

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA TROPICAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA  
CURSO DE MESTRADO**

**POTENCIAL DE USO DE BACTÉRIAS ASSOCIADAS AO SISTEMA  
RADICULAR DE ABACAXIZEIROS (*Ananas* spp.) NO CONTROLE DA  
FUSARIOSE (*Fusarium guttiforme* Nirenberg & O'Donnell)**

**RAFAEL OLIVA TROCOLI**

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA  
MARÇO – 2010**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**POTENCIAL DE USO DE BACTÉRIAS ASSOCIADAS AO SISTEMA  
RADICULAR DE ABACAXIZEIROS (*Ananas spp.*) NO CONTROLE DA  
FUSARIOSE (*Fusarium guttiforme* Nirenberg & O'Donnell)**

**RAFAEL OLIVA TROCOLI**

Engenheiro Agrônomo

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2007

Dissertação submetida ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Microbiologia Agrícola.

Orientador: Miguel Angel Dita Rodriguez

Co-orientadores : Harllen Sandro Alves Silva  
Jorge Teodoro de Souza

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA**

**MARÇO – 2010**

## FICHA CATALOGRÁFICA

T843 Trocoli, Rafael Oliva

Potencial de uso de bactérias associadas ao sistema de abacaxizeiro/ Rafael Oliva Trocoli. \_ Cruz das Almas, BA, 2010.

f. 83. ; il.

Orientador: Miguel Angel Dita Rodriguez

Co-orientadores: Jorge Teodoro de Souza; Harllen Sandro Alves

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

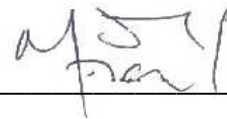
1. Abacaxi. 2 Abacaxi – doença. I. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias e Tecnológicas. II. Título.

CDD 634.774

Ficha catalográfica elaborada pela seção técnica da biblioteca central da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Campus Cruz das Almas.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS**  
**EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA TROPICAL**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA**  
**CURSO DE MESTRADO**

**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE**  
**RAFAEL OLIVA TROCOLI**



---

Dr. Miguel Angel Dita Rodriguez  
Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical  
(Orientador)



---

Prof. Dr. Leandro Lopes Loguercio  
Universidade Estadual de Santa Cruz - UESC



---

Dr. Aristóteles Pires de Matos  
Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical

Dissertação homologada pelo Colegiado do Curso de Mestrado em Microbiologia  
Agrícola em \_\_\_\_\_  
Conferindo o Grau de Mestre em Microbiologia Agrícola em \_\_\_\_\_

*À minha mãe Vera Lúcia Oliva Trocoli  
Pelo primoroso exemplo de caráter e por  
Ensinar-me o valor da vida e da natureza*

**DEDICO**

## **AGRADECIMENTOS**

Ao programa de Pós- Graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e à Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, pela oportunidade de realização do curso;

A minha família, principalmente a minha mãe Vera Oliva Trocoli e Larissa pelo amor e carinho - os pilares desta conquista;

Ao Dr. Miguel Angel Dita Rodriguez pelo compromisso com a ciência, competência profissional, disposição e paciência no processo de orientação durante esses dois anos;

Ao co-orientador Prof. Dr. Jorge Teodoro de Souza pelo profissionalismo, entusiasmo e contribuições no processo de construção do saber;

Ao co-orientador Dr. Harllen Sandro Alves Silva pelas sugestões e ensinamentos indispensáveis à realização deste trabalho;

Ao Dr. Aristóteles Pires de Matos pelo exemplo de grande ser humano, dedicação ao trabalho e pelo aperfeiçoamento acadêmico-profissional desde a época de iniciação científica até os dias atuais;

Aos colegas de curso pelos momentos agradáveis que tornaram a realização deste trabalho muito mais prazerosa, além da gratificante amizade fundamentada na união de todos e objetivos em comum;

Aos técnicos e estagiários do laboratório de Fitopatologia da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical pelo apoio no desenvolvimento dos trabalhos;

Aos amigos do programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias pela troca de informações, incentivos e momentos de descontração;

Ao Pesquisador Dr. Francisco Ferraz Laranjeira pela seriedade científica e grande ajuda na realização das análises estatísticas;

Ao Dr. Otávio Álvares de Almeida pela doação das mudas utilizadas nos experimentos;

A todos os membros do NEMA e do laboratório de Fitopatologia e Microbiologia Agrícola da UFRB pelo convívio e amizade;

A CAPES pela concessão da bolsa durante todo o período do curso.

