diversidade biológica, redução no uso de produtos fitossanitários e maximização da produtividade (THURSTON, 1992).

Os estudos vêm demonstrando que a resinose tem se disseminado gradualmente, aumentando o número de coqueiros infectados e de focos nas propriedades a cada ano. Levantamentos da ocorrência da doença no Estado de Sergipe permitiram verificar a incidência em 15 dos 18 municípios produtores de coco. No platô de Neópolis/SE, onde o coqueiro anão verde é cultivado com irrigação, a ocorrência da resinose foi relatada em mais de 50% da área. Em algumas dessas áreas a infecção chegou a aumentar mais de 20% em 5 anos (TALAMINI et al., 2012). No Estado da Paraíba, em um plantio comercial de coqueiro híbrido, foi registrada em quatro anos mais de seis mil plantas doentes (FERREIRA et al., 2007).

Devido sua rápida disseminação e conseqüentemente queda de produção, a resinose tem causado extrema preocupação entre produtores, instituições de pesquisa, órgãos de assistência técnica e defesa fitossanitária, sendo motivo de desafio o estudo de técnicas de controle eficazes no controle da doença.

## 2.4 - CONTROLE BIOLÓGICO

Nos últimos anos, a preocupação da sociedade com o impacto da agricultura no ambiente e a contaminação da cadeia alimentar com produtos químicos tem alterado o cenário agrícola, resultando em mercados de alimentos produzidos sem o uso de produtos fitossanitários ou com selos que garantem o uso racional destes produtos. Estes aspectos fazem com que a situação do uso de produtos fitossanitários permeie a agenda ambiental de diversos países (MORANDI e BETTIOL, 2009). Dentre as alternativas para a redução do uso destes produtos, o controle biológico é um dos mais discutidos, podendo ser importante tanto de maneira natural quanto pela introdução de um agente de controle biológico. Estudiosos acreditam que apenas a substituição de um produto químico por um biológico não é a situação mais apropriada para o controle de doenças, mas sim o desenvolvimento de sistemas de cultivo mais sustentáveis e menos dependentes do uso de produtos químicos, envolvendo manejo adequado dos recursos naturais e evitando a degradação do meio ambiente (BIRD et al., 1990; MORANDI e BETTIOL, 2009). Em meio a tais necessidades, tem se destacado o interesse por organismos capazes de promover o controle biológico de pragas, sobretudo por aqueles que podem ser manipulados em laboratório ou em escala industrial (VILAS-BOAS et al., 1992).

O controle biológico é a redução ou limitação da densidade de inóculo de um patógeno ou parasita, e das atividades que levam à doença pela ação de um ou mais organismos com propriedades antagônicas que ocorrem naturalmente ou pela manipulação do ambiente (COOK, 1985; MORAES, 2010). Esta técnica deverá ser eficaz não apenas pelas propriedades antagônicas e mecanismos de ação dos organismos utilizados, mas também com a promoção de práticas que favoreçam os antagonistas nativos (BETTIOL e GHINI, 1995; MORAES, 2010). Ainda que vários produtos de biocontrole estejam disponíveis, há demanda por novos e o entendimento de seus mecanismos de proteção tem grande importância para subsidiar seu uso (MORANDI e BETTIOL, 2009). Além disso, há a preocupação por adaptabilidade dos agentes de biocontrole em ambientes de cultivos distintos.

Fungos e bactérias são os principais agentes antagônicos. Micoparasitas como fungos do gênero *Trichoderma* (teleomorfo *Hypocrea* sp.), pertencente à família Hypocreaceae, têm sido eficazes no biocontrole de fitopatógenos (MELO, 1996). Enquanto bactérias do gênero *Bacillus* tem apresentado uma ampla gama de estratégias para sobrevivência em condições adversas de ambiente. As principais interações antagônicas entre microrganismos que atuam

como agentes de controle biológico são: competição, parasitismo e antibiose. O antagonismo por competição é a capacidade do agente de biocontrole em competir pela ocupação dos locais de infecção do patógeno, sendo um requisito para qualquer agente de biocontrole; o parasitismo designa a relação nutricional entre dois seres vivos em que um deles, o parasita, obtém todo ou parte de seu alimento a partir e à custa do outro, o hospedeiro; enquanto a antibiose é definida como a interação entre organismos na qual indivíduos de uma população secretam metabólitos capazes de inibir ou impedir o desenvolvimento dos indivíduos de uma população de outra espécie, sendo estes metabólitos usualmente denominados de antibióticos (BEDENDO et al, 2011).

#### 2.4.1 *Bacillus* spp.

O gênero *Bacillus* (família Bacillaceae) é um grupo extremamente heterogêneo e diversificado de bactérias, com forma de bastonetes, estas bactérias gram-positivas, possuem esporos e podem ser aeróbias ou anaeróbias facultativas, sendo frequentemente resistentes a condições ambientais desfavoráveis (INGRAHAM e INGRAHAM, 2011).

Bactérias deste gênero são encontradas em várias partes da planta, apresentando elevado potencial antagônico contra fitopatógenos (BETTIOL, 1997), sendo objeto de estudo de muitos grupos de pesquisa. Este potencial se deve ao fato de bactérias do gênero *Bacillus* apresentarem diversas vantagens, como a rapidez com que se desenvolvem em meio de cultura e na natureza, a produção de endósporos altamente resistente às condições adversas, o crescimento em ampla faixa de temperatura, adaptação a várias condições ambientais e a produção de inúmeros antibióticos (LAZARETTI et al., 1995).

A capacidade de controle de doenças de plantas por bactérias é proporcionada por diferentes mecanismos de ação, que podem atuar isoladamente ou em conjunto. Os principais mecanismos são: a produção de compostos tóxicos aos patógenos como enzimas hidrolíticas, biosurfactantes e antibióticos; a competição por espaço e nutrientes e a ativação de mecanismos de resistência latentes das plantas (CHATTERTON et al., 2004; ZHENG et al., 2000; ZHOU e PAULITZ, 1993; STANGHELLINI e MILLER, 1997; KLOEPPER et al., 1988; PAULITZ et al., 1992; CORRÊA e BETTIOL, 2010).

Isolados de *Bacillus subtilis*, originários do filoplano de plantas de arroz e eucalipto, inibiram a germinação de urediniosporos de diferentes raças de *Hemileia vastatrix* Berk. e

Broome e controlaram a ferrugem, em condições de casa-de-vegetação (BETTIOL e VARZEA, 1992). O potencial antagonico de *Bacillus* spp. foi avaliado sobre *T. paradoxa*, com 86% dos isolados avaliados apresentando inibição do crescimento micelial do patógeno, com percentagem de inibição variando de 42 a 93%, possivelmente em resposta à mecanismos de antagonismo pela produção de quitinase, sideróforos, HCN (Ácido Cianídrico), antibióticos, amoníaco,  $\beta$ -1, 3 - glucanase e ácido salicílico (LITTY et al., 2009). Isolados de *Bacillus* apresentaram efeito significativo no controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* Snyder. e Hansen. em plantas de algodão (CHEN et al., 1995; MELO, 2001), no controle de *Verticillium* sp. Nees. e *Rhizoctonia solani* Kühn. em plantas de batata (NOWAK et al., 1995; MELO, 2001), de *Sclerotium rolfsii* Sacc. em feijoeiro (PLEBAN et al., 1995; MELO, 2001), além de diversas doenças em pepino como a murcha de *Fusarium* (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* Owen.), mancha angular (*Pseudomonas syringae* pv. *Lachrymans*), antracnose (*Colletotrichum orbiculare* Berk.) e mosaico (CMV- cucumber mosaic virus) (WEI et al., 1991; LIU et al., 1995; RAUPACH et al., 1997; MELO, 2001). *Bacillus subtilis* apresentou potencial antagonista a *Pythium aphanidermatum* Fitzp., agente etiológico da podridão de raiz em plantas de alface, em cultivo hidropônico e redução de 60% na incidência da doença (CORRÊA e BETTIOL, 2010). A potencialidade antagonista de 64 isolados de *B. subtilis* a *Colletotrichum acutatum* Simmonds. foi avaliada ‘in vitro’ e em flores destacadas de lima ácida Tahiti”, e todos os isolados produziram metabólitos capazes de inibir o crescimento micelial do fitopatógeno e muitos destes isolados proporcionaram 100% de controle da doença em flores destacadas (KUPPER e GIMENES-FERNANDEZ, 2002; NADJARA e NADJARA 2012). Em trabalho de seleção de microrganismos antagonicos a *Pyricularia oryzae* Cavara., verificou-se que *B.subtilis* foi o mais eficiente em inibir o crescimento micelial do patógeno, sendo constatado que o antagonista apresentou características para uso como agente de controle biológico, pois, além de rápido desenvolvimento, tanto em meio de cultura como na natureza, produziu endósporos e antibióticos, crescendo em larga faixa de temperatura e adaptando-se a várias condições ambientais (BETTIOL, 1988; REMUSKA e PRIA, 2007).

#### 2.4.2 *Trichoderma* spp.

Fungos micoparasitas vêm sendo considerados eficazes no biocontrole de diversos fitopatógenos, apresentando elevado potencial no controle de doenças. Dentre tais fungos, o gênero *Trichoderma* apresenta potencial como agente de controle biológico, proporcionando diversas vantagens, como parasita de hifas e escleródios e fácil adaptação em diversas condições climáticas (MUKHERJEE et al., 1995; SILVA, 2010). *Trichoderma* spp., é naturalmente encontrado no solo e apresenta importante função ecológica, pois participa da decomposição e mineralização dos resíduos vegetais, contribuindo com a disponibilização de nutrientes para as plantas. É também considerado um biofungicida natural, que reduz em até 100% as chances de qualquer outro fungo atingir a cultura, apresentando rápido crescimento (SAITO et al., 2009).

Fungos deste gênero podem atuar, via de regra, por um ou mais mecanismos, como parasitismo, antibiose e competição (HARMAN, 2005). A determinação desses efeitos depende de muitas interações que ocorrem no solo entre *Trichoderma* spp. raízes da planta e outros microorganismos (ASKEW e LAING, 1993, PORRAS et al., 2007; SILVA, 2010). Algumas espécies de *Trichoderma* caracterizam-se por apresentarem alta produção de substâncias gasosas de origem antibiótica. Os metabólitos produzidos podem ser voláteis e não-voláteis. Dentre os antibióticos produzidos, foram citados gliotoxina, viridina, trichodermina, suzucacilina, alameticina e dermadina, os quais têm a capacidade de inibir o desenvolvimento de vários fungos (BASTOS, 1991). Quanto à atividade enzimática, espécies de *Trichoderma* são conhecidas pela alta capacidade em produzir enzimas que degradam celulose e quitina, substância presente em microorganismos (HARMAN et al., 2004).

Isolados de *T. paradoxa* apresentaram crescimento micelial completamente inibido em meio de cultura por meio do micoparasitismo e liberação de metabólitos tóxicos pelo antagonismo de diferentes isolados de *Trichoderma longibrachiatum* Rifai., isolado de *Agave tequilana* (SÁNCHEZ et al., 2007). Em testes de pareamento de culturas “in vitro”, isolados de *Trichoderma* sp. sobre *T. paradoxa*, isolado de plantas de coqueiro, promoveram inibição do crescimento micelial do fitopatógeno em relação aos demais isolados e à testemunha (SANTOS et al., 2011). Interação de hifas foram observadas entre *Trichoderma* sp. e os fitopatógenos *R. solani*, *Fusarium* sp. e *Colletotrichum* sp. e em teste para produção de metabólitos voláteis por *Trichoderma* sp. observaram redução no diâmetro da colônia de *Phytophthora* sp. (SANTOS et al., 2008). *Trichoderma* spp. controlou os patógenos foliares



*Botrytis cinerea* Pers., *Pseudoperonospora cubensis* Berk. e Curtis., *Sphaerotheca fusca* Blumer. e *Sclerotinia sclerotiorum* Lib. em plantas de pepino em casa de vegetação (ELAD, 2000; FONTENELLE, 2011). Suspensões de micélio e conídios de *Trichoderma polysporum* em concentrações de 100 e 70% reduziram significativamente o crescimento de *C. paradoxa* (EZIASHI, 2006). Frutos de abacaxi tratados com *Trichoderma asperellum* (Samuels. Lieckf. e Nirenberg.) mantiveram-se livres de *T. paradoxa* em concentração de  $1 \times 10^{-5}$  conídios.  $\text{mL}^{-1}$ , ocorrendo a completa inibição do crescimento micelial do patógeno (WIJESINGHE et al., 2010).

### 3 REFERÊNCIAS

- AGROFIT. Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>. 2014. Acesso em: 03 jan 2015.
- ALBURQUEQUE, C.; CARDOSO. ARAGÃO, W. M. A cultura do coqueiro. **Embrapa Tabuleiros Costeiros**. Sistemas de produção. 1979. Versão eletrônica. Novembro 2007.
- ARAGÃO, W. M.; BOAVENTURA, R. F.; ARAGÃO, R. B.; BARROS, K. B. R. Variabilidade e correlações entre caracteres morfológicos reprodutivos em cultivares de coqueiro anão (*Cocos nucifera* L., var. Nana). **Agrotropica** 13 (1) 27 – 32, 2001.
- ASKEW, D. J., LAING, M. D. Anadapted selective medium for the quantitative isolation of *Trichoderma* species. **Plant Pathology**. 42: 686-690, 1993.
- BASTOS, C.N. Possibilidade do controle biológico da vassoura-de-bruxa (*Crinipellis perniciosa*) do cacauzeiro. In: BETTIOL, W. (Org.). **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA, 1991.
- BEDENDO, I.P.; MASSOLA JUNIOR, N. S.; AMORIM, L. Controles Cultural, Físico, e Biológico de doenças de plantas. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. (Eds.). **Manual de Fitopatologia**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, p. 367-388, 2011.
- BETTIOL, W. GHINI, R. CONTROLE BIOLÓGICO. In: Bergamim, A. F.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos**. 3. Ed. São Paulo. Agronômica Ceres, p. 717-728, 1995.
- BETTIOL, W. Seleção de microrganismos antagonicos a *P.oryzae* para o controle da Brusone do arroz (*Oryza sativa* L.). Piracicaba. **Tese (Doutorado em Fitopatologia)**. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz-Universidade de São Paulo. P. 140, 1988.
- BETTIOL, W. Componentes do controle biológico de doenças de plantas. In: BETTIOL, W. (Org.) Controle biológico de doenças de plantas. Brasília: **EMBRAPA (Boletim Técnico) n.5**. p.1-5. 1991.
- BETTIOL, W. Biocontrole na filosfera: problemas e perspectivas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.5, p.59-97, 1997.
- BETTIOL, W.; VARZEA, V.M.P. Controle biológico da ferrugem (*Hemileia vastatrix*) do cafeeiro com *Bacillus subtilis* em condições controladas. **Fitopatologia Brasileira** 17: 91-95, 1992.
- BIRD, G. W. et al. Design of pest mana-gement systems for sustainable agricultu-re. In: FRANCIS, C. A. et al. Sustainable Agriculture in Temperate Zones.2. ed. **New York: Jonh Wiley**, p. 55-110, 1990.
- CHAPOLA, R. G. Controle da Podridão Abacaxi da cana-de-açúcar por meio da pulverização de fungicidas em mudas no sulco de plantio. **Dissertação de Mestrado**. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2010.

CHATTERTON, S.; SUTTON, J. C.; BOLAND, G.J. Timing *Pseudomonas chlororaphis* applications to control *Pythium aphanidermatum*, *Pythium dissotocum*, and root in hydroponic peppers. **Biological Control** 30: 360-373. 2004.

CHEN, C.; BAUSKE, E. M.; MUSSON, G.; RODRÍGUES-KÀBANA, R.; KLOEPPER, J. W. Biological control of Fusariumwilt on cotton by use of endophytic bacteria. **Biological Control**, London, v.5, p.83-91, 1995.

COOK, R. J. Biological control of the pathogens: theory to application. **Phytopathology** 75: 25-29. 1985.

CORDEIRO Z. J. M.; KIMATI, H. Doenças da bananeira (*Musa* spp.) In: Manual de fitopatologia. KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M.; Agrônômica Ceres. Volume 2: **Doenças das Plantas Cultivadas**. 1997.

CORRÊA, E. B.; BETTIOL, W. Controle da podridão de raiz e promoção de crescimento em hidroponia com bactérias. In: Bettiol, Wagner: Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectiva / Editado por Wagner Bettiol e Marcelo Augusto Boechat Morandi. Jaguariúna: **Embrapa Meio Ambiente**. p. 225-238. 2010.

COSTA E CARVALHO, D.R.N. WARWICK; P. E. SOUZA; J. L. S. CARVALHO FILHO. Longevidade de *Thielaviopsis paradoxa*, agente causal da resinose do coqueiro em *Rhynchophorus palmarum*. R.R. Costa e Carvalho. **Scientia Plena** 7 (4), 2011.

COSTA, J.L.S; OLIVEIRA, V.C.; VIANA, F.M.P.; LEAL, E.C.; WARWICK, D. R. N. Aprimoramento do conhecimento científico e desenvolvimento de tecnologias para o controle das principais doenças do coqueiro. **Embrapa Tabuleiros Costeiros**, p.121, 2002.

CROFT, B.; MAGAREY, R.; WHITTLE, P. Disease management. In: HOGARTH, D. M.; ALLSOPP, P. G. (Ed.). **Manual of canegrowing**. Brisbane: Bureau of Sugar Experiment Stations, p. 263-289. 2000.

ELAD, Y. Biological control of foliar pathogens by means of *Trichoderma harzianum* and potential modes of action. **Crop Protection**. 19, 709-714. 2000.

EZIASHI, E. I. Effect of metabolites produced by *Trichoderma* species against *Ceratocystis paradoxa* in culture medium. **African Journal of Biotechnology** 5 (6): 703 – 706. 2006

FAOSTAT. Faostat Database Results. Disponível em: <http://www.fao.org/codex.2014>. Acesso em 10 dez 2014.

FERRARI, J.T. Podridão Negra do Abacaxi. Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Vegetal. Divulgação Técnica. **Instituto Biológico** v.71 (1): 49-51, 2009.

FERREIRA J.; MOREIRA M. A. B.; TALAMINI V.; ARAGÃO W. A.; WARWICK D. R.; MORAES A. C. Incidência da Resinose em diferentes genótipos de coqueiro. **Resumos da Feira Internacional da fruticultura Tropical Irrigada**, CD-ROOM, Mossoró/RN. 2009.

FERREIRA, J. M. S. Resinose do coqueiro: como identificar e manejar. Edição de Joana Maria Santos Ferreira; Humberto Rollemberg Fontes, Sérgio Oliveira Procópio: **Embrapa Tabuleiros Costeiros**, 2007.

FERREIRA, J.M.S.; FONTES, H.R.; PROCÓPIO, S.O. Resinose do coqueiro – como identificar e manejar. Aracaju: **Embrapa Tabuleiros Costeiros**, p. 127, 2007.

FOALE, M.; HARRIES, H. Farm and Forestry Production and Marketing Profile for Coconut (*Cocos nucifera*). In: ELEVITCH, C. R. (Ed.). **Specialty Crops for Pacific**. Agroforestry. Holualoa-Hawai. PAR (Permanent Agriculture Resources). 2009.

FONTENELLE, A. D. B. Promoção de crescimento e indução de resistência em tomateiro a *Xanthomonas vesicatoria* e *Alternaria solani* por *Trichoderma* spp. **Dissertação (Mestrado)**. São Paulo. Instituto Biológico de São Paulo. 2011.

HALFELD VIEIRA, B. A. Antibiose como mecanismo de biocontrole por bactérias de filoplano de tomateiro e sua inadequação como critério de seleção de antagonistas. In: Halfed Vieira, B. A. Bactérias residentes do filoplano de tomateiro como agentes e controle biológico de enfermidades da parte aérea da cultura. **Tese (Doutorado em Fitopatologia)**. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2. P. 23-38. 2002.

HARMAN, G. E. The Nature and Application of Biocontrol Microbes II: *Trichoderma* spp. Overview of Mechanisms and Uses of *Trichoderma* spp. **Phytopathology** 96:190-194, 2005.

HARMAN, G.E.; HOWELL, C.R.; VITERBO A.; CHET, I. LORITO, M. *Trichoderma species-opportunistic, avirulent plant symbionts*. **Nature Reviews Microbiology**. 2: 43-56. 2004.

INGRAHAM, J. L.; INGRAHAM, C. A. **Introdução à Microbiologia: Uma Abordagem baseada em estudos de Casos**, São Paulo, Tradução da 3ª edição norte americana. Editora Cengage. São Paulo. SP. 2011.

**Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Censo Agropecuário. Pesquisa Agrícola. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/homeestatistica/indicadores/agropecuaria>. Acesso em 12 fev 2015.

**INDEX FUNGORUM**. Disponível em <http://www.indexfungorum.org/NamesRecord>. Acesso em 03/01/2014.

KLOEPPER, J.W.; LIFSHITZ, R.; SCHROTH, M.N. *Pseudomonas* inoculants to benefit plant production. **Animal and Plant Sciences** 60: 64. 1988.

KUPPER, K. C.; GIMENES FERNANDES, N. Isolamento e seleção de *Bacillus* spp. para o controle de *Colletotrichum acutatum* em flores destacadas de lima ácida “Tahiti”. **Summa Phytopathologica**, v. 28, p. 292-295, 2002.

LAZARETTI, E.; MENTEN, J.O.M.; BETTIOL, W. Tratamento de sementes de trigo com *Bacillus subtilis* para o controle de *Pyricularia oryzae*, *Bipolaris sorokiniana* e *Alternaria tenuis*. **Summa Phytopathologica** 21 (2): 163 – 167. 1995.

LITTY; T.; MURALI, G.; CHANDRAMOHANAN, R.; ALKA, G.; PRIYA, G.; GEORGE T. V. Antagonistic activity of coconut rhizospheric and endophytic *Bacillus* against *Ganoderma applanatum* and *Thielaviopsis paradoxa*. **Epidemiological and vector studies of coconut root (wilt) disease**. v. 39, p. 92. 2009.

LIU, L.; KLOPPER, J.W.; TUZUN, S. Induction of systemic resistance in cucumber against bacterial angular leaf spot by plant growth-promoting rhizobacteria. **Phytopathology** 85: p.843-84, 1995.

LOUZADA, G.A.S., CARVALHO, D.D.C., MELLO, S.C.M., LOBO JÚNIOR, M., MARTINS, I. e BRAÚNA, L.M. Antagonist potential of *Trichoderma* spp. from distinct agricultural ecosystems against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Fusarium solani*. **Biota Neotrop** 9 (3), 2009. Disponível em <http://www.biotaneotropica.org.br/v9n3>. Acesso em junho de 2014.

MAPA. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. O Setor Produtivo da Fruticultura. 2014. Disponível em <http://www.agricultura.gov.br>. Acesso em: 03 fev 2015.

MEDEIROS, R.D. Análise do arranjo espacial e determinação da estrutura de focos da resinose do coqueiro (*Cocos nucifera* L.) na região de Neopólis. **Dissertação de Mestrado (Mestrado em Agroecossistemas)**. Universidade Federal de Sergipe. Rangél Dórea de Medeiros. Sergipe. 2010.

MELO, M. R. F. Efeito de bactérias na promoção de crescimento e no biocontrole da fusariose em mudas de abacaxi micropropagadas. **Dissertação (Mestrado)** - Universidade Federal Rural de Pernambuco. 94 p. 2001.

MELO, S.C.M.; ÁVILA, Z.R.; BRAÚNA, L.M.; PÁDUA, R.R.; GOMES, D. Cepas de *Trichoderma* para el control biológico de *Sclerotium rolfsii* Sacc. **Fitossanidade** 11 (1): 3-9, 2007.

MELO, I.S. *Trichoderma* e *Gliocladium* como bioprotetores de plantas. **Revis. Anu. Patol. Plantas** 4 (1): 261-295, 1996.

MELO C. A., SANTOS F. J., TALAMINI V., SILVA A. M. F., FERREIRA J. Presença de *Thielaviopsis paradoxa* em indivíduos de *Rhyncophorus palmarum* capturados isoladamente em plantio de coqueiro com sintomas da resinose. Resumos da Feira Internacional da fruticultura Tropical Irrigada, CD-ROOM, Mossoró/RN. 2010.

MICHEREFF, S. J.; PERUCH, L. A. M.; ANDRADE, D. E. G. T. Ecologia manejo de patógenos radiculares em solos tropicais. **Recife: UFRPE - Imprensa Universitária**, 2005.

MICHEREFF, S.J. Podridão negra. In: DEL PONTE, E.M. **Fitopatologia.net - herbário virtual**. Departamento de Fitossanidade. Agronomia, UFRGS. 2008. Disponível em: <http://www6.ufrgs.br/agronomia/fitossan/herbariovirtual/ficha>. Acesso em: agosto em 2013.

MOHAMED, H.A.L.A.; HAGGAG, W.M. Biocontrol potential of salinity tolerant mutants of *Trichoderma harzianum* against *Fusarium oxysporum*. **Braz. Journal Microbiol.** 37 (2): 181-191. 2006.

MORAES, A. J. G. Seleção de Rizobactérias promotoras do crescimento e biocontrole da brusone (*Magnaporthe oryzae*) em arroz (*Oryza sativa* L.). **Dissertação Mestrado em Agronomia** – Universidade Federal Rural da Amazônia, 2010.

MORANDI, M. A. B, BETTIOL, W. Controle biológico de doenças de plantas no Brasil. In: BETTIOL, W. Biocontrole de doenças de plantas: Uso e perspectiva. Jaguariúna: **Embrapa Meio Ambiente**. p. 7-14. 2009.

MUKHERJEE, P.K.; MUKHOPADHYAY, A.N.; SARMAH, D.K.; SHRESTHA, S.M. Comparative antagonistic properties of *Gliocladium virens* and *Trichoderma harzianum* on *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani* - its relevance to understanding the mechanisms of biocontrol. **Journal of Phytopathology**. v.143, p.275-279, 1995.

NADJARA, K.; NADJARA, M. Desenvolvimento de formulações de *Bacillus subtilis* para controle da podridão floral em citros. São Carlos : UFSCar, 2012. **Dissertação (Mestrado)**. Universidade Federal de São Carlos, 2012.

NAMBIAR K. K. N., JOSHI Y., VENUGOPAL M. N., MOHAN R. C. Stem bleeding disease of coconut: reproduction of symptoms by inoculation with *Thielaviopsis paradoxa*. **J Plantation Crops** 14: 130-133. 1986.

NASCIMENTO, S. M. C; CARVALHO, E. A.; LINS, P. M. P. Modelagem espaço-temporal da resinose do coqueiro no estado do Pará. In: 18º Seminário de Iniciação Científica e 2º Seminário de Pós-Graduação da Embrapa Amazônia Oriental, 2014.

NELSON, S. Stem bleeding of coconut palm. Plant Disease. Cooperative Extension Service, College of Tropical Agriculture and Human Resources. **University of Hawaii at Manoa**. 2005. Disponível em: <http://www.ctahr.hawaii.edu/freepubs/pdf/PD-30.pdf>. Acesso em 01 out 2013.

NOWAK, J.; ASIEDU, S. K.; LAZAROVITIS, G.; PILLAY, V.; STEWART, A.; SMITH, C.; LIU, Z. Enhancement of in vitro growth and transplant stress tolerance of potato and vegetable plantlets co-cultured with a plant growth-promoting *Pseudomonas* bacterium. **Ecophysiology and photosynthetic in vitro cultures**, p.173-180, 1995.

PARRA, D., MORILLO, F., SÁNCHEZ, P., PINEDA, J., GUERRA, J. Presencia de *Thielaviopsis paradoxa* De Seynes Höhn em el tubo digestivo de *Rhynchophorus palmarum* Linneo (Coleóptera: Curculionidae). **Entomotropica** 18 (1): 49-55, 2003.

PAULITZ, T.C.; ZHOU, T. & RANKIN, L. Selection of rhizosphere bacteria for biological control of *Pythium aphanidermatum* on hydroponically grown cucumber. **Biological Control** 2: 226-237. 1992.

PLEBAN, S.; INGEL, F.; CHET, I. Control of *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* in the greenhouse using endophytic *Bacillus* spp. **Plant Pathology** 101: 665-672, 1995.

PORRAS, M. C. BARRAU, F. T. ARROYO, B. SANTOS, C. BLANCO, AND F. ROMERO. Reduction of *Phytophthora cactorum* in Strawberry Fields by *Trichoderma* spp. and Soil Solarization. Alcalá del Río, Sevilla, Spain : **IFAPA/CIFA**, 2007.

RAUPACH, G.S.; LIU, L.; MURPHY, J.F.; TUZUN, S.; KLOEPPER, J.W. Induced systemic resistance in cucumber and tomato against cucumber mosaic cucumovirus using plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). **Plant Disease** v.80: 891-894, 1997.

REMUSKA, A. C. PRIA, M. D. Efeito de *Bacillus thuringiensis* e *Trichoderma* sp. no crescimento de fungos fitopatogênicos. Publ. UEPG **Ci. Exatas Terra, Ci. Agr. Eng., Ponta Grossa** 13(3): 31-36, 2007.

RESENDE, M. L.; OLIVEIRA, J. A.; GUIMARÃES, R. M.; VON PINHO, R. G.; VIEIRA, A. R. Inoculação de sementes de milho utilizando o *Trichoderma harzianum* como promotor de crescimento. **Ciência e Agrotecnologia** 28: 793-798, 2004.

SAITO, L. R.; SALES, L. L. S. R.; MARTINCKOSKI, L.; ROYER, R.; RAMOS, M. S.; REFFATTI, T. Aspectos dos efeitos do fungo *Trichoderma* spp. no biocontrole de patógenos de culturas agrícolas. **Pesquisa Aplicada e Agrotecnologia** 2 (3), 2009.

SÁNCHEZ, V.; REBOLLEDO, O.; PICASO, R. M.; CÁRDENAS, E.; CÓRDOVA, J.; GONZÁLEZ, O.; SAMUELS, G. J. In vitro antagonism of *Thielaviopsis paradoxa* by *Trichoderma longibrachiatum*. **Mycopathologia** 163 (1): 49-58, 2007.

SANTOS C. C.; OLIVEIRA F. A.; SANTOS M. S.; TALAMINI V.; FERREIRA J.; SANTOS. F. J. Avaliação In vitro da ação antagonista de *Trichoderma* spp. sobre *Thielaviopsis paradoxa*. **Anais do I Seminário de Iniciação Científica e Pós-graduação da Embrapa Tabuleiros Costeiros**, CD-ROOM, Aracaju/SE. 2011.

SANTOS, M. S.; SILVA, G. B.; LUSTOSA, D. C. Avaliação in vitro de *Trichoderma* spp. a diferentes isolados fúngicos da região amazônica. **VI Seminário de Iniciação Científica da UFRA e XII Seminário de Iniciação Científica da EMBRAPA Amazônia Oriental**. 2008.

SILVA, J. C. Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. no controle biológico da queima-da-bainha (*Rhizoctonia solani* Kühn) em arroz (*Oryza sativa* L. **Dissertação (Mestrado em Agronomia)** – Universidade Federal Rural da Amazônia, 2010.

SIQUEIRA, L.A., ARAGÃO, W.M., TUPINAMBÁ, E.A.A Introdução do coqueiro no Brasil, importância histórica e agrônômica. (**Embrapa Tabuleiros Costeiros**. Documentos, 47). 24 p. 2002.

STANGHELLINI, M.E.; MILLER, R.M. Biosurfactantes: their identify and potential efficacy in the biological control of zoosporic plant pathogens. **Plant Disease** 81: 4-10. 1997.

TALAMINI, V.; FERREIRA, J. M. S.; WARWICK, D. R. N.; OLIVEIRA, F. A. Avanços no conhecimento sobre a resinose do coqueiro no Brasil. **Tropical Plant Pathology** 37. **45º Congresso Brasileiro de Fitopatologia** - Manaus, AM (Suplemento), agosto 2012.

THURSTON, H. D. Sustainable practices for plant disease management in traditional farming systems. Boulder: **Westview Press**, 1992.

TREMACOLDI; C. R.; LINS, P. M. P. Inibição do crescimento micelial in vitro de *Thielaviopsis paradoxa* com a utilização de fungicidas sistêmicos e de contato. Belém, PA : **Embrapa Amazônia Oriental**, 2011.

VILAS BOAS, A. M.; PACCOLA MEIRELLES, L.D.; LUNA ALVES LIMA, E. A. Desenvolvimento e aperfeiçoamento de inseticidas biológicos para o controle de pragas. **Arquivos de Biologia e Tecnologia** 35 (4): 749-761, 1992.

WARWICK, D. R. N.; FERREIRA, J. M. S.; PASSOS, E. E. M. Ocorrência de resinose do estipe do coqueiro em Sergipe provocada por *Chalara paradoxa*. **Fitopatologia Brasileira** 29: 171, 2004.

WARWICK, D. R.N.; PASSOS, E.E.M. Ataque de resinose do coqueiro causada por *Thielaviopsis paradoxa* em Sergipe, Brasil. **Tropical Plant Pathology** 34(3), 175-177, 2009.

WARWICK, D.R.N.; COSTA-CARVALHO, R. R.; TALAMINI, V.; CARVALHO, E.A.; JESUS JUNIOR, L.A. Efeito da pasta bordalesa no controle da resinose do coqueiro causada por *Thielaviopsis paradoxa*. 45º Congresso Brasileiro de Fitopatologia - Manaus, AM. **Tropical Plant Pathology** 37 (Suplemento), agosto, 2012.

WEI, G.; KLOEPPER, J.W.; TUZUN, S. Induction of systemic resistance in cucumber to *Colletotrichum orbiculare* by selected strains of plant growth-promoting rhizobacteria. **Phytopathology** 81:1508-1512, 1991.

WIJESINGHE, C. J.; WILSON-WIJERATNAM, R. S.; SAMARASEKARA, J. K. R. R.; WIJESUNDERA, R. L. C. Biological control of *Thielaviopsis paradoxa* on pineapple by an isolate of *Trichoderma asperellum*. **Biological control**, v. 53, p. 285- 290, 2010.

ZHENG, J.; SUTTON, J.C.; YU, H. Interactions among *Pythium aphanidermatum*, roots, rootmucilage, and microbial agents in hydroponic cucumbers. **Canadian Journal of Plant Pathology** 22: 368-379, 2000.

ZHOU, T.; PAULITZ, T.C. In vitro and in vivo effects of *Pseudomonas* spp. on *Pythium aphanidermatum* zoospore behavior in exudates and on the rhizoplane of bacteria treated cucumber roots. **Phytopathology** 83: 872 – 876. 1993.



## CAPITULO 2: ESTUDO DA RESINOSE DO COQUEIRO E SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS PARA O CONTROLE BIOLÓGICO

### RESUMO

A resinose, importante doença em cultivos do coqueiro em todo o mundo, cujo agente etiológico é o fungo *Thielaviopsis paradoxa*, vem sendo disseminada gradativamente em diversos estados brasileiros. Este estudo objetivou estudar a resinose do coqueiro e selecionar microrganismos, oriundos de área de produção de coco, para o controle biológico da doença. Dentre os isolados avaliados quanto à patogenicidade, o isolado de *Thielaviopsis paradoxa* TC.060 quando pulverizado em plantas com ráquis previamente ferida com suspensão de conídios apresentou maior severidade externa e interna no ráquis de coqueiro, após trinta e quatro dias da inoculação do patógeno. Não foram constatadas, relações entre os sintomas internos e externos da doença na ráquis do coqueiro, e ainda comprovou-se que, para ocorrer infecção por *T. paradoxa* em mudas de coqueiro é necessário que haja ferimento no tecido vegetal. Dentre os microrganismos avaliados pelo teste de confrontação direta, 7,3% dos isolados de *Bacillus* spp. foram selecionados como eficientes, com inibição de 68 a 89% do crescimento micelial de *T. paradoxa* e inibição de até 84,75% da esporulação do patógeno por meio da produção de compostos voláteis; e ainda 8,9% dos isolados de *Trichoderma* spp., foram selecionados através da inibição do crescimento micelial e redução de até 87,3% da esporulação do patógeno. O potencial destes isolados para o controle biológico da resinose do coqueiro foram avaliados em dois ensaios através de pulverizações curativas e preventivas, ocorrendo até 100% de controle da doença por meio de pulverizações preventivas.

**Palavras-chave:** Fitopatógenos. Biocontrole. *Cocos nucifera*. *Bacillus* spp. *Trichoderma* spp.

## CHAPTER 2: STUDY OF THE STEM BLEEDING COCONUT AND SELECTION OF MICROORGANISMS FOR BIOLOGICAL CONTROL

### ABSTRACT

The stem bleeding an important worldwide disease in coconut crops, whose etiologic agent is the fungus *Thielaviopsis paradoxa*, has been spread gradually in many Brazilian states. This study aimed at studying the coconut stem bleeding and select microorganisms, derived from coconut palm production area, for the biological disease control. Among the evaluated isolates, concerning the pathogenicity, the isolate of *Thielaviopsis paradoxa* TC.060, when sprayed on plants with previously damaged rachis with spore suspension, presented higher external and internal severity on the coconut palm rachis after thirty-four days of pathogen inoculation. There was not found a relationship between the external and internal disease symptoms on the coconut palm rachis and it was proved that, in order to occur infection by *T. paradoxa* on coconut seedlings, it is necessary to occur damage on vegetable tissues. Among the microorganisms evaluated by direct confrontation test, 7,3% of the *Bacillus* spp. isolates were selected as efficient. There was an inhibition of 68 to 89% of the *T. paradoxa* mycelial growth and up to 84,75% inhibition of the pathogen sporulation through the production of volatile compounds; Besides, 8,9% of the *Trichoderma* spp. isolates were selected through the mycelial growth inhibition and up to 87,3% of pathogen sporulation reduction. The isolates potential for the coconut palm stem bleeding biological control was evaluated in two assays through curative and preventive sprays, and there was up to 100% of disease control through preventive sprays.

**Keywords:** Phytopathogen. Biocontrol. *Cocos nucifera*. *Bacillus* spp. *Trichoderma* spp.

## 1 INTRODUÇÃO

O coqueiro (*Cocos nucifera* L.) é uma palmeira tropical com ampla distribuição geográfica. No Brasil, os principais produtos comercializados são a água e o leite de coco, e coco ralado, enquanto os subprodutos são o óleo e a torta de coco seco (Medeiros, 2010).

O cultivo do coqueiro é de suma importância para as mais diversas regiões de produção, alcançando pequenos, médios e grandes produtores. No Brasil, esta cultura é responsável pela geração de aproximadamente 500.000 empregos diretos e indiretos, ocupando em torno de 290.000 ha, distribuídos em quase 220.000 propriedades (Ferreira, 2007). A área plantada na região norte atinge aproximadamente 24 mil hectares e o Estado do Pará é o 4º maior produtor com 214 mil frutos e produtividade média de 10,13 frutos/ha (IBGE, 2014).

A ocorrência de patógenos em todas as regiões produtoras, e em intensidade variável, é responsável pela redução geral de 50% do potencial produtivo da cocoicultura (Costa et al., 2002; Medeiros, 2010). Dentre as doenças, destaca-se a resinose, cujo agente etiológico é o fungo *Thielaviopsis paradoxa* (de Seynes), anamorfo do ascomiceto *Ceratocystis paradoxa* de Seynes. (Index fungorum, 2014). Esta doença tem apresentado elevada importância nos últimos anos, desde o primeiro relato no Brasil no ano de 2004 (Warwick et al., 2004). O patógeno vem sendo disperso gradualmente, e sua ocorrência já foi registrada nos estados da Bahia, Alagoas, Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte (Ferreira, 2007) e Pará, onde no ano de 2008, no município de Moju, foram descritos os primeiros casos da doença (Tremacoldi e Lins, 2011).

O fungo *T. paradoxa* sobrevive em restos culturais em decomposição e no solo, podendo causar infecção através das raízes, de ferimentos e das fissuras naturais de crescimento do tronco, sob condições favoráveis. Este patógeno pode dispersar-se aderido a insetos, por solo contaminado ou ferramentas usadas na colheita ou na erradicação de plantas doentes e mortas (Ferreira, 2007), sendo um importante patógeno de outras culturas, tais como o dendezeiro ou palma de óleo (Albuquerque, 1979; Carvalho et al., 2011), bananeira (Cordeiro, 2003), cana-de-açúcar (Croft et al., 2000; Chapola, 2010) e abacaxizeiro (Ferrari, 2009).

O principal sintoma da resinose do coqueiro são rachaduras que através das quais exsudam resina marrom-avermelhada, característica que dá nome à doença. Como consequência, as plantas apresentam redução do crescimento foliar e da produtividade, podendo levar a planta à morte com o progresso da doença (Ferreira, 2007).

Pesquisas demonstraram a eficiência de microrganismos biocontroladores sobre o *Thielaviopsis paradoxa*. Em concentrações elevadas (100 e 70%) *Trichoderma polysporum* Rifai. reduziu significativamente o crescimento de *C. paradoxa*, oriundo de sementes germinadas de óleo de palma (Eziashi et al., 2006). Frutos de abacaxi tratados com *Trichoderma asperellum* (Samuels, Lieckfeldt. e Nirenberg) mantiveram-se livres de *T. paradoxa* em concentração de  $1 \times 10^{-5}$  conídios.mL<sup>-1</sup>, ocorrendo completa inibição do crescimento micelial do patógeno (Wijesinghe et al., 2010).

*Bacillus amyloliquefaciens* quando aplicado em banana (*Musa* sp.) reduziu significativamente a incidência de podridão pós-colheita causada por *Thielaviopsis paradoxa*, *Colletotrichum musae* e *Fusarium verticillioides*, quando comparado a frutos que receberam tratamento com fungicidas (Alvindhia e Natsuaki, 2009). *Bacillus pumilus* e *Bacillus subtilis* apresentaram efeitos antagônicos significativos sobre crescimento micelial e germinação de conídios de *T. paradoxa*, agente etiológico da podridão-abacaxi em cana-de-açúcar (Venturini et al., 2014).

Não há fungicidas registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento para controle da resinose (Agrofit, 2014) e trabalhos sobre o manejo integrado da doença são escassos. Para reduzir o progresso da doença, produtores de coco realizam a poda cirúrgica, realizando a retirada da área do estipe com sintomas, seguida de pulverização com produto químico e selamento do ferimento com alcatrão vegetal (Ferreira, 2007).

Diante do exposto, há a necessidade de estudos da doença, bem como prospectar alternativas de controle.

## **2 OBJETIVOS**

O presente trabalho teve por objetivo estudar a resinose do coqueiro, bem como, selecionar microrganismos oriundos de área de produção de coco, para o controle biológico da doença.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os testes “*in vitro*” foram realizados no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Amazônia Oriental e os testes “*in vivo*”, em mudas, em casa-de-vegetação da Universidade Federal Rural da Amazônia e da Embrapa Amazônia Oriental.

#### 3.1 Isolamento do patógeno

Foram coletadas amostras de estipe de plantas sintomáticas, em área de cultivo comercial de coqueiro. As amostras foram identificadas e levadas ao Laboratório de Fitopatologia para o isolamento indireto do patógeno. Os tecidos amostrados foram lavados em água corrente e fragmentados em tamanhos menores de 0,5 a 1,0 cm, na interseção entre tecido lesionado e tecido sadio, caracterizado por coloração amarelo esverdeado. A assepsia foi realizada em álcool a 70% por 30 segundos e em hipoclorito a 20% por 2 minutos. Em seguida, os fragmentos foram plaqueados em meio de cultura Ágar-Água e após o crescimento de colônia fúngica, foi realizada a repicagem para meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA), sendo incubadas a 28 °C. Posteriormente, foram preparadas lâminas para classificação dos isolados por análises morfológicas em microscópio de luz. As colônias de *T. paradoxa* obtidas foram transferidas para tubos de ensaio contendo meio BDA e preservadas em óleo mineral.

#### 3.2 Teste de patogenicidade

Foram utilizados 4 isolados de *T. paradoxa*, sendo 1 oriundo de coqueiro de área de produção em Moju – PA (TC.060), 2 procedentes de coqueiros de região produtora do Nordeste brasileiro (TC.057 e TC.058) e 1 isolado de palma de óleo proveniente de região produtora do Estado do Pará (TD), mais a testemunha, composta de plantas com ferimento, porém não inoculadas. O teste foi realizado em casa-de-vegetação com temperatura média de 28 °C e umidade relativa do ar média de 94%.

Mudas de coqueiro do híbrido PB-123 com 9 meses de idade, foram inoculadas com discos de BDA contendo micélio e conídios do patógeno, crescidos por 7 dias, após ferimento

prévio na base da ráquis. O delineamento experimental utilizado foi blocos ao acaso com 5 repetições (Figura 1).

**Figura 1:** Teste de patogenicidade em mudas de coqueiro previamente feridas e inoculadas com diferentes isolados de *Thielaviopsis paradoxa*.

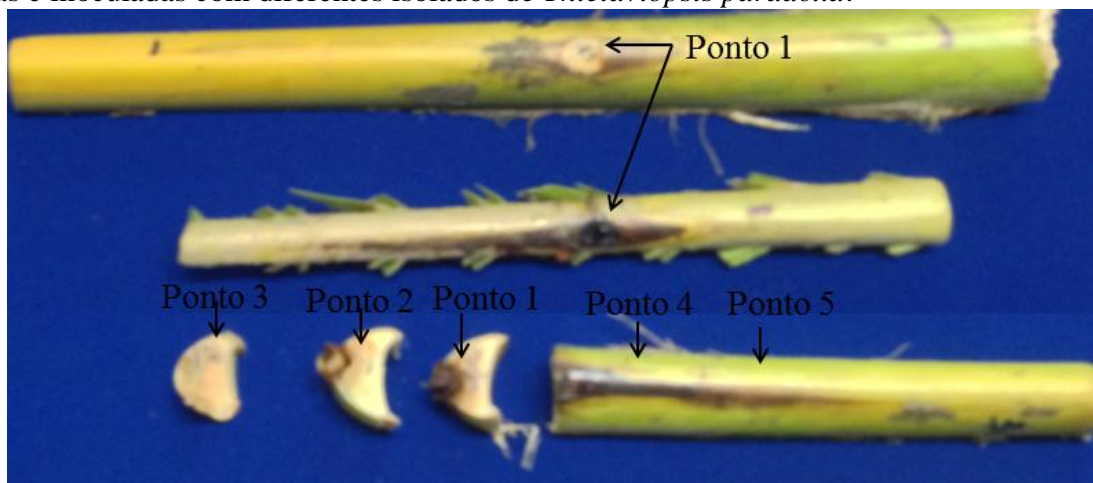


Foram realizadas avaliações diárias dos sintomas juntamente com registros fotográficos. Após 26 dias da inoculação, foram mensurados comprimento e largura da lesão externamente, e em seguida, foi realizado o corte das ráquis para medição da profundidade das lesões nos tecidos em diferentes pontos (ponto 1: local de ferimento e inoculação do patógeno; ponto 2: dois cm abaixo do ponto 1; ponto 3: quatro cm abaixo do ponto 1; ponto 4: dois cm acima do ponto 1; ponto 5: quatro cm acima do ponto 4) (Figura 2).

Os dados de medições de lesões foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade no programa Sisvar®.

O isolado de *Thielaviopsis paradoxa* que apresentou maior severidade da doença foi utilizado em todos os demais testes posteriores neste trabalho.

**Figura 2:** Avaliação da profundidade da lesão em ráquis de mudas de coqueiro previamente feridas e inoculadas com diferentes isolados de *Thielaviopsis paradoxa*.



### 3.3 Métodos de Inoculação

O isolado de *T. paradoxa* que apresentou maior comprimento de lesão no teste de patogenicidade foi utilizado neste ensaio.

Os métodos de inoculação foram avaliados conforme a seguir: M1: discos de meio de cultura BDA contendo micélio e conídios do patógeno inoculados na ráquis com ferimento prévio; M2: M1, porém, sem ferimentos; M3: pulverização de suspensão de conídios, até o ponto de escurimento, na ráquis previamente ferida; M4: M3, porém, sem ferimentos; M5: suspensão de conídios (200 mL) em solo previamente esterilizado; M6: M5, após escarificações no solo visando provocar ferimentos nas raízes. Utilizou-se suspensão de conídios com concentração de  $1 \times 10^7$  conídios. mL<sup>-1</sup>. O local de inoculação foi mantido em câmara úmida por 48 horas, sendo a temperatura média de 28°C e umidade relativa do ar média de 94% em casa-de-vegetação. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 7 tratamentos (6 métodos de isolamento mais tratamento controle pulverizado somente com água) e 4 repetições. A parcela experimental foi constituída por uma muda de coqueiro do híbrido PB-123 com 6 meses de idade.

Foi determinado o Período de Incubação (PI), sendo observado o tempo em dias, decorrido desde a inoculação do patógeno até o aparecimento dos primeiros sintomas da doença (Batista et al., 2009). As avaliações foram realizadas com o início do aparecimento dos sintomas, totalizando 7 avaliações do comprimento e largura da lesão externamente, em

intervalos de 4 dias. Após as avaliações foi realizado o corte das ráquis para mensuração da profundidade das lesões nos tecidos.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade no programa Sisvar®.

### **3.4 Isolamento dos agentes de controle biológico**

Amostras de solo de rizosfera e de raízes de plantas sintomáticas e assintomáticas foram coletadas em área de plantio comercial de coqueiros no Município de Moju - PA e conduzidas ao Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Amazônia Oriental.

#### **Isolados de *Bacillus* spp.**

Para o isolamento de *Bacillus* spp. as amostras de solo obtidas foram processadas de acordo com metodologia para isolamento do gênero (World Health Organization, 1985). As colônias bacterianas obtidas foram caracterizadas por estudos morfológicos e foram submetidas ao teste de Gram, pelo método de Ryu. Os isolados de *Bacillus* spp. selecionados foram preservados em temperatura ambiente em água destilada e esterilizada em duplicatas, para estudos posteriores.

#### **Isolados de *Trichoderma* spp.**

Amostras de raízes coletadas foram lavadas em água corrente e cortadas em tamanhos de 0,3 a 0,5 cm. Em seguida, foram lavados em álcool a 70% por 30 segundos, hipoclorito a 2% por 2 minutos, e lavados em água destilada estéril por duas vezes, secos em papel de filtro estéril e plaqueados em meio de cultura ágar-água. Após dois dias, as colônias crescidas foram transferidas e cultivadas em placas de Petri contendo meio de cultura BDA. Posteriormente, foram preparadas lâminas para observação sob microscópio de luz. Os



isolados de *Trichoderma* spp. obtidos foram preservados em tubos de ensaio contendo meio BDA e após crescimento foi adicionado óleo mineral aos tubos.

### **3.5 Controle “*in vitro*” de *Thielaviopsis paradoxa* por isolados de *Bacillus* spp.**

#### 3.5.1 Confrontação direta

Foi avaliado o controle biológico de *T. paradoxa* pelos isolados de *Bacillus* spp. obtidos de área de cultivo comercial de coqueiro. As bactérias foram incubadas em meio Nutriente-Ágar (NA) por 48 horas aplicando-se o método de estrias paralelas, enquanto as colônias do patógeno foram incubadas por 7 dias em meio BDA. Ambos os microrganismos foram cultivados em câmara de crescimento BOD a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 12 horas.

Foi utilizado o método de pareamento (Mariano, 1993), onde 1 disco de 5 mm de diâmetro da colônia do patógeno foi colocado no centro de placas de Petri contendo meio de cultura BDA e em torno deste disco foi transferida a colônia bacteriana a ser avaliada. Os tratamentos foram: testemunha, que constou apenas de disco de meio de cultura contendo o patógeno, e 109 isolados de *Bacillus* spp. As placas de Petri foram incubadas em câmara de crescimento BOD, a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 12 horas.

A avaliação dos tratamentos foi realizada a cada 24 horas, pela medição do diâmetro da colônia do patógeno, em dois sentidos diametralmente opostos, com um paquímetro. As medições ocorreram até que, o crescimento do patógeno no tratamento controle ocupasse toda a placa de Petri.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 110 tratamentos (109 *Bacillus* spp. + tratamento controle) e quatro repetições. O índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) foi calculado segundo a equação adaptada de Oliveira (1991). As análises estatísticas foram realizadas no programa Sisvar® aplicando-se o teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

3.5.2 Produção de compostos voláteis por *Bacillus* spp. para inibição do crescimento micelial e esporulação de *T. paradoxa*.

Os isolados que apresentaram melhor eficiência no teste de confrontação direta foram avaliados quanto à produção de compostos voláteis. Os testes foram realizados em tampas de placas de Petri, onde em uma das tampas foi vertido o meio NA e riscado a colônia de *Bacillus* spp. e na outra tampa com meio BDA semeou-se 1 disco de meio contendo micélio e conídios de *T. paradoxa* crescido por sete dias. As tampas foram posicionadas uma sobre a outra e seladas. No tratamento testemunha não houve repicagem de *Bacillus* spp. As placas foram mantidas a  $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ , em fotoperíodo de 12 horas.

A avaliação do crescimento micelial foi realizada a cada 24 horas, pela medição do diâmetro da colônia do patógeno, em dois sentidos diametralmente opostos, com um paquímetro. As avaliações ocorreram até que, o crescimento do patógeno no tratamento testemunha ocupasse toda a placa de Petri. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições e 16 tratamentos (15 isolados de *Bacillus* e 1 tratamento controle). O índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) foi calculado segundo a equação adaptada de Oliveira (1991).

Após 72 horas, ao término da medição do crescimento micelial do patógeno, foi realizada a avaliação da esporulação em hemocitômetro, tipo Neubauer, sob microscópio de luz. Para isto, adicionou-se 5 mL de água destilada esterilizada sobre a cultura fúngica para suspensão dos conídios e remoção com uma alça de Drigalsky, para obtenção da suspensão final.

As análises estatísticas foram realizadas no programa Sisvar® aplicando-se o teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

### **3.6 Controle “*in vitro*” de *Thielaviopsis paradoxa* por isolados de *Trichoderma* spp.**

#### **3.6.1 Confrontação Direta**

Foi utilizado o método de pareamento para avaliar o antagonismo direto de diferentes isolados de *Trichoderma* spp. a *T. paradoxa*. Em placas de Petri contendo meio de cultura

BDA, foram colocados em pontos equidistantes, discos de cultura de *T. paradoxa* e de cada um dos isolados de *Trichoderma* spp. avaliados ambos a 1,0 cm de distância da borda da placa e mantidas sob luz contínua a  $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$  em câmaras de crescimento em fotoperíodo de 12 horas. No tratamento controle foi repicado apenas o patógeno.

Foram avaliados 45 isolados de *Trichoderma* spp. obtidos de área de plantio comercial de coqueiro, utilizando-se o critério de Bell et al. (1982), por escala de notas com valores de 1 a 5. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com 4 repetições e 46 tratamentos (45 isolados de *Trichoderma* spp. e tratamento controle). As análises estatísticas foram realizadas no programa Sisvar® aplicando-se o teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

### 3.6.2 Interação de hifas

Os isolados que demonstraram resultados promissores no teste de confrontação direta foram avaliados quanto à interação de hifas. A metodologia empregada foi semelhante ao teste de pareamento, com exceção de que neste, uma lamínula, previamente esterilizada, foi posicionada centralmente, entre as colônias do antagonista e do desafiante. As placas foram mantidas a  $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ , em fotoperíodo de 12 horas até ser observado o crescimento de hifas de ambos os fungos sob a lamínula. Após esse período, as lamínulas foram retiradas, para montagem de lâminas microscópicas em corante azul de bromofenol e azul de algodão e observadas sob microscópio de luz, sendo fotografadas em objetiva de 40 vezes de aumento. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 13 tratamentos (12 isolados de *Trichoderma* e 1 tratamento controle) e 4 repetições.

### 3.6.3 Produção de compostos voláteis por *Trichoderma* spp. para inibição do crescimento micelial e esporulação de *T. paradoxa*.

Os isolados selecionados no teste de confrontação direta foram avaliados quanto à produção de compostos voláteis para inibição do crescimento micelial e esporulação do patógeno. A produção de compostos foi avaliada pela adição de meio BDA em tampas de

placas de Petri, onde na extremidade inferior foi semeado 1 disco de BDA contendo micélio e conídios de *Trichoderma* spp. e na extremidade superior 1 disco de micélio de *T. paradoxa*. As tampas foram posicionadas umas sobre as outras e seladas. No tratamento testemunha, foi realizada a repicagem somente de *T. paradoxa* em uma das tampas. As placas foram mantidas a  $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$  em fotoperíodo de 12 horas.

A avaliação do crescimento micelial foi realizada a cada 24 horas até que o crescimento do patógeno no tratamento testemunha ocupasse toda a placa de Petri. A medição do diâmetro da colônia do patógeno foi realizada em dois sentidos diametralmente opostos, com um paquímetro e o índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) foi calculado segundo equação adaptada de Oliveira (1991).

Para avaliação da produção de conídios por *T. paradoxa*, ao término da medição do crescimento micelial do patógeno foi realizada a adição de 5 mL de água destilada esterilizada por placa e após raspagem com alça de Drigalski. Obteve-se a suspensão para contagem de conídios em hemocitômetro, tipo Neubauer, sob microscópio de luz.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 13 tratamentos (12 isolados e tratamento controle) e quatro repetições. As análises estatísticas foram realizadas no programa Sisvar® aplicando-se o teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

### **3.7 Controle da resinose do coqueiro por isolados de *Bacillus* spp. e *Trichoderma* spp. em casa-de-vegetação.**

Os isolados de *Bacillus* spp. e *Trichoderma* spp. promissores no controle “*in vitro*” de *T. paradoxa* foram avaliados em casa-de-vegetação. As aplicações dos agentes de biocontrole foram estudadas quanto ao efeito preventivo da resinose em mudas de coqueiro. Foram avaliados 8 isolados de *Bacillus* spp. e 4 isolados de *Trichoderma* spp.

Mudas de coqueiro com ráquis previamente ferido foram inoculadas com *T. paradoxa*, sendo utilizado como método de inoculação, a pulverização de suspensão com micélio e conídios do patógeno, de acordo com resultados das avaliações realizadas em ensaio de métodos de inoculação.

Os isolados de *Trichoderma* spp. foram cultivados em meio BDA e a suspensão preparada em concentração de  $1 \times 10^8$  conídios.  $\text{mL}^{-1}$  após 7 dias de incubação em meio BDA. Enquanto os isolados de *Bacillus* spp. foram cultivados em meio NA por 48 horas, a  $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm$

2 e a concentração da suspensão em solução salina foi ajustada em absorbância a 550 nm (A550) igual a 0,1.

A suspensão contendo micélio e conídios de *T. paradoxa* em concentração de  $1 \times 10^6$  conídios. mL<sup>-1</sup> foi realizada com adição de água destilada esterilizada em cultura crescidas por 7 dias e após raspagem com alça de Drigalski foi realizada a contagem de conídios em hemocitômetro, tipo Neubauer, sob microscópio de luz.

A mensuração dos sintomas ocorreu de modo semelhante à mensuração realizada nos ensaios de teste de patogenicidade e métodos de inoculação.

As análises estatísticas foram realizadas no programa Sisvar® aplicando-se o teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

### 3.7.1 Ensaio 1

Em casa-de-vegetação na Universidade Federal Rural da Amazônia com temperatura média de 25°C e umidade relativa do ar de 94% foram realizadas aplicações dos agentes de biocontrole em anão-verde com 7 meses de idade, via pulverização na ráquis e solo, 3 dias antes da inoculação do patógeno.

O delineamento experimental utilizado foi em blocos ao acaso com 13 tratamentos (12 agentes de biocontrole e 1 tratamento controle) e 22 repetições. Plantas do tratamento testemunha foram inoculadas somente com patógeno.

### 3.7.2 Ensaio 2

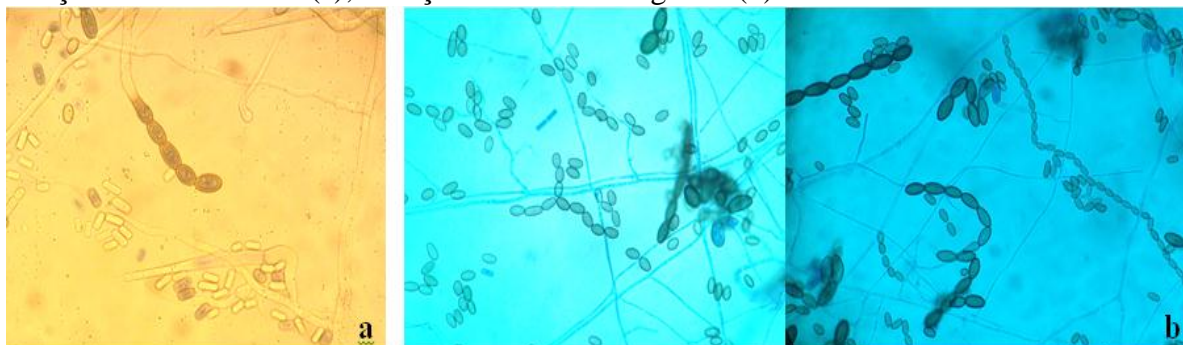
A metodologia utilizada foi semelhante à aplicada no ensaio anterior, com exceção ao período de aplicações dos agentes de biocontrole. O controle biológico foi avaliado em casa-de-vegetação da Embrapa Amazônia Oriental, de forma preventiva com a pulverização dos antagonistas aos 14 e 7 dias antes da inoculação do patógeno.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Isolamento do patógeno

Foram obtidos isolados de *T. paradoxa*: TC.60, oriundo de coqueiros do Estado do Pará; e isolado TD. de plantas de dendezeiro ou palma de óleo (*Elaeis guineensis*) também em área de plantio no Estado do Pará. Estruturas do patógeno foram fotografadas sob microscopia de luz (Figura 3) e as colônias fúngicas preservadas.

**Figura 3:** Micélio e conídios de *Thielaviopsis paradoxa* isolado de estipe de coqueiros sintomáticos em área de plantio comercial no Estado do Pará. Lâminas preparadas em: solução de Bromofenol (a); Solução de Azul de Algodão (b).



### 4.2 Teste de patogenicidade

Os sintomas iniciais da resinose foram observados vinte e nove dias após a inoculação das plantas com 4 diferentes isolados de *T. paradoxa* (TC.060; TC.057; TC.058 e TD). Constataram-se lesões externas na ráquis a partir do ponto de infecção do patógeno. Foram observadas lesões deprimidas de coloração amarronzada, e posteriormente necróticas e exsudação de seiva marrom-avermelhada a partir das lesões (Figura 4).

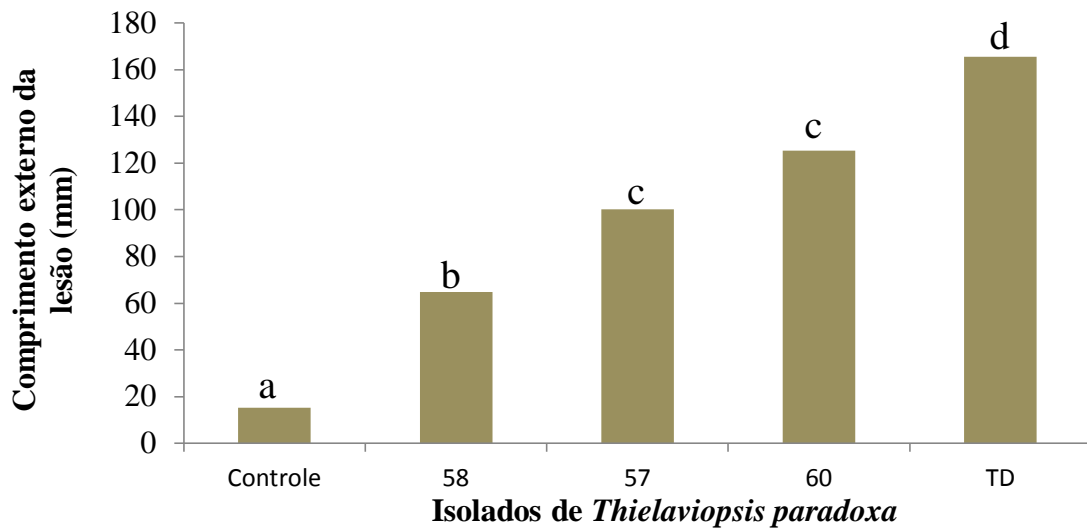
**Figura 4:** Sintomas da resinose em mudas de coqueiro inoculadas com isolados TC.060; TC.057; TC.058 e TD de *Thielaviopsis paradoxa*: Planta com ferimento não inoculada (a); Plantas previamente feridas e inoculadas com o patógeno (b).



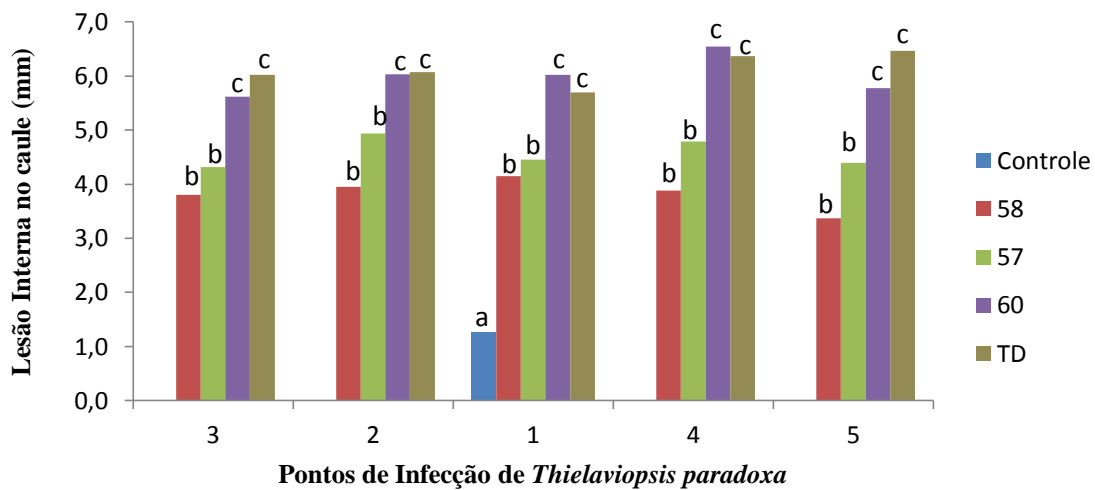
Em teste de patogenicidade realizado no Estado do Ceará, os sintomas externados em mudas de 6 meses de idade, inoculadas com discos de cultura do patógeno, foram manchas na base do caule a partir do ponto de inoculação e secamento foliar com posterior morte das plantas (Freire e Martins, 2010). Por outro lado, a sintomatologia observada neste trabalho, em mudas de 9 meses de idade, inclui manchas e exsudação de seiva, não havendo porém morte das plantas. A avaliação quanto à morte das plantas não foi possível devido à realização de corte das mesmas 30 dias após inoculação, para avaliação interna da doença.

Houve diferença significativa quanto ao comprimento das lesões externas. Todos os isolados testados diferiram estatisticamente do tratamento controle, que apresentou comprimento médio de lesões de 15,29 mm, decorrentes da lesão inicial causada no tecido. Os isolados TD e TC.060 apresentaram maior severidade da doença, com lesões de 165,57 e 125,44 mm, respectivamente, seguidos dos isolados TC.057 (100,17 mm) e TC.058 (64,79 mm) (Figura 5.a). Os resultados evidenciaram que o isolado TD, que diferiu estatisticamente dos demais tratamentos e o isolado TC.060 provenientes de área de plantio da região amazônica foram mais severos quando comparados aos isolados provenientes da região Nordeste brasileira, evidenciando que os isolados de origem não nativa, não se adaptaram às condições climáticas particulares da região amazônica, caracterizado por elevada temperatura e umidade.

**Figura 5:** Teste de patogenicidade em mudas de coqueiro inoculadas com diferentes isolados (TC.057; TC.058; TC.060 e TD) de *Thielaviopsis paradoxa*: Lesão externa na ráquis (a); Lesão interna na ráquis (b). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.



a



b

Houve diferença significativa quando avaliadas as lesões internas em diferentes áreas da ráquis, e todos os isolados diferiram significativamente do tratamento controle, sem a inoculação do patógeno. O tratamento controle apresentou lesão de 1,26 mm, no ponto de infecção “1”, referente ao local de ferimento na ráquis e de inoculação do patógeno, enquanto nos tratamentos inoculados com os isolados TD e TC.060, as lesões foram de 5,69 e 6,02 mm, respectivamente. Dentre os isolados provenientes do coqueiro, o isolado TC.060 foi o que apresentou maior severidade da doença em todos os pontos de infecção, diferindo significativamente dos isolados TC.057 e TC.058. O isolado TD, proveniente de plantas de



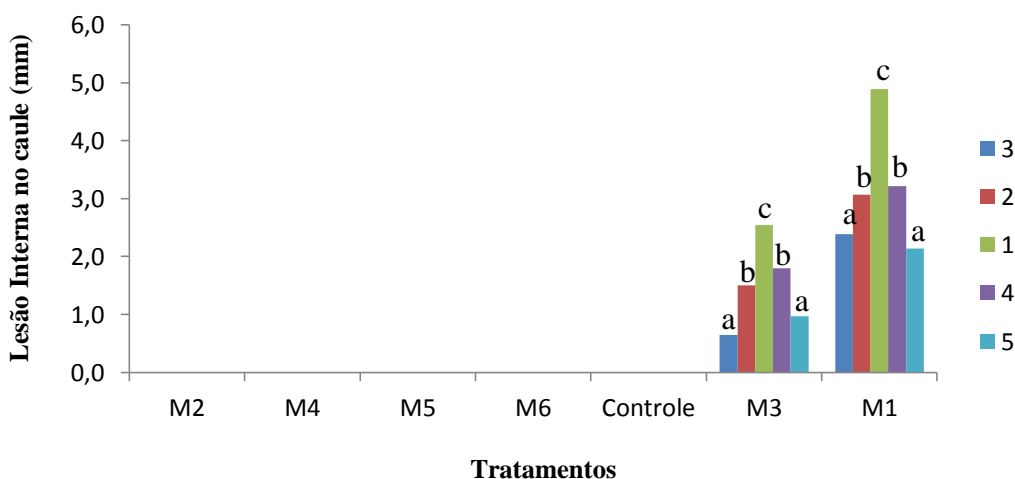
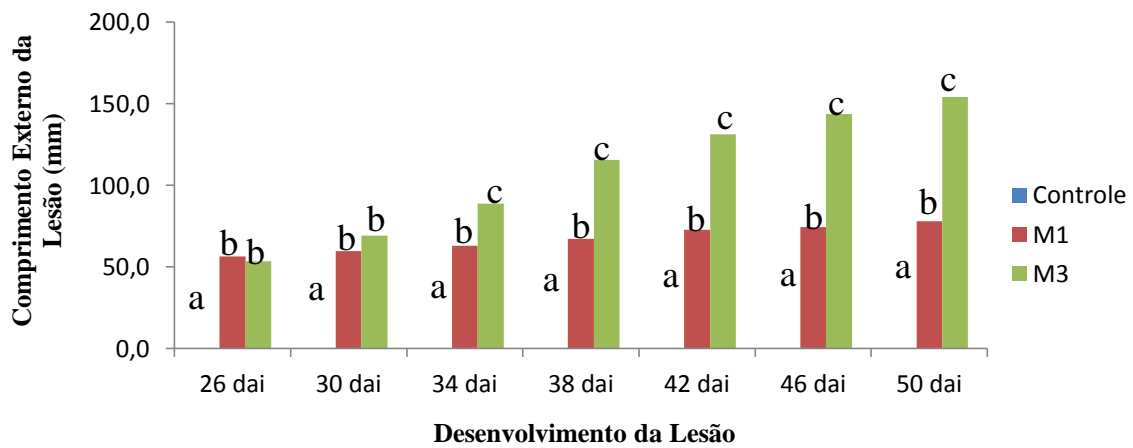
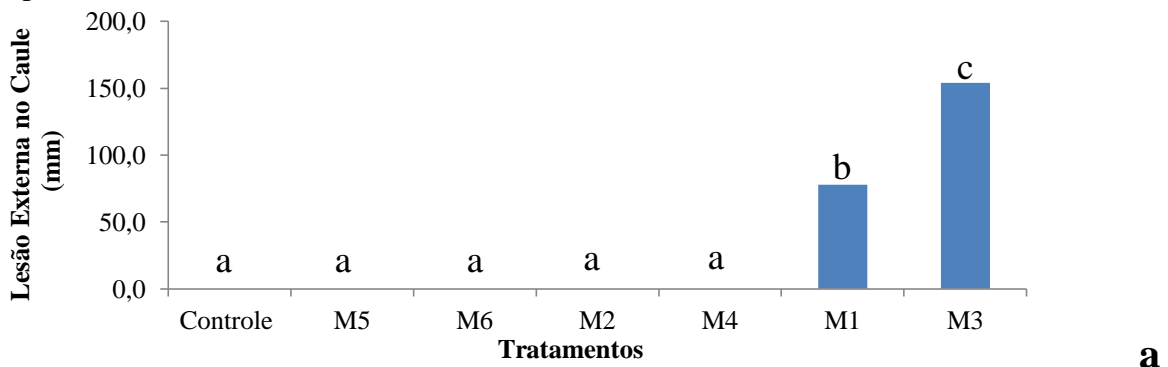
palma de óleo foi tão severo às mudas de coqueiro, quanto o isolado TC.060, não diferindo estatisticamente entre si, em nenhum dos pontos de infecção (Figura 5.b).

O progresso externo e interno das lesões foi maior quando inoculado com os isolados TC.060 e TD, confirmando os danos do patógeno ao tecido do vegetal como dissecação da área infeccionada com presença de extensas manchas amarronzadas de tecidos desintegrados e fibrosos, na região interna do caule (Warwick e Talamini, 2014). É importante ressaltar a patogenicidade do isolado TD., proveniente de plantas de palma de óleo, às mudas de coqueiro avaliadas neste ensaio, demonstrando a potencialidade de inoculações cruzadas e evidência a ampla gama de hospedeiro (Denoyes; Baudry, 1995; Muniz et al., 1998; Furtado et al., 1999; Peres et al., 2002; Bonett et al., 2010), fator de grande preocupação para produtores em áreas onde ocorrem o cultivo de coqueiro e palma de óleo.

#### **4.3 Métodos de Inoculação**

O período de incubação foi de 26 dias. O isolado de *T. paradoxa* TC.060 que apresentou maior severidade dentre os isolados provenientes de coqueiro no teste de patogenicidade, quando inoculado por pulverização de suspensão de conídios na ráquis previamente ferida (M3) e discos de meio BDA (M1) contendo micélio e conídios do patógeno, apresentou sintomas externos da doença após 26 dias da inoculação. Os sintomas foram: lesões necróticas externas na ráquis de coloração amarronzada; lesões internas que progrediram longitudinalmente a partir do ponto de inoculação do patógeno; e exsudação de seiva marrom que se tornou escura ao entrar em contato com ar, diferentemente da resina cristalina observada em exsudações por ferimentos, sem a presença do patógeno. Nos tratamentos M2, M4 e M5, todos sem ferimentos prévios, não houve sintomas da resinose. Não foram observados sintomas em plantas inoculadas via solo, com ou sem escarificações (Figura 6.a).

**Figura 6:** Resinose do coqueiro em plantas inoculadas com diferentes métodos de inoculação: Lesões externas na ráquis (a); Progresso de lesões externas em diferentes dias após inoculação - dai (b). Lesões internas: Pontos de Infecção: 3, 2, 1, 4 e 5 (c). M1: discos de meio de cultura BDA contendo micélio e conídios do patógeno inoculados na ráquis com fermento prévio; M2: discos de meio de cultura BDA contendo micélio e conídios do patógeno inoculados na ráquis, sem fermentos; M3: pulverização de suspensão de conídios na ráquis previamente ferida até o ponto de escorrimento; M4: pulverização de suspensão de conídios na ráquis, sem fermentos, até o ponto de escorrimento; M5: inoculação de suspensão de conídios em solo previamente esterilizado; M6: inoculação de suspensão de conídios em solo, previamente esterilizado, após escarificações no solo. Plantas do tratamento controle não receberam o inóculo do patógeno. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.



a

b

c

O maior comprimento externo de lesão foi observado em plantas pulverizadas com suspensão de conídios em ráquis ferida (M3), com comprimento médio de 153,99 mm de comprimento, diferindo significativamente do tratamento inoculado com discos de micélio e conídios do patógeno (M1) que apresentou comprimento médio de lesões de 77,85 mm de comprimento, superior a todos os outros métodos de inoculação avaliados (Figura 6.a). Os tratamentos M1 e M3 diferiram estatisticamente da testemunha em todas as avaliações realizadas. Após trinta e quatro dias da inoculação do patógeno o tratamento M3 diferiu de todos os outros tratamentos, apresentando maiores valores de comprimento externo das lesões (Figura 6.b).

As lesões internas foram observadas em diferentes regiões da ráquis em plantas inoculadas pelos métodos M1 e M3. O tratamento M1 apresentou maior severidade da doença em todos os pontos de infecção avaliados diferindo estatisticamente dos demais pontos. As maiores lesões foram observadas no ponto de infecção “1”, local de ferimento do tecido. Neste ponto, a lesão mediu 2,55 mm e 4,89 mm nos tratamentos M3 e M1, respectivamente (Figura 6.c).

Os tratamentos M1 e M3 apresentaram resultados inversos quanto ao progresso das lesões interna e externa na ráquis (Figura 6.a e 6.b). Em plantas inoculadas com método M1 as lesões externas foram menores quando comparadas ao método M3, porém as lesões internas foram estatisticamente superiores. Tais informações ratificam que, ainda que os sintomas externos sejam menores na região mais superficial do estipe, a lesão interna pode progredir de dentro para fora nos tecidos (Ferreira, 2007). Não foram constatadas, portanto, relações entre os sintomas internos e externos. O que comprovaram observações de que, em alguns casos, quando os sintomas da resinose são externados, muitas das vezes podem ocorrer maior severidade interna da doença, dificultando ainda mais o controle do patógeno.

O método de inoculação por pulverização de suspensão de conídios proporcionou maior severidade da doença externamente, porém internamente, as maiores lesões ocorreram quando a inoculação foi realizada com disco de meio de cultura contendo o patógeno. Sugere-se que estes resultados devem-se ao fato de que, no método em que ocorre a pulverização na ráquis até o ponto de escorrimento, estruturas do patógeno ficam espalhadas na superfície do estipe e não penetram tanto quanto no caso em que se utilizou disco de meio de cultura, em que a concentração de estruturas do patógeno é maior no local lesionado, causando maior profundidade de lesão.

Este estudo comprovou que, para ocorrer infecção por *T. paradoxa* em mudas de coqueiro é necessário que haja um ferimento no tecido vegetal, o qual permite a penetração,

infecção e reprodução de sintomas da resinose. *T. paradoxa* pode causar infecção através de ferimentos e das fissuras naturais de crescimento do estipe (Nelson, 2005).

#### **4.4 Isolamento dos agentes de controle biológico**

##### **Isolados de *Bacillus* spp.**

Foram obtidos 109 isolados de *Bacillus* spp. oriundos de áreas de plantio comercial de coqueiro com plantas saudáveis e com sintomas da resinose (Tabela 1).

##### **Isolados de *Trichoderma* spp.**

Foram obtidos 45 isolados de *Trichoderma* spp. oriundos de solo de plantio comercial de coqueiro com plantas sintomáticas e assintomáticas no Estado do Pará (Tabela 2).

#### **4.5 Controle “*in vitro*” de *Thielaviopsis paradoxa* por isolados de *Bacillus* spp.**

##### **4.5.1 Confrontação direta**

Dentre os 109 isolados de *Bacillus* spp. avaliados pelo teste de confrontação direta, 24 diferiram significativamente do tratamento controle, sendo 13% o percentual de isolados selecionados como eficientes. Isolados que não diferiram estatisticamente do tratamento controle não foram expostos na Tabela 1. Foram selecionados os isolados que inibiram a partir de 68% do crescimento micelial de *T. paradoxa*, sendo os isolados: B.02; 01; 06; 04; 05; 104; 03; 57; 07; 25; 62; 61; 77 e 106, com destaque ao isolado B.02 e B.01, que inibiram 89,8% e 88,34% do crescimento do patógeno, respectivamente, enquanto o isolado B.106, apresentou taxa de inibição de 68,91%. (Tabela 1). Esta inibição ocorreu provavelmente pela produção de compostos antimicrobianos (Huang e Chang, 1975; Baker et al., 1983; Kupper et al., 2003). Um dos fatores possivelmente envolvidos é o encurtamento de células e forte

engrossamento da parede das hifas do patógeno que ocorre na região de influência dos isolados bacterianos (Kupper et al., 2003). A inibição do crescimento do patógeno pode ser atribuída a competição por espaço, nutrientes, indução de resistência (Ongena et al., 2005) ou produção de enzimas, como quitinase e  $\beta$ -1,3 - glucanase (Idriss et al., 2002), além da pontencial produção de peptídeos antimicrobianos como a Gramicidina S, o Iturin A e a Fengycin (Liu et al., 2005; Deleu et al., 2005; Layton et al., 2011).

Tabela 1: Teste de confrontação direta de *Thielaviopsis paradoxa* após 72 horas com isolados de *Bacillus* spp.

Isolado de <i>Bacillus</i>	Diâmetro da colônia (mm)		Percentual de Inibição (%)	Origem dos isolados
B.02	9,17	a	89,81	Aracaju - SE
B.01	10,49	a	88,34	Aracaju-SE
B.06	19,31	b	78,54	Moju-PA
B.04	21,02	b	76,64	Moju-PA
B.05	21,07	b	76,58	Moju-PA
B.104	21,49	b	76,12	Moju-PA
B.03	22,40	b	75,11	Moju-PA
B.57	25,08	c	72,13	Moju-PA
B.07	25,22	c	71,98	Moju-PA
B.25	25,74	c	69,18	Moju-PA
B.62	27,84	d	69,07	Moju-PA
B.61	27,91	d	68,99	Moju-PA
B.77	27,96	d	68,93	Moju-PA
B.106	27,98	d	68,91	Moju-PA
B.54	34,71	e	61,44	Moju-PA
B.29	39,73	f	55,85	Moju-PA
B.11	46,03	g	48,85	Moju-PA
B.27	48,34	g	46,29	Moju-PA
B.12	51,24	h	43,07	Moju-PA
B.72	54,96	h	38,93	Moju-PA
B.20	59,32	i	34,11	Moju-PA
B.28	61,15	j	32,05	Moju-PA
B.22	62,40	j	30,67	Moju-PA
B.23	68,91	k	23,43	Moju-PA
B.09	80,40	l	10,67	Moju-PA
Controle	90,00	l	0,0	Moju-PA

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade

Cepas de *Bacillus pumilus* e *Bacillus thuringiensis* inibiram *in vitro* o crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz., agente etiológico da antracnose em frutos de manga, com percentual de 88,87% e 80,07%, respectivamente (Zheng et al., 2013). Em avaliação como antagonista aos fungos *Fusarium moniliforme* (J. Sheld.), *Exserohilum turcicum* (Pass.), *Acremonium strictum* (W. Gams) e *Colletotrichum sublineola* (Henn.),

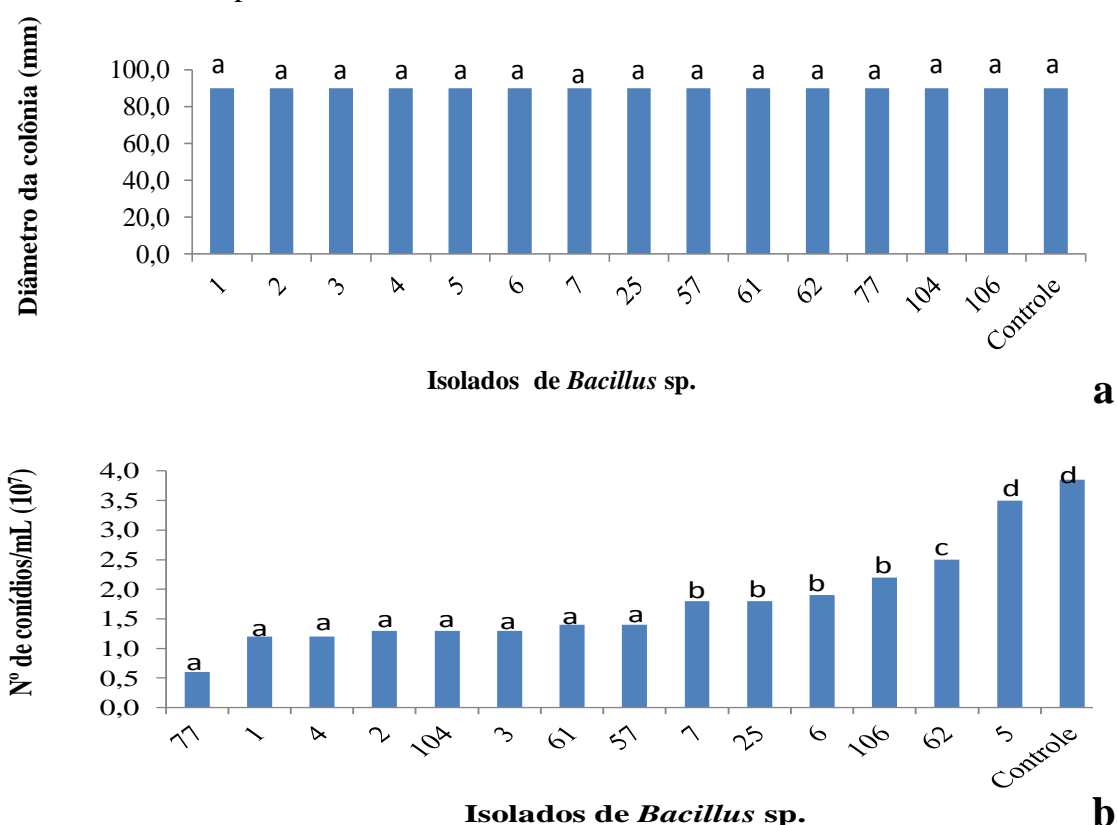
patógenos da cultura do milho (*Zea mays* L.) e do sorgo (*Sorghum bicolor* L.), isolado de *Bacillus* sp. CNPMS-22 apresentou atividade antagonista *in vitro*, impedindo o crescimento micelial destes fitopatógenos (Figueiredo et al., 2010). O crescimento micelial de *Curvularia* sp. e de *Pyricularia grisea* (Sacc.), agentes etiológicos da mancha do grão e da brusone do arroz, respectivamente, foram inibidos em até 80% aos 11 dias de avaliação (Tejera et al., 2012). Cepas de *Bacillus* spp. isoladas a partir de rizosfera foram capazes de gerar efeito antagonico sobre o crescimento e desenvolvimento de *Fusarium oxysporum* e *Fusarium solani* causador da murcha em plantas ornamentais de *Zantedeschia* spp. (Spreng) (Venegas et al., 2005).

Ainda que os resultados promissores de antagonismo obtidos *in vitro* não sejam garantia de eficiência no campo, essa eficácia constitui-se em prognóstico e indicativo, quanto à sua viabilidade no controle do fitopatógeno sob condições naturais de infecção (Moreira, 2013), sendo desta forma, necessária a avaliação destes isolados *in vivo*.

#### 4.5.2 Produção de compostos voláteis por *Bacillus* spp. para inibição do crescimento micelial e esporulação de *T. paradoxa*

Todos os isolados de *Bacillus* spp. diferiram significativamente do tratamento controle quanto à produção de conídios, com exceção do isolado B.05. O patógeno em ausência do antagonista apresentou concentração de conídios de  $3,8 \times 10^7$  conídios. mL<sup>-1</sup>, enquanto na presença dos isolados B.77; B.01; B.04; B.02; B.104; B.03; B.61 e B.57, a concentração de conídios do patógeno foi de 0,6; 1,2; 1,2; 1,3; 1,3; 1,3; 1,4 e  $1,4 \times 10^7$  conídios.mL<sup>-1</sup>, respectivamente. A maior taxa de inibição foi de 84,75%, proporcionada pelo isolado B.77, enquanto em presença do isolado B.62, ainda que tenha diferido significativamente do tratamento controle, esta taxa foi de 34,68% (Figura 7.b). Nenhum dos isolados de *Bacillus* spp. reduziu o crescimento micelial de *T. paradoxa* por produção de compostos voláteis, não diferindo estatisticamente do tratamento controle (Figura 7.a).

**Figura 7:** Produção de compostos voláteis por isolados de *Bacillus* spp. Inibição do crescimento micelial de *Thielaviopsis paradoxa* (a). Inibição da esporulação de *Thielaviopsis paradoxa* (b). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.



O efeito inibitório destes isolados pode estar relacionado com vários mecanismos antagonistas, tais como, produção de quitinase, sideróforos, ácido cianídrico, antibióticos produção de amônia,  $\beta$ -1,3 - glucanase e ácido salicílico (Litty, 2011), e ainda com a produção de metabólitos secundários, como surfactina (Asaka e Shoda, 1996). Em avaliação do potencial de controle de compostos voláteis produzidos por *B. subtilis* e *B. amyloliquefaciens*, foi verificada redução significativa na produção de conídios de *Penicillium crustosum* Thom. (Arrebola et al., 2009). Moore-Landeker e Stotzy (1972) verificaram redução de 66 e 53% na produção de conídios por *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* (Snyder e Hansen) e *Penicillium viridicatum* (Westling), por compostos voláteis produzidos por *Agrobacterium radiobacter*. Em estudos realizados para observação da inibição do crescimento de *Rhizoctonia solani* (Kuhn) por estirpe de *Bacillus subtilis*, foi observado a presença de lipopetídeos como iturin e surfactina (Yu et al., 2002).

Este estudo evidenciou o potencial dos isolados 1, 2, 3, 4, 57, 61, 77, 104 de *Bacillus* spp. como antagonista de *T. Paradoxa*, porém estudos como a identificação dos mecanismos que potencializam tais antagonistas é de suma importância.

#### 4.6 Controle “*in vitro*” de *Thielaviopsis paradoxa* por isolados de *Trichoderma* spp.

##### 4.6.1 Confrontação Direta

Dentre 45 isolados de *Trichoderma* spp. obtidos em área de plantio comercial de coqueiro, 44 isolados diferiram estatisticamente do tratamento testemunha. Os isolados 20 e 30 apresentaram maior redução de crescimento micelial do patógeno com nota 1 aos 14 dias de avaliação, de acordo com Bell et al., (1982). Os isolados 37, 11, 43 e 25 apresentaram nota 3, ocupando aproximadamente 50% da superfície do meio, não sendo considerado com elevada eficiência no controle do patógeno (Tabela 2).

**Tabela 2:** Testes de Confrontação Direta de *Thielaviopsis paradoxa* após 14 dias com isolados de *Trichoderma* spp.

Isolados de <i>Trichoderma</i> spp.	Crescimento micelial de <i>Thielaviopsis paradoxa</i> <sup>(1)</sup>
T.20	1,00 a
T.30	1,00 a
T.07	1,37 a
T.02	1,50 a
T.03	1,50 a
T.29	1,50 a
T.06	1,50 a
T.09	1,50 a
T.39	1,50 a
T.10	1,50 a
T.41	1,50 a
T.01	1,62 a
T.08	1,62 a
T.17	1,75 a
T.14	1,75 a
T.22	1,75 a
T.40	1,75 a
T.16	1,75 a
T.33	1,75 a
T.15	1,87 a
T.31	5,00 c
Controle	5,00 c

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. <sup>(1)</sup> Escala Bell et al (1982): Nota 1: *Trichoderma* cresce sobre o patógeno e ocupa toda a superfície do meio; Nota 2: *Trichoderma* cresce sobre pelo menos 2/3 da superfície do meio; Nota 3: *Trichoderma* ocupam aproximadamente metade da superfície do meio; Nota 4: *Trichoderma* cresce sobre 1/3 da superfície do meio; Nota 5: *Trichoderma* não cresce e o patógeno ocupa toda a superfície da placa;



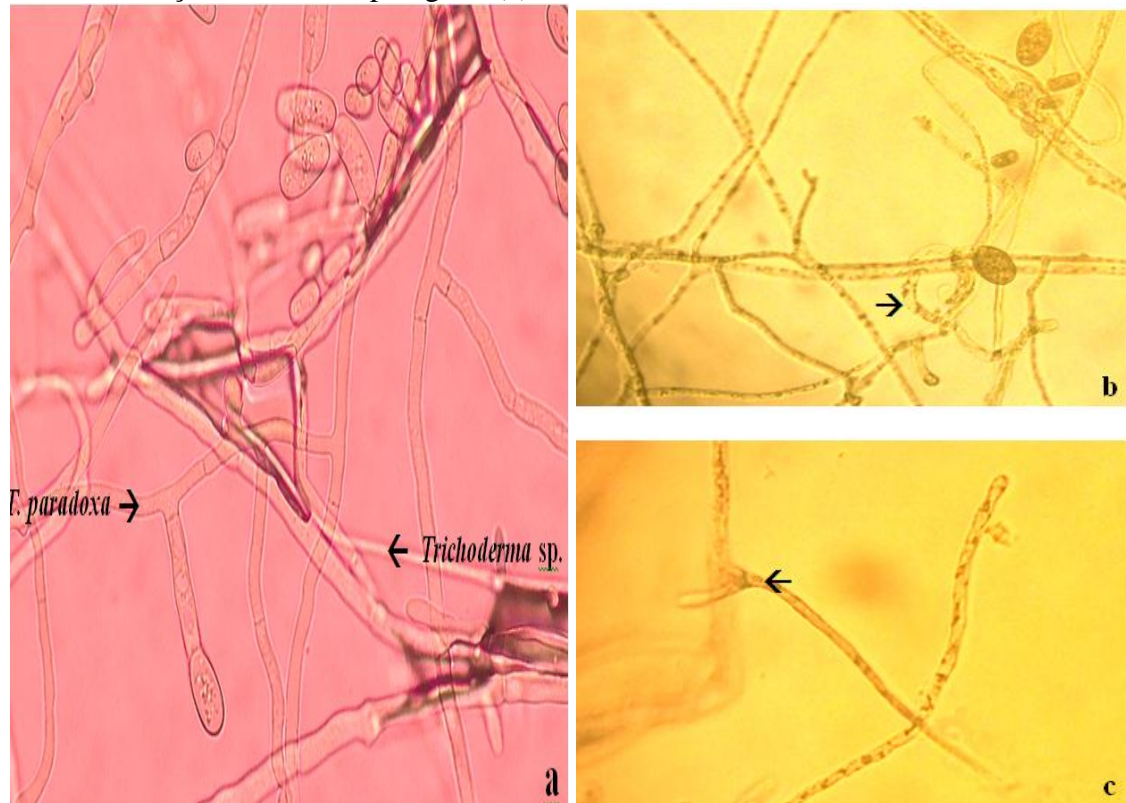
Foram selecionados para testes posteriores os isolados 20, 30, 07, 02, 03, 29, 06, 09, 39, 10 e 41 que ocuparam a partir de 2/3 da placa de Petri. Os isolados que obtiveram notas 2 ou 3 não foram expostos na Tabela 2. Estes resultados evidenciaram a eficiência do gênero *Trichoderma* no controle de *T. paradoxa*, demonstrando a ocorrência de competição entre os microrganismos confrontados. *Trichoderma* spp. compete principalmente por nutrientes, espaço e oxigênio, colonizando rapidamente o substrato, impedindo-o de ser colonizado por outro microrganismo (Bettiol, 1991; Baker e Dickman, 1993, Ethur, 2006).

Isolados de *Trichoderma harzianum* (Rifai) foram eficientes em inibir o crescimento micelial de *Alternaria solani* (Ellis e Martin) e *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. em condições controladas (Chowdappa et al., 2013). Resultados semelhantes foram observados quando isolados de *Trichoderma* sp. reduziram de 42 a 57% do crescimento micelial de *Sclerotium rolfisii* Sacc. agente etiológico da podridão do colo em plantas de feijão caupi (Santos, 2010). De acordo com Dubey et al. (2007), as espécies *Trichoderma viride* e *Trichoderma harzianum* apresentaram potencial de inibição do crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* f. sp. ciceris, patógeno de plantas de grão de bico (*Cicer arietinum* L.).

#### 4.6.2 Interação de hifas

Foi observado diferentes formas de parasitismo, como crescimento paralelo de hifas de ambos os fungos (Figura 8.a), enrolamento de hifas do antagonista em torno de hifas do patógeno (Figura 8.b) e formação de estruturas semelhantes a ganchos que crescem em direção às hifas do patógeno (Figura 8.c), indicando o parasitismo dos isolados de *Trichoderma* spp. estudados no controle do patógeno.

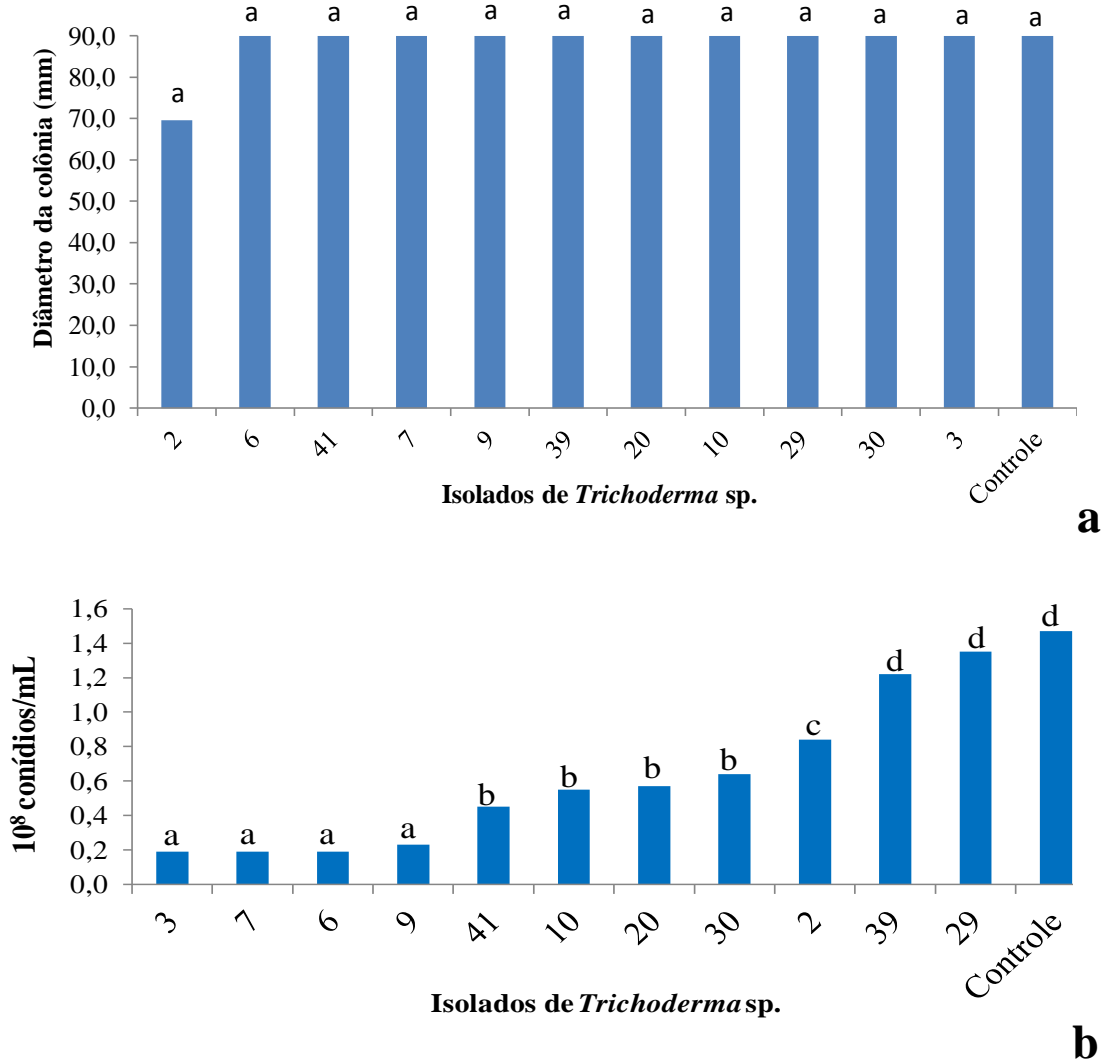
**Figura 8:** Interação de hifas entre isolados de *Trichoderma* spp. e *Thielaviopsis paradoxa*. Crescimento paralelo de hifas de ambos os fungos (a); enrolamento de hifas do antagonista em torno de hifas do patógeno (b) e formação de estruturas semelhantes a ganchos que crescem em direção às hifas do patógeno (c).



4.6.3 Produção de compostos voláteis por *Trichoderma* spp. para inibição do crescimento micelial e esporulação de *T. paradoxa*.

Nenhum dos isolados de *Trichoderma* spp. avaliados controlou o crescimento micelial de *T. paradoxa* pela produção de compostos voláteis (Figura 9.a). Porém para os valores de esporulação do patógeno, com exceção dos isolados 39 e 29, todos os tratamentos diferiram estatisticamente do tratamento controle. O patógeno quando em presença dos isolados de *Trichoderma* spp. T.03, 07, 06, 09 apresentou menores valores de esporulação: 0,2; 0,2; 0,2 e 0,23  $\times 10^8$  conídios.mL<sup>-1</sup>, respectivamente, enquanto o tratamento controle apresentou concentração de 1,47  $\times 10^8$  conídios.mL<sup>-1</sup> (Figura 9.b).

**Figura 9.** Produção de compostos voláteis por isolados de *Trichoderma* spp. na inibição do Crescimento micelial de *Thielaviopsis paradoxa* (a). Esporulação de *Thielaviopsis paradoxa* (b). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.



Fungos do gênero *Trichoderma* são capazes de produzir metabólitos voláteis com efeito inibitório sobre o crescimento micelial de vários fitopatógenos (Dennis e Webster, 1971a, 1971b, 1971c; Silva, 2010). Entre tais metabólitos, há gases como: etileno e cianeto de hidrogênio (Campbell, 1990), acetaldeído, acetona, etanol e dióxido de carbono (Tamimi e Hutchinson, 1975; Silva, 2010), que afetam o crescimento microbiano. Esses gases são ativos em baixas concentrações, mas não são considerados como antibióticos. O CO<sub>2</sub> e a amônia são

substâncias voláteis produzidas por antagonistas que podem ser estimulante ou inibitória, enquanto o etileno não é inibitório, porém facilita a formação de derivados inibidores, como o alil-álcool (Mangenot e Diem, 1979). De acordo com Lobo Júnior e Abreu (2000), o potencial inibitório dos metabólitos voláteis ocorre devido à maior facilidade de difusão no ambiente ou solo, por meio de poros ou filmes d'água, podendo atingir patógenos presentes neste ambiente (Silva, 2010).

Em estudo do controle da antracnose em frutos de goiaba, os compostos voláteis 2-metil-1-butanol produzidos por *Saccharomyces cerevisiae* Meyen., inibiram em 100% a esporulação de *C. gloesporioides* Penz., diferindo significativamente da testemunha (Rezende, 2010). Enquanto que, os compostos voláteis dimetil dissulfeto, dimetil trissulfeto e acetofenona produzidos por *Streptomyces globisporus* inibiram a esporulação de *Penicillium italicum* Wehmer. em frutos de laranja (Li et al., 2010).

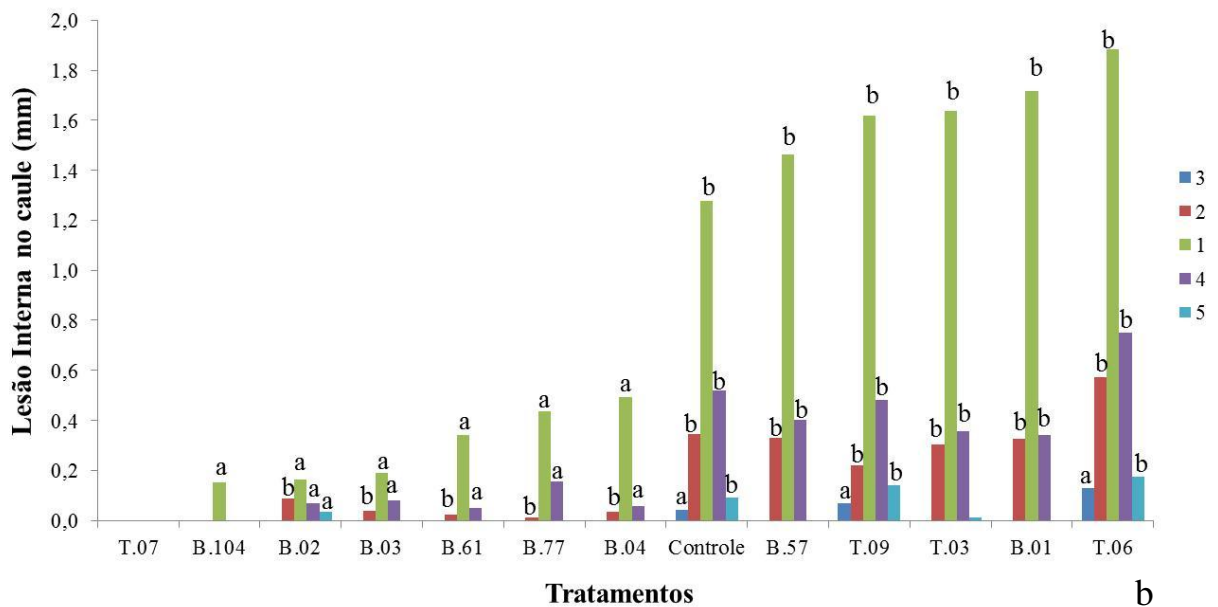
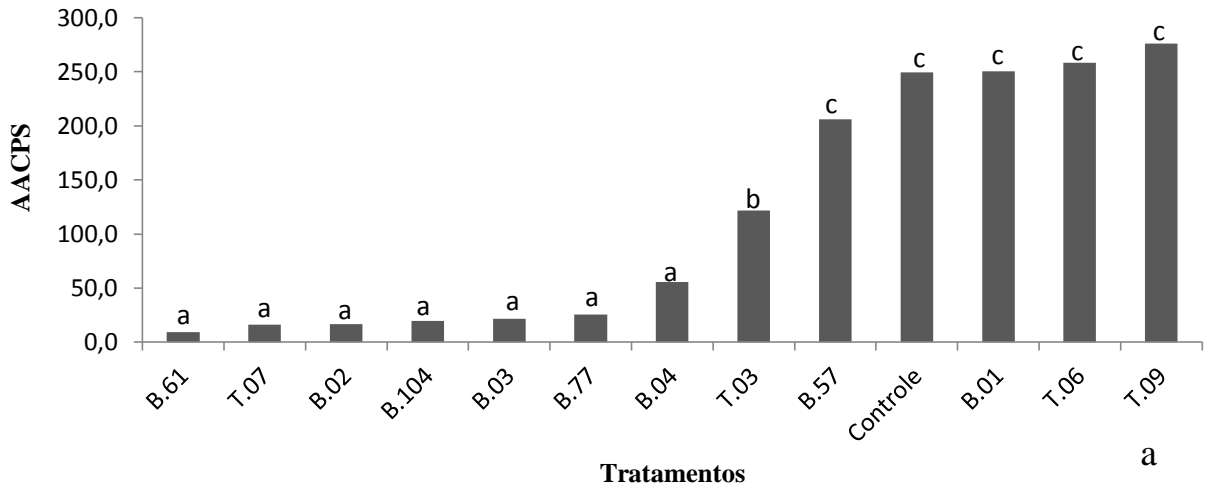
Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram-se satisfatórios para a inibição da produção de conídios, porém torna-se necessário a confirmação da eficiência dos isolados em ensaios *in vivo* em casa de vegetação.

#### **4.7 Controle da resinose do coqueiro por isolados de *Bacillus* spp. e *Trichoderma* spp. em casa-de-vegetação.**

##### 4.7.1 Ensaio 1

O período de incubação da doença foi de 29 dias na testemunha não tratada com os potenciais agentes de controle biológico. Dentre os isolados antagonistas avaliados no controle da resinose, 66,6% reduziram o comprimento de lesões externas em relação ao tratamento controle. O isolado B.61 proporcionou menores valores de severidade com lesões que apresentaram comprimento médio de 9,51 mm de comprimento, seguido dos isolados T.07; B.02; B.104; B.03; B.77; B.04 e T.03 com comprimento médio de lesão de 16,14; 16,46; 19,59; 21,87; 25,50; 55,66; 121,54 mm, respectivamente. Enquanto o tratamento controle apresentou comprimento médio de lesões de 249,22 mm. A eficiência de controle da severidade da doença do isolado B.61 foi de 96,19% e do isolado T.07 de 93,52% (Figura 10.a).

**Figura 10.** Área Abaixo da Curva de Progresso da Severidade (AACPS) da resinose do coqueiro mensurada pelo comprimento de lesão em mudas com 7 meses de idade tratadas com isolados de *Bacillus* spp. e *Trichoderma* spp. Ensaio 1. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.



Plantas tratadas com o isolado de *Trichoderma* T.07 não apresentaram lesões internas no ráquis, e plantas tratadas com *Bacillus* 104 apresentaram lesões internas somente no local de inoculação. Os maiores comprimento de lesões internas ocorreram no local de infecção do patógeno (ponto 1), e em plantas tratadas com os isolados B.02, B.03, B.61, B.77, e B.04 o comprimento de lesões internas diferiu significativamente dos demais tratamentos (Figura 10.b).

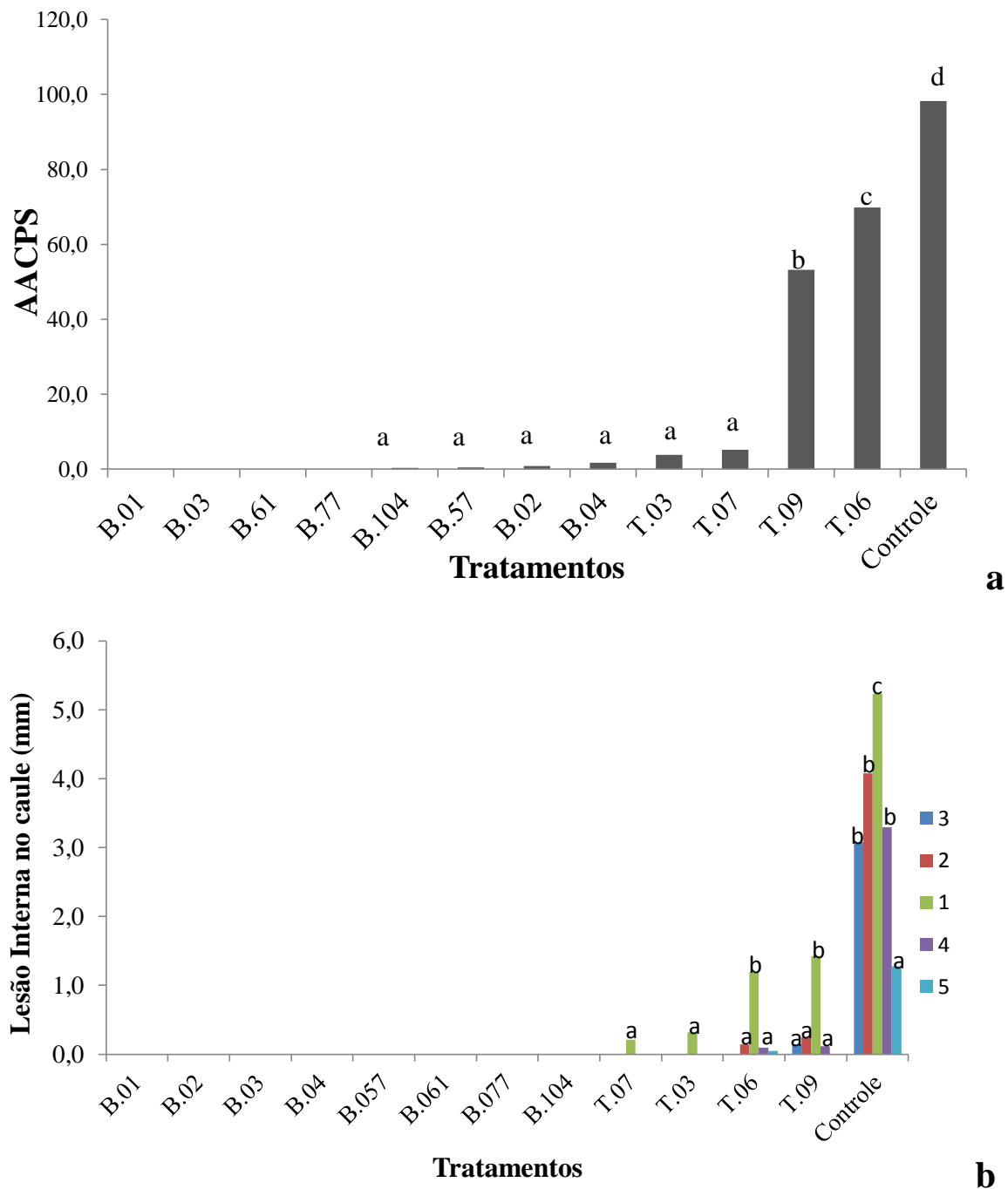
Estirpe nativa de *B. subtilis*, isolada de solo de cultivo de milho, diminuiu significativamente em 47,6% a incidência de sintomas do carvão-da-espiga *Sporisorium reilianum* (Kühn), aumentando ainda a produtividade da cultura (Mercado-Flores et al., 2014). Assim como isolados de *B. pumilus* e *B. thuringiensis*, quando avaliados *in vivo*, inibiram em 94,28% e 87,06% a antracnose em frutos de manga *C. gloeosporioides* (Penz.) (Zheng et al., 2013). Cepas de *Bacillus* spp. foram selecionadas como eficazes no controle das doenças em pepino, cujos agentes etiológicos são os fungos *F.oxysporum* f. sp. *cucumerinum* e *R. solani*, em casa de vegetação (Ying et al., 2014). De acordo com Srinivasulu et al.( 2002), isolados de *T. viride* e *T. harzianum* inibiram 45,47% e 36,10%, respectivamente, os sintomas de podridão basal do estipe (*Ganoderma wilt*) em plantas de coqueiro. Além do potencial biocontrolador a indução de resistência sistêmica por antagonista pode ser considerada como mais um mecanismo pelo qual plantas utilizam para se defender contra o ataque de patógenos (Van Loon et al., 1998).

Os resultados do presente trabalho apresentaram isolados de *Bacillus* e *Trichoderma* como potenciais agentes de biocontrole da resinose, quando aplicados de forma preventiva na ráquis de plantas de coqueiro, podendo reduzir a severidade da doença.

#### 4.7.2 Ensaio 2

Todos os isolados avaliados diferiram significativamente do tratamento controle proporcionando redução da Área Abaixo da Curva de Progresso da Severidade (AACPS) da resinose. Plantas tratadas com os isolados T.06 e T.09 apresentaram maior progresso da doença quando comparadas a plantas tratadas por outros isolados. Não ocorreu desenvolvimento das lesões na parte externa do ráquis em plantas tratadas com os isolados de *Bacillus* spp. B.01, B.03, B.61 e B.77, B.104 e B.57, indicando 100% de eficiência de controle da resinose, seguidos por 99%, 98%, 96%, 95%, 46% e 29% de controle em plantas tratadas com os isolados B.02, B.04, T.03, T.07, T.09 e T.06, respectivamente (Figura 11.a). No controle da queda prematura de frutos cítricos e da mancha preta dos citros, isolados de *Bacillus* spp. apresentaram-se mais eficientes do que isolados de *Trichoderma* spp. (Kupper, 2009).

**Figura 11.** Área Abaixo da Curva de Progresso da Severidade (AACPS) da resinose do coqueiro em mudas com 7 meses de idade tratadas com diferentes isolados de *Bacillus* spp. e *Trichoderma* spp. Ensaio 2. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.



Os valores da AACPS neste ensaio foram menores quando comparados aos valores do 1º ensaio. Estes resultados demonstraram a elevada eficiência do controle biológico quando aplicado de forma preventiva repetidas vezes, uma vez que, a aplicação dos antagonistas

ocorreu aos 14 e 7 dias antes da aplicação patógeno. A aplicação antecipada garante aos antagonistas uma vantagem adaptativa de colonização, aumenta o favorecimento por competição por espaço e nutrientes, possibilita inibição da germinação de conídios do patógeno, parasitismo e lise de estruturas do patógeno e ainda indução de resistência no vegetal (Beattie e Lindow, 1995; Silva e Bettiol, 2009). Em estudo da severidade da queimada-bainha do arroz, cujo agente etiológico é o fungo *Rhizoctonia solani*, agentes de biocontrole apresentaram menor Área Sob Curva de Progresso da doença (ASCPD) aplicados de maneira preventiva, com eficiência relativa de 64,51% (SILVA, 2010).

Não foram observadas lesões internas no ráquis das mudas de coqueiro em plantas tratadas com isolados de *Bacillus* spp. Em plantas tratadas com isolados de *Trichoderma* spp., os maiores comprimentos de lesões ocorreram somente no ponto de infecção do patógeno (1), enquanto que, em plantas sem tratamento, ocorreu lesão do tecido em todos os pontos de infecção avaliados. Ainda que, os isolados de *Trichoderma* spp. tenham apresentado lesão interna, os isolados T.07 e T.03 apresentaram menores valores de lesão no ponto de infecção (1) diferindo estatisticamente dos demais isolados de *Trichoderma* spp. e tratamento controle. (Figura 11.b). Da mesma forma, o desenvolvimento de lesão interna foi menor quando comparado com o ensaio anterior, evidenciando o potencial biocontrolador dos agentes testados quando aplicados aos 14 e 7 dias antes da infecção pelo patógeno.

Testes como estes são de suma importância na busca e seleção por agentes de biocontrole. Estes resultados demonstraram 100% de eficiência de microrganismos no controle biológico da resinose do coqueiro, quando pulverizados preventivamente no ráquis de plantas, dificultando o estabelecimento do patógeno.



## 5 CONCLUSÕES

- Isolado TC.060 de *T. paradoxa* oriundo de plantas de coqueiro apresentou significativa severidade da doença em plantas de coqueiro quando comparadas ao tratamento controle sem a presença do patógeno;
- Plantas com ferimento na ráquis inoculadas com pulverização de micélio e conídios do patógeno apresentaram maior severidade da resinose quando comparadas à plantas inoculadas com disco de micélio e conídios;
- Isolados de *Bacillus* spp. e *Trichoderma* spp. quando confrontados com *Thielaviopsis paradoxa* reduziram o crescimento micelial do patógeno, além de produzirem metabólitos voláteis capazes de inibir a esporulação de *T. paradoxa*;
- Isolados de *Bacillus* spp. e *Trichoderma* spp. apresentaram potencial para o controle da resinose do coqueiro, quando aplicados preventivamente à inoculação do patógeno.

## 6 REFERÊNCIAS

- AGROFIT. Desenvolvido pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Apresenta informações sobre produtos fitossanitários. 2014. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/agrofit>. Acesso em: 20 de agosto de 2014.
- ALBURQUEQUE, C.; CARDOSO. ARAGÃO, W. M. A cultura do coqueiro. **Embrapa Tabuleiros Costeiros**. Sistemas de produção. 1979. Versão eletrônica. Novembro 2007.
- ALVINDIA, D. G.; NATSUAKI, K. T. Biocontrol activities of *Bacillus amyloliquefaciens* DGA14 isolated from banana fruit surface against banana crown rot-causing pathogens. **Crop Protection** 28: 236 – 242, 2009.
- ARREBOLA, E.; SIVAKUMAR, D.; KORSTEN, L. Effect of volatile compounds produced by *Bacillus strains* on postharvest decay in citrus. **Biological Control**, volume e pagina, 2009.
- ASAKA O.; SHODA, M. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* Damping-Off of Tomato with *Bacillus subtilis* RB14. **Appl. Environ. Microb.**: 4081-4085, 1996.
- BAKER, J.C., STAVELY, J.R., THOMAS, C.A., SASSER, M. e Mac MACFALL, J.S. Inhibitory effect of *Bacillus subtilis* on *Uromyces phaseoli* and on development of rust pustules on bean leaves. **Phytopathology** 73:1148-1152, 1983.
- BAKER, R.; DICKMAN, M.B. Biological control with fungi. In: METTING JR; F.B. (Ed.) Soil Microbial Ecology: applications in agricultural and environmental management. **New York: Dekker** volume: 275-305, 1993.
- BATISTA, P. F.; PEIXOTO, A. R.; SILVA, M. A. NETO, I. S. L.; PAZ, C. D. Hospedeiros alternativos de *Alternaria cucumerina*. **Revista Verde** 4 (4): 162-167, 2009.
- BEATTIE, G. A.; LINDOW, E. E. The secret life of foliar bacterial pathogens on leaves. **Annual Review of Phytopathology** 33: 145-172, 1995
- BELL, D.K., WELLS, H.D.; MARKHAM, C. R. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. **Phytopathology**. 72(4):379-382, 1982.
- BETTIOL, W. Componentes do controle biológico de doenças de plantas. In: BETTIOL, W. (Org.) Controle biológico de doenças de plantas. **Boletim Técnico. Brasília: EMBRAPA**, n.5: 1 - 5, 1991.
- BONETT, L. P.; ALMEIDA, M.; GONÇALVES, R. G. A.; AQUINO, T. F.; WENZEL, J.B. Caracterização morfo-cultural e infecção cruzada de *Colletotrichum gloesporioides* agente causal da antracnose de frutos e hortaliças em pós-colheita. **Ambiência Guarapuava** 6 (3): 451-463, 2010.
- CAMPBELL, C.L.; MADDEN, L. V. Introduction to plant disease epidemiology. **New York: John Willey** volume : 532, 1990.

CARVALHO, E.A.; COELHO, I.L.; TREMACOLDI, C.R.; GOMES JÚNIOR, R.A. Fungos associados ao híbrido interespecífico da palma de óleo no estado do Pará. **Tropical Plant Pathology** 36: 1174, 2011.

CHAPOLA, R. G. Controle da Podridão Abacaxi da cana-de-açúcar por meio da pulverização de fungicidas em mudas no sulco de plantio. **Dissertação de Mestrado. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**, 2010.

CHOWDAPPA, P.; MOHAN KUMAR, S.P.; JYOTHI LAKSHMI, M.; UPRETI, K.K. Growth stimulation and induction of systemic resistance in tomato against early and late blight by *Bacillus subtilis* OTPB1 or *Trichoderma harzianum* OTPB3. **Biological Control** 65 (1): 109 – 117, 2013.

CORDEIRO, Z. J. M. Sistema de produção de banana para o Estado do Pará. Sistema de Produção, 9. **Embrapa Mandioca e Fruticultura**. Jan., 2003. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Banana/BananaPara/doencas.htm#fungicas>. Acesso em 06 de junho, 2013.

COSTA, J.L.S; OLIVEIRA, V.C.; VIANA, F.M.P.; LEAL, E.C.; WARWICK, D.R.N. Aprimoramento do conhecimento científico e desenvolvimento de tecnologias para o controle das principais doenças do coqueiro. Aracaju, **Embrapa Tabuleiros Costeiros**, p. 121, 2002.

CROFT, B.; MAGAREY, R.; WHITTLE, P. Disease management. In: HOGARTH, D. M.; ALLSOPP, P. G. (Ed.). Manual of canegrowing. Brisbane: **Bureau of Sugar Experiment Stations**, volume : 263-289, 2000.

DELEU M, PAQUOT M, NYLANDER T. Fengycin interaction with lipid monolayers at the air-aqueous interface-implications for the effect of fengycin on biological membranes. **J Colloid Interface Sci** 2: 358–365, 2005. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15721905>.

DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma*. 1- Production of non volatile metabolites. **Transactions of the British Mycological Society** 57, 1971a.

DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma*. 2- Production of volatile metabolites. **Transactions of the British Mycological Society** 57, 1971b.

DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma*. 3- Hiphal Interaction. **Transactions of the British Mycological Society** v.57, 1971c.

DENOYES, B.; BAUDRY, A. Species identification and pathogenicity study of French *Colletotrichum* strains isolated from strawberry using morphological and cultural characteristics. **Phytopathology** 85: 53-57, 1995.

DUBEY, S. C.; SURESH, M.; SINGH, B. Evaluation of *Trichoderma* species against *Fusarium oxysporum* f. sp. ciceris for integrated management of chickpea wilt. **Biological Control** 40: 118–127, 2007.

ETHUR, L. Z. Dinâmica populacional e ação de *Trichoderma* no controle de fusariose em mudas de tomateiro e pepineiro. **Tese (Doutorado)** – Universidade Federal de Santa Maria-RS, 155, 2006.

EZIASHI E.I., UMA N.U., ADEKUNLE A.A., AIREDE C.C. Effects of metabolites produced by *Trichoderma* species against *Ceratocystis paradoxa* in culture medium. **African Journal Biotechnology** 5: 703-706, 2006.

FERRARI, J.T. Podridão Negra do Abacaxi. Divulgação Técnica. **Instituto Biológico, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Vegetal** 71 (n.1): 49 - 51, 2009.

FERREIRA, J.M.S. Resinose do coqueiro-Como identificar e Manejar. Aracaju: **Embrapa Tabuleiros**, p. 127, 2007.

FIGUEIREDO J. E. F.; TEIXEIRA, M. A.; LIMA, G. V. C.; BRESSAN, W.; PINTO, N. F. J.; CASELA, C. R. Atividade antagonista *in vitro* de *Bacillus subtilis* contra fungos fitopatogênicos do milho e sorgo. **XXVIII Congresso Nacional de Milho e Sorgo**, Goiânia: Associação Brasileira de Milho e Sorgo. p. 667-673, 2010.

FREIRE, S.C.O.; MARTINS, M.V.V. Confirmação da ocorrência do sangramento do caule do coqueiro no Estado do Ceará. **Essentia Sobral** 12: 31-39, 2010.

FURTADO, E. L.; BACH, E.B.; BACH, E. B.; KIMATI, H.; MENTEN, J.O.M.; SILVEIRA, A.P. Caracterização morfológica, patogênica e isoenzimática de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* de seringueira. **Summa Phytopathologica** 25: 222.227, 1999.

HUANG, T.; CHANG, M. Studies on xanthobacidin, a new antibiotic from *Bacillus subtilis* active against *Xanthomonas*. **Botanical Bulletin Academia Sinica** 16:137-148, 1975.

IDRISS EE, MAKAREWICZ O, FAROUK A, ROSNER K, GREINER R, BOCHOW H. Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plant-growth-promoting effect. **Microbiology** 148: 2097-2109, 2002.

INDEX FUNGORUM. Disponível em <http://www.indexfungorum.org/NamesRecord>. Acesso em 03/01/2014

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo Agropecuário (2014); Pesquisa Agrícola. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/homeestatistica/indicadores/agropecuaria/1spa/default>. Acesso em 20 jan de 2014.

KUPPER, K. C. Controle biológico de doenças de flores e frutos jovens de citros. In: Bettiol, W. e Morandi, M. a. b. Biocontrole de doenças de plantas: Uso e perspectivas. Jaguariúna: **Embrapa Meio Ambiente**, p. 289-298, 2009.

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

LAYTON, C.; MALDONADO, E.; MONROY, L.; CORRALES, L.C.; SÁNCHEZ, L. C. *Bacillus* spp.; perspectiva de su efecto biocontrolador mediante antibiosis en cultivos afectados por fitopatógenos. **NOVA Publicación en ciências biomédicas** 9 (16), 2011.

LI, Q.; NING P.; ZHENG, L.; HUANG, J.; LI, G.; HSIANG, T. Fumigant activity of volatiles or *Streptomyces globisporus* JK gainst *Penicillium italicum* on Citrus microcarpa. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.58, p. 157-165, 2010.

LITTY; T.; MURALI, G.; CHANDRAMOHANAN, R.; ALKA, G.; PRIYA, G.; GEORGE T. V. Antagonistic activity of coconut rhizospheric and endophytic *Bacillus* against *Ganoderma applanatum* and *Thielaviopsis paradoxa*. **Epidemiological and vector studies of coconut root (wilt) disease** 39: 92, 2011.

LIU J, LIU M, WANG J, YAO JM, PAN RR, YU ZL. Enhancement of the *Gibberella zeae* growth inhibitory lipopeptides from a *Bacillus subtilis* mutant by ion beam implantation. **Appl Microbiol Biotechnol** 69 (2): 223 – 228, 2005. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15838674>.

LOBO JUNIOR, M.; ABREU, M.S. Inibição do crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* por metabólitos voláteis produzidos por alguns antagonistas em diferentes temperaturas e ph's. **Ciênc. Agrotec.** 24 (2), 2000.

MANGENOT, F.; DIEM, H.G. Fundamentals of biological control. In: KRUPA, S.V.; DOMMERGUES, Y. R. (Eds.). **Ecology of root pathogens, volume** 207-215, 1979.

MARIANO, R.L.R. Métodos de seleção *in vitro* para o controle microbiológico de patógenos de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas** 1: 369-409, 1993.

MEDEIROS, R.D. Análise do arranjo espacial e determinação da estrutura de focos da resinose coqueiro (*Cocos nucifera* L.) na região de Neópolis. **Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas)**. Núcleo de Pós-Graduação e Estudos em Recursos Naturais, Universidade Federal de Sergipe, 2010.

MERCADO-FLORES, Y.; I.O. CÁRDENAS-ÁLVAREZ, A.V. ROJAS-OLVERA, J.P. PÉREZ-CAMARILLO, S.G. LEYVA-MIR, M.A. ANDUCHO-REYES. Application of *Bacillus subtilis* in the biological control of the phytopathogenic fungus *Sporisorium reilianum*. **Biological Control** 76: 36-40, 2014.

MOORE-LANDECKER, E.; STOTZKY, E. Inhibition of fungal growth and sporulation by volatile metabolites from bacteria. **Canadian Journal of Microbiology** 18: 957-962, 1972.

MOREIRA, R. G. *Bacillus* spp. e *Pseudomonas* sp. no biocontrole de *Colletotrichum* do grupo *acutatum*, causador da mancha foliar de *Glomerella* em macieira. **Dissertação de Mestrado** (Pós-Graduação em Agronomia). Universidade Federal do Paraná. p. 80. 2013.

MUNIZ, M. F. S.; SANTOS, R. C. R. BARBOSA, G. V. S. Patogenicidade de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* sobre algumas plantas frutíferas. **Summa Phytopathologica** 24: 177-179, 1998.

NELSON, S. Stem bleeding of coconut palm. Plant Disease. Cooperative Extension Service, College of Tropical Agriculture and Human Resources. **University of Hawaii at Manoa**. 2005. Disponível em <http://www.ctahr.hawaii.edu/freepubs/pdf/PD-30.pdf2005>. Acesso em: 10 abr. 2013.

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.). **Dissertação de Mestrado em Agronomia**. Universidade Federal de Lavras, 111 f. 1991.

ONGENA M, DUBY F, JOURDAN E, BEAUDRY T, JADIN V, DOMMES J, THO-NART P. *Bacillus subtilis* M4 decreases plant susceptibility towards fungal pathogens by increasing host resistance associated with differential gene expression. **Appl Microbiol Biotechnol**. Vol. 67 (5): 692-698, 2005. Acesso em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15578181>. Janeiro 2015.

PERES, N. A. R.; KURAMAE, E. E.; DIAS, M. S. C.; SOUZA, N. L. Identification and characterization of *Colletotrichum* spp. Affecting fruit after harvest in Brazil. **Journal of Phytopathology** 150: 128-134, 2002.

REZENDE. D. C. Efeito de compostos orgânicos voláteis a partir de *Saccharomyces cerevisiae* sobre *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum acutatum* e no controle de antracnose em goiaba. **Dissertação de Mestrado**. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. 2010.

SANTOS, I. P. S. Controle alternativo da podridão radicular (*Sclerotium rolfsii* Sacc.) em feijão-caupi *Vigna unguiculata* (L.) Walp. (Fabaceae). **Dissertação de mestrado em Agronomia: Produção Vegetal**. Universidade Federal de Alagoas. Centro de Ciências Agrárias. Inaura Patricia da Silva Santos, 2010.

SILVA, H. S. A; BETTIOL, W. Microrganismos endofíticos como agentes de biocontrole da Ferrugem do cafeeiro e de promoção de crescimento. In: Bettiol, W. e Morandi, M. a. b. Biocontrole de doenças de plantas: Uso e perspectivas. Jaguariúna: **Embrapa Meio Ambiente**, p. 277-287. 2009.

SILVA, J. C. Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. no controle biológico da queima-da-bainha (*Rhizoctonia solani* Kühn) em arroz (*Oryza sativa* L.)./ Joseani Castro da Silva. – Belém, 2010. **Dissertação (Mestrado em Agronomia)** – Universidade Federal Rural da Amazônia, 2010.

SRINIVASULU, B.; ARUNA, K.; LAKSHMI, K. M.; SABITHA DORAISWAMY; RAO, D.V. R.; HAMEEDKHAN, H. *Trichoderma hamatum* – A potential biocontrol agent for basal stem rot (*Ganoderma wilt*) disease of coconut. **Proceedings of Placrosym** 15: 541-544, 2002.

TAMIMI, K. M.; HUTCHINSON, S. A. Differences between the biological effects of culture gases from several species of *Trichoderma*. Transactions of the British. **Mycological Society** 64, 1975.

TEJERA, B.; HEYDRICH, M.; ROJAS, M. M. Antagonismo de *Bacillus* spp. frente a hongos fitopatogênicos del cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). **Rev Protección Veg** 27 (2): 117 – 122. 2012.



TREMACOLDI, C. R.; LINS, P. M. P. Inibição do crescimento micelial in vitro de *Thielaviopsis paradoxa* com a utilização de fungicidas sistêmicos e de contato. Belém, PA : **Embrapa Amazônia Oriental**, 2011.

VAN LOON, L. C.; BAKKER, P. A. H. M.; PIETERESE, C. M. J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual Review of Phytopathology** 36: 453 - 483, 1998.

VENEGAS E, CIAMPI L., COLLADO L., COSTA M., FUENTES R., NISSEN J., SCHOBITZ R., SCHOBITZ M. Aislamiento e identificación de bacterias nativas del género bacillus cohnantagonistas de cepas patógenas de fusarium. **Agro sur**. 33 (2): 1 – 12, 2005. Disponible:<http://mingaonline.uach.cl/scielo>. Acesso outubro de 2014.

VENTURINI, G.; BRANDI, F. BETTIOL, W. Inibição do crescimento micelial e da germinação de esporos de *Thielaviopsis paradoxa* por *Bacillus subtilis* e *Bacillus pumilus*. **Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica**, 8. Instituto Agrônômico, 2014.

WARWICK, D. R. N.; FERREIRA, J. M. S.; PASSOS, E. E. M. Ocorrência de resinose do estipe do coqueiro em Sergipe provocada por *Chalara paradoxa*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v.29, p.171 (suplemento), 2004.

WARWICK, D. R. N.; TALAMINI, V. Resinose. **Embrapa Tabuleiros Costeiros**. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/coco/arvore/html>. Acesso em: 04 out de 2014.

WIJESINGHE, C. J.; WILSON WIJERATNAM, R. S. SAMARASEKARA, J. K. R. R.; WIJESUNDERA, R.L.C. Biological control of *Thielaviopsis paradoxa* on pineapple by an isolate of *Trichoderma asperellum*. **Biological Control** 53, issue 3: Theory and application in pest management. 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Informal consultation on the development of *Bacillus sphaericus* as a microbial larvicide. Geneva: UNDP/World Bank/WHO 1985. 24 p. Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR).

YING, L.; DAOLIN, D.; CHUNCAN, S.; QINGSONG, Z.; ZHIGUO, L.; PINGPING L. Potential biocontrol *Bacillus* sp. strains isolated by an improved method from vinegar waste compost exhibit antibiosis against fungal pathogens and promote growth of cucumbers. **Biological Control** 71: 7 – 15, 2014.

YU, G.Y.; SINCLAIR, J.B.; HARTMAN, G.L.; BERTAGNOLLI, B.L. Production of iturine by *A Bacillus amylolequefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*. **Soil. Biol. Biochem.** 34: 955 – 63, 2002.

ZHENG, M.; SHI, J.; SHI, J.; WANG, Q.; LI, Y. Antimicrobial effects of volatiles produced by two antagonistic *Bacillus* strains on the anthracnose pathogen in postharvest mangos. **Biological Control** 65, Issue 2: 200-206, 2013.

### **CAPÍTULO 3: MECANISMOS DE AÇÃO DE ISOLADOS DE *Bacillus* spp. E *Trichoderma* spp. NO CONTROLE BIOLÓGICO DE *Thielaviopsis paradoxa***

#### **RESUMO**

Microrganismos biocontroladores podem ser capazes de produção enzimática e compostos orgânicos voláteis (VOCs) que atuam na supressão de fitopatógenos. Este trabalho teve por objetivo realizar o estudo dos mecanismos de ação por isolados de *Bacillus* spp. e *Trichoderma* spp. promissores no controle da resinose do coqueiro. A caracterização enzimática foi realizada em meios de cultura específicos para produção de quitinase, protease e glucanase. A produção de quitinase foi positiva para os isolados de *Bacillus* spp. B.01 e B.02 e produção de  $\beta$ -1,3 glucanase foi observada apenas pelo B.57. Todos os isolados de *Bacillus* sp. avaliados apresentaram produção de protease. Os isolados de *Trichoderma* spp. não apresentaram atividade enzimática. Os perfis voláteis analisados por GC-MS identificaram 16 VOCs potenciais no biocontrole de doenças em plantas, tais como, dióxido de carbono, 2-propanona, etanol, ácido acético, fenol, benzeno, benzaldeído, 2-etil-hexanol. Os isolados B.01, B.02 e B. 04 produziram maior quantidade de VOCs quando comparado com os demais isolados. Os compostos benzaldeído, fenol e 2-etil-hexano foram produzidos por todos os isolados de *Bacillus* spp. 2-nonanona e 2-decanona foram produzidos exclusivamente por B.01 e B.02. Este estudo demonstrou que isolados de *Bacillus* spp. avaliados produzem compostos voláteis com potencial antifúngicos, bem como apresentam atividade enzimática eficiente em degradar a parede celular de *T. paradoxa*.

**Palavras-chave:** Compostos voláteis. Enzimas. Antagonistas. Patógeno. Doença.



### CHAPTER 3: MECHANISMS OF ACTION OF ISOLATED FROM *Bacillus* spp. AND *Trichoderma* spp. IN CONTROL OF BIOLOGICAL *Thielaviopsis paradoxa*

#### ABSTRACT

Biocontroller organisms may be able to produce by via enzymatic volatile organic compounds (VOCs), that works in the suppression of plant pathogens. This work aimed to carry out the study of the mechanisms of action of *Bacillus* spp. and *Trichoderma* spp., promising the control of the stem bleeding in coconuts. The enzyme characterization was carried out, in specific culture media for production of chitinase, glucanase and protease. The production of chitinase was positive for *Bacillus* spp. and B.01 B.02, the production of  $\beta$ -1,3-glucanase was observed only at B.57. All isolates of *Bacillus* sp. assessed had protease production. The *Trichoderma* spp. showed no enzymatic activity. The volatiles profiles analyzed by GC-MS indentified 16 potential biocontrollers VOCs related on plants diseases, such as carbon dioxide, 2-propanone, ethanol, acetic acid, phenol, benzene, benzaldehyde, 2-ethylhexanol. The isolated B.01, B.02 and B. 04 produced the highest amount of VOCs when compared with the other strains. The compounds benzaldehyde, phenol and 2-ethyl-hexane were produced by *Bacillus* spp. 2 cyclononanone and 2-decanone were produced exclusively by B.01 and B.02. This study demonstrated that isolates of *Bacillus* spp. assessed to produce VOC's with antifungal potential and present efficient enzymatic activity to degrade the cell wall of *T. paradoxa*.

**Keywords:** Volatile compounds. Enzymes. Antagonists; Pathogen; Disease.

## 1 INTRODUÇÃO

O coqueiro (*Cocos nucifera* L.) constitui-se importante cultura perene na geração de renda, alimentação em diversos países. O continente asiático é o maior produtor mundial de coco com 84% da produção, seguido do continente americano com 8,2%. A Indonésia destaca-se como maior país produtor, com produção de 17,50 milhões de toneladas e o Brasil figura como o 4º maior produtor mundial, com 2,94 milhões de toneladas de coco (FAO, 2014). No Brasil, as regiões Nordeste e Norte apresentam maior área plantada, respectivamente, apresentando elevado potencial socioeconômico (IBGE, 2014).

Entretanto, o cultivo do coqueiro pode ser afetado por diversos problemas fitossanitários que podem causar o depauperamento de plantios e baixa produtividade (Ferreira et al., 1998; Medeiros e Mesquita, 2014).

A resinose do coqueiro, cujo agente etiológico é o fungo *Thielaviopsis paradoxa* (de Seynes), anamorfo do ascomiceto *Ceratocystis paradoxa* (Index fungorum, 2014) ocorre com elevada incidência em diferentes regiões no Brasil e no mundo. A partir de sua primeira ocorrência no Estado de Sergipe, no nordeste brasileiro, no ano de 2004 (Warwick et al., 2004) o patógeno vem sendo disperso para outros estados e regiões brasileiras (Ferreira, 2007), comprometendo a sanidade dos cultivos, produtividade e qualidade dos frutos, e consequentemente, danos econômicos. Ao causar infecção através das raízes, de ferimentos e fissuras naturais de crescimento do estipe, o principal sintoma é a exsudação de seiva a partir das rachaduras no estipe das plantas, a qual se torna escura ao entrar em contato com ar. Ocorre ainda consequentemente redução do crescimento vegetativo, comprometimento da produtividade e, com o progresso da doença, até a morte da planta (Ferreira, 2007).

O controle biológico por microrganismos antagonistas pode ser uma alternativa aos fungicidas no controle de doenças (Govender et al., 2005). Gêneros tais como, *Bacillus* e *Trichoderma* são utilizados em uma vasta gama de plantas cultivadas como agentes de biocontrole de diferentes patógenos (Chowdappa et al., 2013). *Bacillus* spp. (Jager et al., 2001) e fungos como *Trichoderma harzianum* (Vivekananthan et al., 2004) são microrganismos citados como eficazes no controle de doenças como a antracnose em mangueiras (Zheng et al., 2013).

Além da ação por parasitismo, competição por nutrientes, antibiose, indução de resistência, os microrganismos biocontroladores podem ser capazes de produzir compostos orgânicos voláteis (VOCs) que atuam na supressão de fitopatógenos. Os compostos

orgânicos produzidos por microorganismos podem ser quimicamente agrupados em ésteres, álcoois, alcanos, alcenos, alcinos, ácidos orgânicos, cetonas, terpenóides, aldeídos e persulfuretos (Corcuff et al., 2001; Dilantha et al., 2005; Wan et al., 2008; Zheng et al., 2013). Na literatura há relatos de bactérias de solo que podem produzir compostos orgânicos voláteis capazes de controlar diversos fungos fitopatogênicos como *Aspergillus fumigatus*, *Geotrichum candidum*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Botrytis cinerea* e *Verticillium dahliae* (Ren et al., 2010; Zheng et al., 2013).

A produção de enzimas tais como quitinase, protease e  $\beta$ -1,3-glucanase por antagonistas pode potencializar a ação sobre agentes patogênicos. A atividade de enzimas como quitinase e  $\beta$ -1,3-glucanase faz parte do mecanismo de defesa da planta contra infecção por fitopatógenos (Cota et al., 2007), dependendo do progresso da doença. O potencial de 26 isolados bacterianos foi observado pela produção de enzimas degradantes da parede celular de fitopatógenos, dentre as quais 7% produziram protease, 3%  $\beta$ -1,3-glucanase e 1% quitinase (Chaiharn e Lumyong, 2009). Bactérias selecionadas como promissoras no controle da brusone em folhas de arroz (*Magnaphorte oryzae*) apresentaram atividade enzimática de glucanase e quitinase (Moraes, 2010).

São escassas as técnicas eficientes para o controle da resinose do coqueiro e não há fungicidas registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento para controle da doença (Agrofit, 2014). Sendo assim, a busca por estratégias de controle da doença se faz necessária. Em meio a tal necessidade, o controle biológico, por meio de agentes de biocontrole figura como uma alternativa viável, contudo, é de suma importância conhecer os mecanismos utilizados por agentes de biocontrole para compor o manejo integrado da doença.

## 2 OBJETIVO

Este trabalho teve por objetivo realizar o estudo dos mecanismos de ação de isolados de *Bacillus* spp. e *Trichoderma* spp. selecionados como promissores no controle biológico da resinose do coqueiro.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Isolados de *Bacillus* spp. e *Trichoderma* spp. foram obtidos a partir de coletas em área de cultivo de coqueiros no Município de Moju, localizado no estado do Pará. Para o isolamento de *Bacillus* spp. as amostras de solo obtidas foram processadas de acordo com metodologia para isolamento do gênero (World Health Organization, 1985). As colônias bacterianas obtidas foram caracterizadas por estudos morfológicos e foram submetidas ao teste de Gram, pelo método de Ryu. Para isolamento de *Trichoderma* spp., amostras de raízes coletadas foram lavadas em água corrente e cortadas em tamanhos de 0,3 a 0,5 cm. Em seguida, foram lavados em álcool a 70% por 30 segundos, hipoclorito a 2% por 2 minutos, e lavados em água destilada estéril por duas vezes, secos em papel de filtro e plaqueados em meio de cultura ágar-água. Após dois dias, as colônias crescidas foram transferidas e cultivadas em placas de Petri contendo meio de cultura BDA. Posteriormente, foram preparadas lâminas para observação sob microscópio de luz.

Os isolados foram avaliados para o controle *in vitro* do *T. paradoxa* e em testes no controle da resinose em mudas de coqueiro, em casa-de-vegetação. Os isolados promissores foram selecionados e preservados em duplicatas para posterior estudo do mecanismo de ação utilizado no controle do patógeno.

#### 3.1 Caracterização enzimática

Os ensaios de caracterização enzimática foram realizados no Laboratório de Fitopatologia Molecular da UFAL. Foram avaliados 8 isolados de *Bacillus* spp. (B.01; B.02; B.03; B.04; B.57; B.61; B.77 e B.54) crescidos por 24 horas em meio Nutriente-Ágar (NA) e 4 isolados de *Trichoderma* spp. (T.03; T.06; T.07 e T.09) crescidos por 7 dias em meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA) pré selecionados como biocontroladores da resinose do coqueiro. A caracterização enzimática foi realizada com o cultivo dos isolados em meios de cultura específicos para produção de quitinase, protease e glucanase. Cada ensaio foi repetido duas vezes, sendo utilizado 5 repetições, e cada parcela experimental foi representada por uma placa de Petri.

### 3.1.1 Produção de Quitinase

A produção de quitinase foi avaliada em meio mineral, utilizando-se quitina coloidal (Sigma®) 0,08% como única fonte de carbono (Renwick et al., 1991), em meio MLN, conforme a seguir ( $\text{g L}^{-1}$ ):  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 0,78;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,80;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,20;  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,20;  $\text{CaCl}_2$ , 0,06;  $\text{NaCl}$ , 0,10;  $\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,002;  $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,00024;  $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0,00004;  $\text{CoSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,010;  $\text{MnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,003;  $\text{NaFeEDTA}$ , 0,0028;  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 0,005; ágar, 15.

Os isolados de *Trichoderma* spp. e *Bacillus* spp. foram então repicados no centro de placas de Petri contendo o meio de cultura citado e incubados a 28°C durante 7 dias. A produção de quitinase foi constatada pela observação de halo transparente ao redor da colônia contrastando com o restante do meio com aspecto leitoso.

### 3.1.2 Produção de $\beta$ -1,3 glucanase

A atividade  $\beta$ -1,3 glucanases foi determinada pelo método adaptado por Renwick et al. (1991) baseado na detecção da hidrólise do  $\beta$ -1,3 glucano (laminarina-Sigma) por reação colorimétrica com o corante vermelho Congo.

Discos de meio de cultura contendo colônia de *Trichoderma* spp. e *Bacillus* spp. foram repicados para placas de Petri contendo meio de cultura MLN como única fonte de carbono e  $5 \text{ g L}^{-1}$  de laminarina (Sigma). As placas foram incubadas a 28 °C em fotoperíodo de 12h. Após três dias, foi adicionado solução de vermelho Congo até cobrir o meio completamente. Após 90 minutos, foi realizada a drenagem do excesso de corante e observada a formação de zona amarelo-alaranjada ao redor das colônias indicando a hidrólise do  $\beta$ -1,3 glucano.

### 3.1.3 Produção de Protease

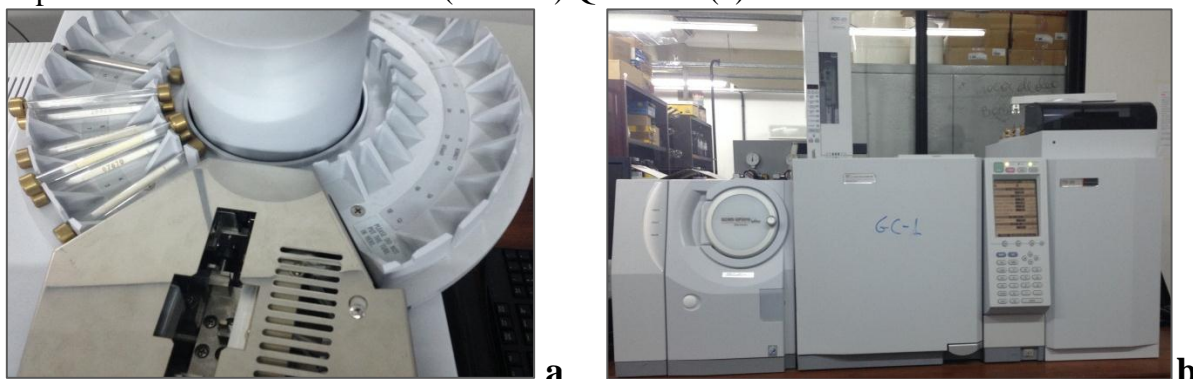
Os isolados antagonistas foram repicados para placas de Petri contendo meio ágar-gelatina-leite (leite em pó desnatado; gelatina em pó incolor sem sabor). As placas foram

incubadas a 28 °C em BOD por 24 h e a produção de protease foi observada pela formação de halos enzimáticos incolores.

### 3.2 Extração e identificação de compostos voláteis (VOC's) de isolados de *Bacillus spp.* e *Trichoderma spp.*

Os compostos produzidos por isolados antagonistas foram analisados no Laboratório de Pesquisa em Química dos Produtos Naturais, através do sistema de dessorção térmica Shimadzu TD-20 em Cromatografo Gasoso acoplado a Espectrômetro de Massas modelo (CG/EM) QP5050A (Shimadzu, Japan) (Figura 12).

**Figura 12:** Dessorção térmica TD20 (Shimadzu Japan) (a); Cromatografo Gasoso acoplado a Espectrômetro de Massas modelo (CG/EM) QP5050A (b).

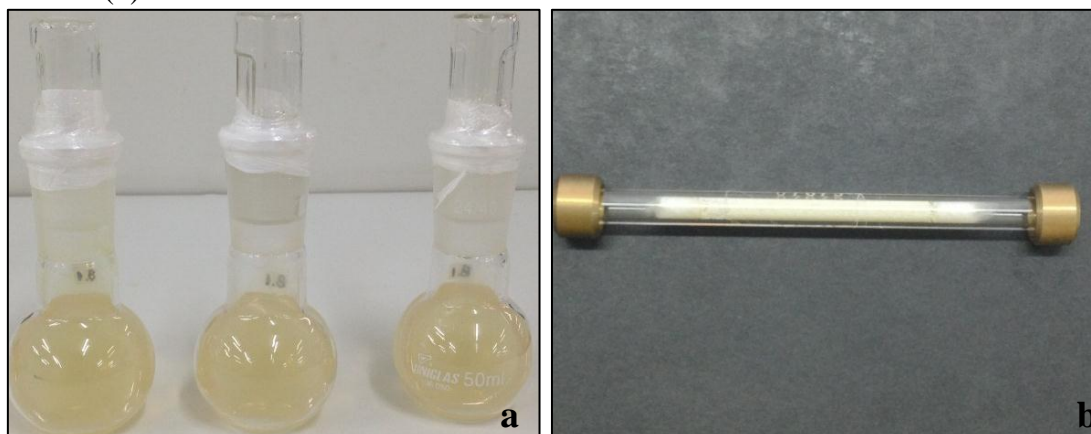


As condições na unidade TD-20, pré-estabelecidas pela fabricante, foram de 15 min sobre fluxo de gás de 60 ml/min; temperatura da válvula 250°C; armadilha de temperatura de calor 280°C; armadilha temperatura fresca -20°C; interface de temperatura de calor de 250°C. O hélio (pureza de 99,999%) foi utilizado como gás carreador para os compostos orgânicos termicamente dessorvidos; taxa de fluxo de gás foi auto-ajustada para dirigir compostos orgânicos para GC-MS, modelo QP5050A, utilizando Impacto de Elétrons (70eV) como modo de Ionização. A análise foi realizada em Coluna Capilar para cromatografia a gás, RTX-5MS (95% polidimetilsiloxano e 5% difenil), 30m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro externo, 0,25 µm de diâmetro interno. As temperaturas da Fonte de Íons e da Interface foram 200°C e 290°C respectivamente. A temperatura inicial foi de 50°C constante por 5 min e com

gradiente de aumento de temperatura de 5°C/min até a temperatura final de 280°C por 5min, com temperatura de interface de 220°C. O gás de arraste foi hélio com vazão de 1 mL/min.

Os compostos voláteis foram coletados por 8 horas em balão volumétrico hermeticamente fechado de 250 mL, contendo 100 mL de meio Nutriente Ágar (NA) inclinado para o cultivo dos isolados de *Bacillus* spp. crescidos por 24 horas, e balões volumétricos com 100 mL de meio BDA inclinado para o cultivo dos isolados de *Trichoderma* spp. crescidos por 48 horas (Figura 13). A identificação dos Compostos Orgânicos Voláteis (VOC's) foi dividida em três etapas: (1) detecção do pico do íon molecular; (2) distinção do padrão de fragmentação dos grupos de picos; (3) e comparação automática empregando o banco de dados NIST e Wiley usando o GCMSolution software.

**Figura 13:** Cultivo de isolados de *Bacillus* spp. em meio NA (a); Tubos contendo adsorvente Tenax<sup>®</sup> TA (b).



O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com 14 tratamentos, sendo 8 isolados de *Bacillus* spp., 4 isolados de *Trichoderma* spp. e 2 tratamentos controle, composto por meio de cultura NA e meio BDA. É importante ressaltar que, os compostos produzidos por isolados de *Trichoderma* spp. não foram avaliados devido a saturação dos tubos contendo Tenax<sup>®</sup> TA (80 mesh), sob as mesmas condições dos demais tratamentos.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Caracterização enzimática

#### 4.1.1 Produção de Quitinase

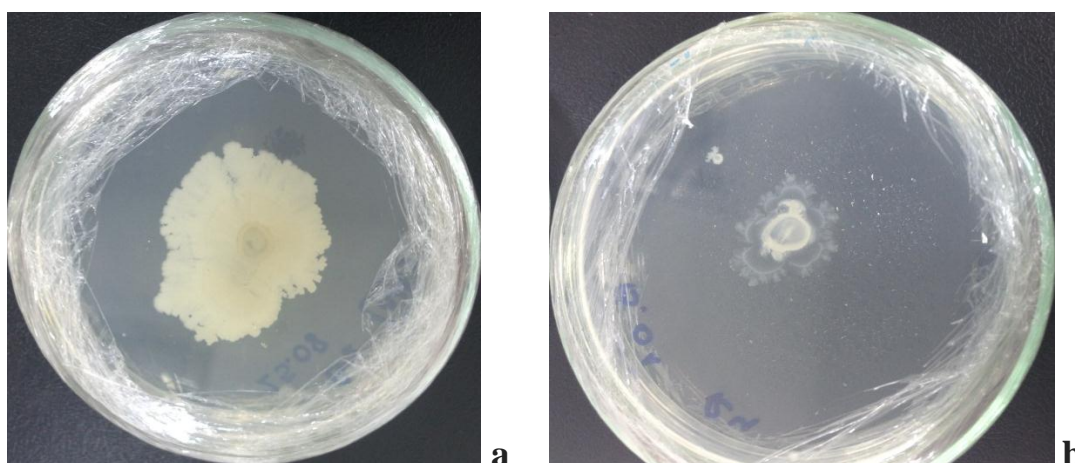
Os isolados de *Bacillus* spp. B.01 e B.02 apresentaram resultado positivo para a produção de quitinase (Figura 14), demonstrando a capacidade de tais isolados em promover o controle de *T. paradoxa* pela degradação da quitina constituinte na parede celular do patógeno. Nenhum isolado de *Trichoderma* spp. avaliado apresentou produção de quitinase (Tabela 3). Isolado de *Bacillus thuringiensis* promoveu o controle em até 100% de *Sclerotium rolfii* e de 55 a 82% para *Aspergillus flavus*, *Aspergillus terreus*, *Nigrospora* sp., *Rhizopus* sp., *Aspergillus niger*, *Fusarium* sp., *Aspergillus candidus*, *Absidia* sp. e *Helminthosporium* sp., 45% para *Curvularia* sp., e 10% para *Aspergillus fumigatus* em sementes de soja. A adição de quitinase produzida por isolado de *Bacillus thuringiensis* aumentou a germinação de sementes de soja infectadas por *S. rolfii* de 25% para 90% (Ramírez et al., 2004). Em trabalho de seleção de microrganismos eficientes no controle de fitopatógenos, 1% dos microrganismos isolados de rizosfera, *Bacillus licheniformis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bacillus licheniformis* e *B. Thuringiensis*, foram selecionados como positivos para produção de quitinase, suprimindo o crescimento dos fungos fitopatogênicos, *Rhizoctonia solani*, *Macrophomina phasiolina*, *Fusarium culmorum*, *Pythium* sp, *Alternaria alternata* e *Sclerotium rolfii*, reduzindo significativamente o tombamento em *Helianthus annuus* (Kamil et al., 2007).



**Tabela 3:** Produção de enzimas hidrolíticas por isolados de *Bacillus* spp. e *Trichoderma* spp.

Isolados	Produção Enzimática		
	Quitinase	B-1,3-glucanase	Protease (48h)
B.03	-	-	+
B.57	-	+	+
B.04	-	-	+
B.02	+	-	+
B.77	-	-	+
B.01	+	-	+
B.61	-	-	+
B.104	-	-	+
T.03	-	-	-
T.06	-	-	-
T.07	-	-	-
T.09	-	-	-

Presença (+) ou ausência (-) de atividade enzimática por isolados de *Bacillus* spp. e *Trichoderma* spp.

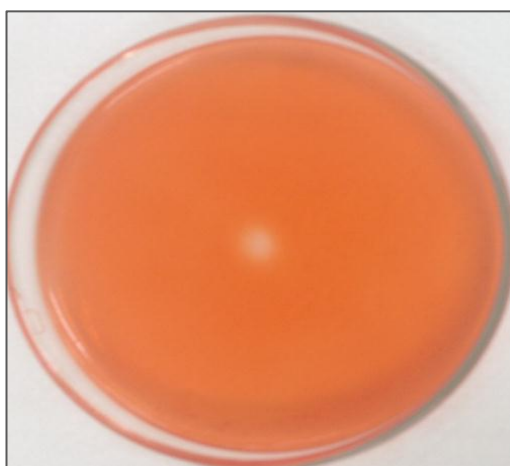
**Figura 14:** Produção de quitinase por isolado de *Bacillus* spp. B.01. Isolado em meio NA- Tratamento controle (a). Isolado em meio de cultura específico (b);

#### 4.1.2 Produção de $\beta$ -1,3 glucanase

A produção de  $\beta$ -1,3 glucanase foi observada apenas pelos isolados de *Bacillus* spp. B.57 (Figura 15), tornando-o importante agente capaz de suprimir *T. paradoxa* (Tabela 3). Isolado NSRS 89-24 de *Bacillus subtilis* inibiu o crescimento de *Pyricularia grisea* e *Rhizoctonia solani*, patógenos de plantas de arroz (*Oryza sativa*) pela produção da enzima glucanase (Leelasuphakul et al., 2006). A eficácia de isolado de *B. subtilis* no controle de *Rhizopus stolonifer* em pós-colheita de frutos de pêssgo foi comprovada ao apresentar

aumento significativo da atividade de  $\beta$ -1,3-glucoanase, promovendo acúmulo de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), espécie reativa de oxigênio mais estável e prontamente transportada através da membrana capaz de regular a expressão de genes requeridos para a ativação da resistência a doenças (Wang et al., 2013).

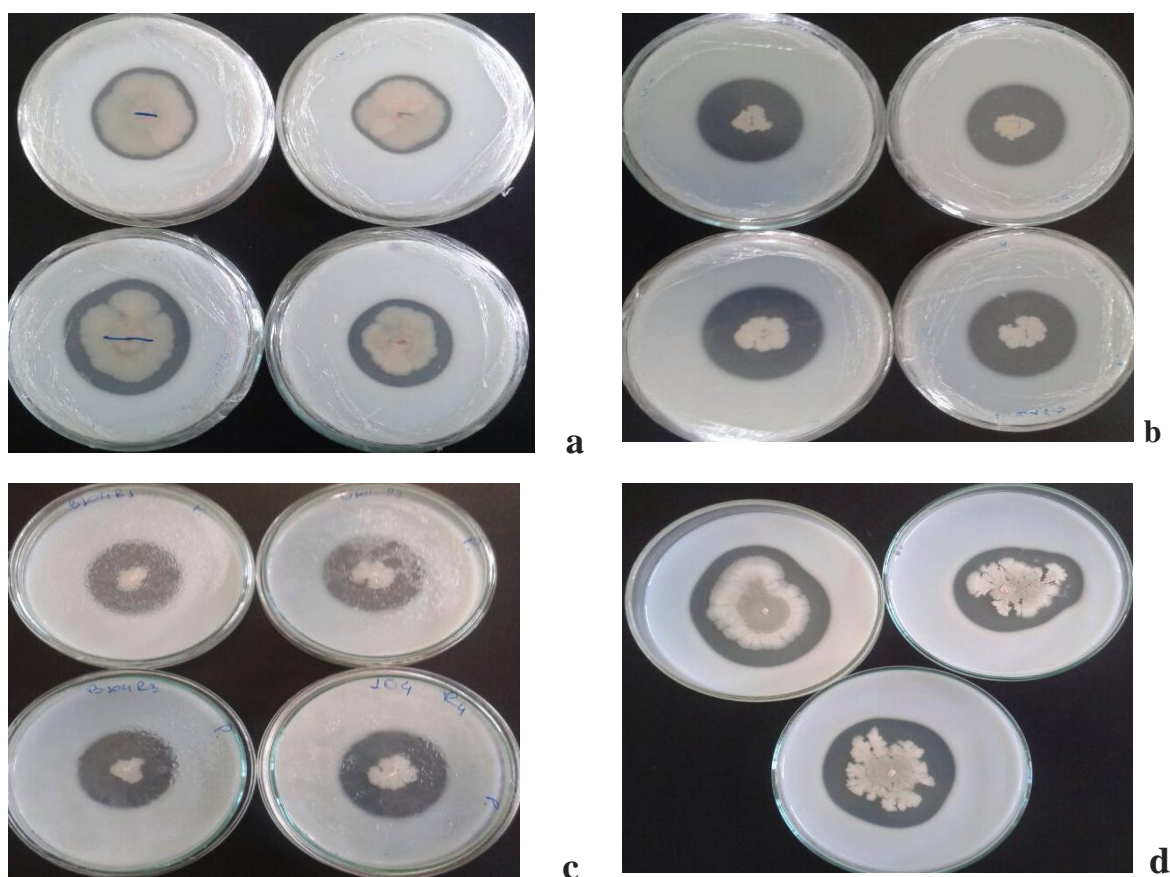
**Figura 15:** Produção de  $\beta$ -1,3-glucoanase por isolado de *Bacillus* spp. B.57 biocontrolador da resinose do coqueiro.



#### 4.1.3 Produção de Protease

Todos os isolados de *Bacillus* spp. avaliados apresentaram produção de protease, enquanto nenhum isolado de *Trichoderma* spp. apresentou produção de protease (Tabela 3) (Figura 16). Três estirpes bacterianas de *Bacillus subtilis* com capacidade comprovada na supressão da podridão vermelha em plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.), cujo agente etiológico é o fungo *Colletotrichum falcatum*, apresentaram produção de protease e antibióticos (Hassan et al., 2010). *Ampelomyces quisqualis*, micoparasita altamente específico de oídio patogênico de pepino apresentaram atividade *in vitro* de proteases, sendo encontrada uma correlação positiva entre sua atividade micoparasítica e a produção de proteases (Angeli et al., 2012).

**Figura 16:** Produção de protease por isolados de *Bacillus* spp. biocontroladores da resinose do coqueiro: Isolado B. 77 (a); B.61 (b); B.04 (c) e B.01 (d).

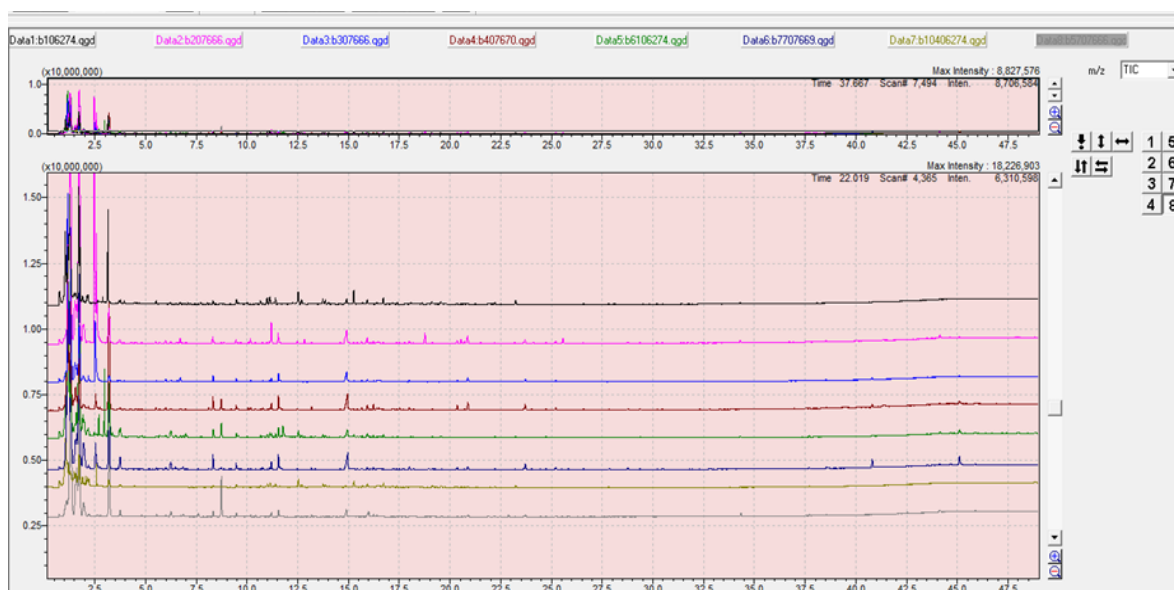


Os resultados enzimáticos obtidos neste trabalho subsidiaram a compreensão mais detalhada do processo de micoparasitismo dos isolados estudados e a formação de base sólida para o desenvolvimento de novas estratégias com o emprego destes isolados no controle da resinose do coqueiro.

#### 4.2 Extração e identificação de compostos voláteis (VOC's) de isolados de *Bacillus*

Foram identificados 16 VOCs, produzidos por isolados de *Bacillus* spp., potenciais no biocontrole de doenças em plantas, tais como, dióxido de carbono, 2-propanona, etanol, ácido acético, fenol, benzeno, benzaldeído, 2-etil-hexanol. Nota-se pelo cromatograma que os voláteis emitidos pelos isolados de *Bacillus* spp. apresentam algumas similaridades, com vários compostos aparecendo em todas as frações (Figura 17). Não foi possível estudar os compostos voláteis produzidos por *Trichoderma* spp., devido a saturação do adsorvente Tenax<sup>®</sup> TA.

**Figura 17:** Cromatograma correspondendo a compostos orgânicos voláteis produzidos por isolados de *Bacillus* spp. eficientes no controle da resinose em mudas de coqueiro e por meio de cultura NA como tratamento controle.



Cores representadas: preta: B.01; rósea: B.02; azul: B.03; vermelha: B.04; verde: B.61; azul: B.77; amarelo: B.104; cinza: B.57.

Os perfis voláteis analisados (GC-MS) mostraram que os isolados B.01, B.02 e B.04 produziram mais VOCs que os demais isolados. Benzaldeído, fenol e 2-etil-hexano foram produzidos por todos os isolados de *Bacillus* spp. Os compostos 2-nonanona e 2-decanona foram produzidos exclusivamente por B.01 e B.02. Os ácidos, acético, benzóico e salicílico também foram encontrados (Tabela 4).

**Tabela 4:** Perfil volátil GC / MS de isolados *Bacillus* spp. biocontroladores da resinose do coqueiro.

Tratamentos	Compostos	Similaridade	Tempo de retenção (min)	Pico relativo da área (%)
Controle				
B.01	Dióxido de carbono	98%	0,76	2,88
	Etanol	97%	1,14	3,08
	2-Propanona	94%	1,19	6,77
	Clorofórmio	98%	1,71	15,89
	Ácido acético	96%	3,15	7,83
	Ácido benzoico	89%	14,91	0,74
	Benzaldeído	94%	8,31	0,59
	Fenol	89%	9,46	0,34
	Benzeno	87%	2,12	1,26
	2-etil-hexanol	88%	11,19	0,08
	2-nonanona	89%	12,83	0,17
	2-decanona	92%	14,83	0,46
	B.02	Dióxido de carbono	98%	0,76
Etanol		97%	15,64	0,09
Benzeno		96%	10,16	0,23
2-Propanona		94%	1,20	10,0
Ácido acético		89%	1,54	2,21
Ácido benzoico		90%	14,91	1,49
Benzaldeído		94%	8,30	0,41
Fenol		89%	9,45	0,19
2-etil-hexanol		88%	11,11	0,12
2-nonanona		89%	12,83	0,2
2-decanona		92%	14,82	0,39
Acido salicílico		85%	18,89	0,25
B.03		Dióxido de carbono	98%	0,76
	Etanol	97%	1,16	28,48
	Ácido benzoico	89%	14,91	1,83
	Benzaldeído	94%	8,32	0,77
	Fenol	89%	9,47	0,35
	Benzeno	87%	3,74	0,22
	2-etil-hexanol	88%	11,14	0,18
B.04	Dióxido de carbono	98%	0,78	0,15
	Etanol	97%	1,16	19,62
	2-Propanona	94%	1,19	3,44
	Clorofórmio	98%	1,71	2,88
	Ácido acético	89%	1,53	3,19
	Ácido benzoico	90%	14,95	3,67
	Benzaldeído	94%	8,3	1,41
	Fenol	89%	9,46	0,43
	Benzeno	87%	2,13	1,12
	2-etil-hexanol	88%	11,12	0,18
	Acetaldeido	96%	1,09	5,59

Tratamentos	Compostos	Similaridade	Tempo de retenção (min)	Pico relativo (%)
B.57	Octanal	92%	10,05	0,14
	2-Propanona	94%	1,22	5,98
	Ácido benzoico	90%	14,89	1,05
	Benzaldeído	94%	8,33	0,49
	Fenol	89%	9,47	0,32
B.61	2-etil-hexanol	88%	11,12	0,12
	Etanol	96%	1,15	13,6
	2-Propanona	94%	1,20	11,12
	Ácido acético	89%	2,97	0,6
	Ácido benzoico	90%	14,93	0,91
	Benzaldeído	94%	8,32	0,41
	Fenol	89%	9,48	0,43
	Benzeno	87%	2,13	0,67
	2-etil-hexanol	88%	11,12	0,06
	Acetaldeido	96%	1,10	10,51
B.77	Octanal	92%	10,05	0,03
	Etanol	96%	1,16	10,71
	2-Propanona	94%	1,21	12,23
	Ácido acético	89%	1,63	1,83
	Ácido benzoico	90%	14,96	2,42
	Benzaldeído	94%	8,31	0,99
	Fenol	89%	9,46	0,36
	2-etil-hexanol	88%	11,12	0,14
	Acetaldeido	96%	1,09	9,26
B.104	Octanal	92%	10,05	0,08
	2-Propanona	94%	1,20	5,06
	Ácido acético	89%	2,58	2,7
	Ácido benzoico	90%	14,85	0,16
	Benzaldeído	94%	8,32	1,00
	Fenol	89%	9,47	0,43
	Benzeno	87%	2,13	2,64
	2-etil-hexanol	88%	11,12	0,11

Os compostos gerados por *Bacillus* foram identificados por comparação de espectro de massa para NIST Mass Spectral Biblioteca (probabilidade baseado match > 80%).

Ácidos, tais como, ácido benzoico e fenol, apresentam importantes características antifúngicas, além de contribuírem para resposta de hipersensibilidade do vegetal (Isaac, 1992; Beltrame, 2005), como deposição de lignina no tecido do hospedeiro (Nicholson; Hammerschmidt, 1992; Beltrame, 2005). Etanol somente não foi produzido pelos isolados B.57 e B.104 (Tabela 4). Todos os VOCs acima citados não ocorreram no tratamento controle o que indica que a produção destes compostos orgânicos voláteis foram derivados de metabólitos bacterianos e não a partir de utensílios e meio de cultura utilizados nos ensaios.

Resultado semelhante foi encontrado por Yuan et al. (2012), que identificaram 11 VOCs produzidos por *Bacillus amyloliquefaciens* inibidores do crescimento micelial e

germinação de *F.oxysporum* f. sp. cubense (Yuan et al., 2012). Em avaliação *in vitro* 2-nonanona controlou doenças pós-colheita em morango (Huang et al., 2011). Em trabalho realizado por Zheng et al. (2013), 2-decanona, 2-nonanona e benzeno, produzidos por duas cepas isoladas de *Bacillus strains*, apresentaram atividade antimicrobiana de 100% de *Colletotrichum gloeosporioides*, e esporos do patógeno não germinaram após contato com os tais compostos. Estes compostos proporcionaram ainda, diminuição de lesões de antracnose em frutos de manga. No controle de *F. oxysporum*, benzaldeído, 2- nonana e 2- decanona, dentre outros, foram os principais compostos anti-fúngicos produzidos por *Paenibacillus polymyxa*, proporcionando juntamente com outros VOCs, completa inibição da germinação de esporos e efeito inibitório significativo de 60 a 64% do micélio fúngico do patógeno (Raza et al., 2015). Compostos voláteis produzidos por *Bacillus* spp. contra podridão pós-colheita em citros, reduziram significativamente a incidência e severidade da doença em frutos biofumigados (Arrebola et al., 2010).

Os isolados de *Bacillus* spp. avaliados exercem múltiplos mecanismos antagônicos além do mais, VOCs podem se espalhar atingindo microambientes existente em torno de colônias de fitopatógenos, tornando-se excelente opção para uso como agentes de controle biológico da resinose do coqueiro. É importante ressaltar, que alguns destes compostos têm sido amplamente utilizados como aditivos de sabor e produtos farmacêuticos para consumo humano, como 2-nonanona, produzido naturalmente e liberados por framboesas vermelhas e morangos (Vaughn et al., 1993). Ou seja, o uso de compostos voláteis na indústria alimentar torna ainda maior a possibilidade de ser considerado como alternativa segura para controle de doenças em culturas agrícolas.

Pesquisas futuras também são necessárias para a compreensão aceitável em agricultura e maneiras práticas para uso eficiente dos isolados em áreas de cultivo de coqueiros.

## 5 CONCLUSÕES

- Os isolados de *Bacillus* spp. estudados produzem compostos voláteis com potencial antifúngicos, bem como apresentam atividade enzimática eficiente em degradar a parede celular de *T. paradoxa*.
- Não foi possível estudar os compostos voláteis produzidos por *Trichoderma* spp., utilizando metodologia similar de coleta, devido a saturação do adsorvente Tenax<sup>®</sup> TA.
- Devido aos mecanismos de ação apresentados por agentes de controle biológico avaliados, esta pesquisa se revela importante para o manejo da resinose do coqueiro.



## 6 REFERÊNCIAS

- AGROFIT. **Desenvolvido pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.** Apresenta informações sobre produtos fitossanitários. 2014. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/agrofit>. Acesso em: 20 de agosto de 2014.
- ANGELI, D.; PUOPOLO, G.; MAURHOFER, M.; GESSLER, C.; PERTOT, I. Is the mycoparasitic activity of *Ampelomyces quisqualis* biocontrol strains related to phylogeny and hydrolytic enzyme production? **Biological Control** 63 (3): 348 - 358, 2012.
- ARREBOLA, M. B. Et al. Effect of volatile compounds produced by *Bacillus strains* on postharvest decay in citrus. **Biological Control** 53 (1): 122 - 128, 2010.
- BELTRAME, A. B. Efeito de cianobactérias e algas eucarióticas na resistência de plantas de fumo contra o *Tobacco mosaic virus* (TMV). André Boldrin Beltrame. **Dissertação de Mestrado.** Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2005.
- CHAIHARN, M.; LUMYONG, S. Phosphate solubilization potential and stress tolerance of rhizobacteria from rice soil in Northern Thailand. **World Journal of Microbiology e Biotechnology** 25: 305-314, 2009.
- CHOWDAPPA, P.; MOHAN KUMAR, S.P.; JYOTHI LAKSHMI, M.; UPRETI, K.K. Growth stimulation and induction of systemic resistance in tomato against early and late blight by *Bacillus subtilis* OTPB1 or *Trichoderma harzianum* OTPB3. **Biological Control** 65 (1): 109-117, 2013.
- CORCUFF, R.; MERCIER, J.; TWEDDELL, R. Effect of water activity on the production of volatile organic compounds by *Muscodor albus* and their effect on three pathogens in stored potato. **Fungal Biology** 115: 220-227, 2011.
- COTA, I. E.; TRONCOSO-ROJAS, R.; SOTELO-MUNDO, R.; SÁNCHEZ-ESTRADA, A.; TIZNADO-HERNÁNDEZ, M. E. Chitinase and  $\beta$  - 1, 3-glucanase enzymatic activities in response to infection by *Alternaria alternata* evaluated in two stages of development in different tomato fruit varieties. **Scientia Horticulture** 112 (1): 42-50, 2007.
- DILANTHA, F.W.G., RAMARATHNAM, R., KRISHNAMOORTHY, A.S., SAVCHUK, S.C. Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol. **Soil Biology & Biochemistry** 37, 955-964, 2005.
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Estatísticas da produção mundial. 2014. Disponível em: < [http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/browse/Q/\\*S](http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/browse/Q/*S)>. Acesso em: 11 de fevereiro de 2015
- FERREIRA, J.M.S.; LIMA, M.F.; SANTANA, D.L.Q.; MOURA, J.I.L.; SOUZA, L.A. Pragas do coqueiro. In: FERREIRA, J.M.S.; WARWICK, D.R.N.; SIQUEIRA, L.A. **A Cultura do coqueiro no Brasil**. 2. Ed. rev. e ampl. – Brasília: Embrapa-SPI; Aracaju: Embrapa-CPACT, p. 292, 1998.
- FERREIRA, J.M.S. Resinose do coqueiro-Como identificar e Manejar. Aracaju: **Embrapa Tabuleiros**, p. 127, 2007.

GOVENDER, V., KORSTEN, L., DHARINI, S. Semi-commercial evaluation of *Bacillus licheniformis* to control mango post-harvest diseases in South Africa. **Postharvest Biology Technology** 38: 56- 56, 2005.

HASSAN, MUHAMMAD NADEEM AND OSBORN, A. MARK AND HAFEEZ, FAUZIA YUSUF. Molecular and biochemical characterization of surfactin producing *Bacillus* species antagonistic to *Colletotrichum falcatum* Went causing sugarcane red rot. **African Journal of Microbiology Research** 4 (20): 2137 – 2142, 2010.

HUANG, R., LI, G.Q., ZHANG, J., YANG, L., CHE, H.J., JIANG, D.H., HUANG, H.C. Control of post-harvest *Botrytis* fruit rot of strawberry by volatile organic compounds of *Candida intermedia*. **The American Phytopathological Society** 101: 859–869, 2011.

INDEX FUNGORUM. Disponível em <http://www.indexfungorum.org/NamesRecord>. Acesso em 03/01/2014

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo Agropecuário (2014); Pesquisa Agrícola. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/homeestatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/default>. Acesso em 20 jan de 2015.

ISAAC, S. Fungal and plant interactions. Fungal-plant interactions. Cambridge: **Chapman and Hall** 418p., 1992

JAGER, E.S., WEHNER, F.C., KORSTEN, L. Microbial ecology of the mango phylloplane. **Microbial Ecology** 42, 201–207, 2001.

KAMIL, Z., RIZK, M., SALEH, M., AND MOUSTAFA, S. Isolation and identification of rhizosphere soil chitinolytic bacteria and their potential in antifungal biocontrol. **Global J. Mol. Sci.** 2: 57–66, 2007.

LEELASUPHAKUL, W.; SIVANUNSAKU, P.; PHONGPAICHIT, S. Purification, characterization and synergistic activity of  $\beta$ -1,3-glucanase and antibiotic extract from an antagonistic *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 against rice blast and sheath blight. **Enzyme and Microbial Technology**. 38 (7): 990–997, 2006.

MEDEIROS, R. D.; MESQUITA, ; J. B. Criação de indicadores para a avaliação da ação da resinose do estipe (*Ceratocystis paradoxa* (De Seynes) Moreau) em coqueiro (*Cocos nucifera* L.). **Scientia Plena**. 10 (2), 2014.

MORAES, A. J. G. Seleção de Rizobactérias promotoras do crescimento e biocontrole da brusone (*Magnaporthe oryzae*) em arroz (*Oryza sativa* L.). **Dissertação Mestrado em Agronomia**. 2010.

NICHOLSON, R.L; HAMMERSCHMIDT, R. Phenolic compounds and their role in disease resistance. **Annual Review of Phytopathology** 30: 369 - 389, 1992.

RAMÍREZ, A. R.; ABARCA, B. I. E.; USCANGA, G. A.; P.M.H.; CORONA, J. E. B. Antifungal Activity of *Bacillus thuringiensis* Chitinase and Its Potential for the Biocontrol of

Phytopathogenic Fungi in Soybean Seeds. **Journal off Food Science** 69 (5): M131 - M134, June 2004.

RAZA, W.; YUAN, J. LING, N. HUANG, Q. SHEN, Q. Production of volatile organic compounds by an antagonistic strain *Paenibacillus polymyxa* WR-2 in the presence of root exudates and organic fertilizer and their antifungal activity against *Fusarium oxysporum* f. sp. *Niveum*. **Biological Control** 80: 89 - 95, 2015.

REN, Y., STROBEL, G.A., SEARS, J., PARK, M., 2010. *Geobacillus* sp., a thermophilic bacterium producing volatile antibiotics. **Microbial Ecology** 60, 130–136, 2010.

RENEWICK, A.; CAMPBELL, R.; COE, S. Assessement of in vivo screening systems for potential biocontrolle agentes of *Gaeumannomyces graminis*. **Plant Pathology** 40: 524-532, 1991.

VAUGHN, S.F., SPENCER, G.F., SHASHA, B.S. Volatile compounds from raspberry and strawberry fruit inhibit postharvest decay fungi. **Journal of Food Science** 58, 793 - 796, 1993.

VIVEKANANTHAN, R., RAVI, M., RAMANATHAN, A., SAMIYAPPAN, R., Lytic enzymes induced by *Pseudomonas fluorescens* and other biocontrol organisms mediate **World Journal of Microbiology e Biotechnology** 20: 235-244, 2004.

WAN, M.; LI, G.; ZHANG J.; JIANG, D.; HUANG, H. C. Effect of volatile substances of *Streptomyces platensis* F-1 on control of plant fungal diseases. **Biological Control** 46: 552-559, 2008

WANG, X.; WANG, J.; JIN, P.; ZHENG, Y. Investigating the efficacy of *Bacillus subtilis* SM21 on controlling *Rhizopus* rot in peach fruit. **International Journal of Food Microbiology**. 164 (2-3): 141- 147, 2013.

WARWICK, D. R. N.; FERREIRA, J. M. S.; PASSOS, E. E. M. Ocorrência de resinose do estipe do coqueiro em Sergipe provocada por *Chalara paradoxa*. **Fitopatologia Brasileira** 29: 171, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Informal consultation on the development of *Bacillus sphaericus* as a microbial larvicide. Geneva: UNDP/World Bank/WHO. **Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases** (TDR). 24 p., 1985.

YUAN, J.; RAZA, W.; SHEN, Q.; HUANG, Q. Antifungal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 Volatile Compounds against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. **Applied and Environmental Microbiology** 78 (16): 5942 - 5944, 2012.

ZHENG, M.; SHI, J.; SHI, J.; WANG, Q.; LI, Y. Antimicrobial effects of volatiles produced by two antagonistic *Bacillus* strains on the anthracnose pathogen in postharvest mangos. **Biological Control** 65 (2):\_200 - 206, 2013.

## ANEXO



MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE  
 INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS  
 Diretoria de Uso Sustentável da Biodiversidade e Florestas  
 Coordenação Geral de Autorização de Uso da Flora e Floresta  
 SCEN Trecho 2 Ed. Sede do Ibama - Cx. Postal nº 09566 Brasília  
 CEP: 70818-900 e Telefone: 61) 3316-1474  
 www.ibama.gov.br

PROTOCOLO SIGED Embrapa Sede DAPI/CGS PROTOCOLO GERAL Nº 02001.009951/2014-73 121 09 12014
---

OF 02001.009951/2014-73 CGAUF/IBAMA

Brasília, 08 de setembro de 2014.

À Senhora  
 ROSA MIRIAN DE VASCONCELOS  
 Coordenadora da EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA  
 PARQUE ESTAÇÃO BIOLÓGICA  
 BRASÍLIA - DISTRITO FEDERAL  
 CEP.: 70.770-990

Assunto: **Inclusão de projeto na Autorização Especial de Acesso e Remessa de Amostra de Componente do Patrimônio Genético.**

Senhora Coordenadora,

1. Cumprimos Vossa Senhoria vimos informar a inclusão do seguinte projeto de pesquisa, no portfólio da Autorização Especial da EMBRAPA, para Acesso e Remessa de Componente do Patrimônio Genético:

“Iniciativas de pesquisa para o controle biológico de doenças em palmeiras de importância econômica”, coordenado pelo Dr. Eudes de Arruda Carvalho, Processo/Ibama n.º 02001.005484/2014-11.

Atenciosamente,

*Juliana Sampaio*  
**JULIANNA SAMPAIO GOMES DE OLIVEIRA**  
 Coordenadora-Geral da CGAUF/IBAMA