*“A coisa mais bela que o homem pode experimentar é o mistério.  
É essa emoção fundamental que está na raiz de toda ciência”*

***(Albert Einstein)***



# ÍNDICE

Página

**RESUMO**

**ABSTRACT**

**INTRODUÇÃO** .....01

## **CAPÍTULO 1**

Fusariose do abacaxizeiro: Potencial de uso de microrganismos como agentes de biocontrole .....03

1.1. O abacaxizeiro: *Ananas comosus* var. *comosus* (L.) Merrill .....06

1.2. A abacaxicultura: Aspectos sócio-econômicos .....09

1.3. Fusariose do abacaxizeiro: Etiologia, epidemiologia e controle ..... 10

1.4. Controle biológico de doenças de plantas..... 16

## **CAPÍTULO 2**

Potencial de uso de bactérias associadas ao sistema radicular de abacaxizeiros (*Ananas* spp.) no controle da fusariose (*Fusarium guttiforme* Nirenberg & O'Donnell) .....30

Introdução .....33

Material e Métodos.....36

Resultados .....43

Discussão.....60

**CONSIDERAÇÕES FINAIS** .....66

**REFERÊNCIAS**.....68

**ANEXOS** .....81

## RESUMO

### **Trocoli, R. O. Potencial de uso de bactérias associadas ao sistema radicular de abacaxizeiros (*Ananas spp.*) no controle da fusariose (*Fusarium guttiforme* Nirenberg & O'Donnell).**

Atividade de alta relevância sócio-econômica para o Brasil, a abacaxicultura está presente em diversas regiões. Todavia, a fusariose, doença causada por *Fusarium guttiforme* Nirenberg & O'Donnell, pode provocar perdas de até 80% da produção, constituindo o principal fator limitante da cultura. O controle da doença baseia-se na integração de práticas culturais, onde o uso de variedades resistentes e a aplicação de agroquímicos constituem as principais estratégias recomendadas. O fato de a maioria das variedades exploradas comercialmente no Brasil ser suscetível à fusariose, implica na necessidade da aplicação de fungicidas. O uso de outros métodos de controle alternativos como o controle biológico poderiam minimizar o uso de agroquímicos. Entretanto, existe uma escassez de estudos direcionados ao controle biológico da fusariose, que aliada à crescente demanda por métodos alternativos ao uso de agroquímicos justificam este trabalho. Os objetivos deste estudo foram: a) revisar o conhecimento científico sobre a abacaxicultura e a fusariose; b) isolar e selecionar bactérias da rizosfera de abacaxizeiros resistentes à fusariose quanto à redução da colonização de *F. guttiforme*; e c) verificar em condições de campo, o efeito dos isolados selecionados no controle da fusariose do abacaxizeiro. De um total de 226 bactérias oriundas da rizosfera ou de provável origem endofítica, os testes de seleção em condições controladas revelaram um grupo de 26 bactérias, que reduziram totalmente a colonização de *F. guttiforme*. Nos estudos conduzidos em campo cinco isolados (E053L, E011F2, R183S5, R192MG e E043F3) reduziram significativamente a intensidade da doença. Dentre esses, E053L apresentou maior eficiência, seguido por E011F2, R183S5, R192MG e E043F3. Esses isolados são potenciais agentes de biocontrole da fusariose do abacaxizeiro, pelo que estudos futuros visando o uso desses agentes dentro do programa de produção integrada de abacaxi no Brasil são necessários.

**Palavras-chaves:** Abacaxi, *Ananas comosus*, Controle biológico, Rizobactérias.

## ABSTRACT

**Trocoli, R. O. Potential use of bacteria associated to pineapple (*Ananas spp.*) roots for fusariosis (*Fusarium guttiforme* Nirenberg & O'Donnell) control.**

Pineapple cultivation is an important socio-economic activity in Brazil. However, the fusariosis, a disease caused by *Fusarium guttiforme* Nirenberg & O'Donnell causes losses of 80% and is the most limiting factor for pineapple cultivation. The control of the disease is based on the integration of management practices in which the use of resistant varieties and fungicide application are the measures recommended by Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. Unfortunately, most cultivated varieties are susceptible what leads to the necessity of fungicide spraying. The lack of studies in biological control of fusariosis and the increasing demand for alternative methods to the use of agrochemicals justify this study. The aims of the study were: a) review the scientific knowledge on pineapple and the fusariosis; b) isolate and select bacteria from roots of resistant pineapple genotypes with respect to their capacity to reduce *F. guttiforme* colonization; and c) verify the effects of the selected bacterial isolates on the control of fusariosis under field conditions. A total of 226 bacteria were isolated from the surface or from inside pineapple roots. Twenty-six isolates were able to inhibit the colonization of *F. guttiforme* on a pineapple stem disc assay maintained under controlled conditions. In the field studies a group of five isolates (E053L, E011F2, R183S5, R192MG, and E043F3) significantly reduced disease severity. Among these, isolate E011F2 was the most efficient followed by E011F2, R183S5, R192MG and E043F3. These isolates are potential biocontrol agents of fusariosis and further studies to apply these bacteria in the integrated pineapple cultivation should be done.

**Keywords:** *Ananas comosus*, Biological control, Pineapple, Rhizobacteria.

## INTRODUÇÃO

Com uma produção de 2,52 milhões de toneladas, atualmente o Brasil é o maior produtor mundial de abacaxi. A abacaxicultura é uma atividade de alta relevância sócio-econômica para o País. Todavia, a fusariose, doença causada por *Fusarium guttiforme*, provoca perdas consideráveis constituindo o principal fator limitante da cultura. O controle da doença baseia-se na integração de práticas culturais, onde o uso de variedades resistentes e a aplicação de fungicidas compõem a estratégia recomendada pela Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical.

Entretanto, as principais variedades exploradas comercialmente, a exemplo da 'Pérola' e 'Smooth Cayenne' são suscetíveis, implicando na necessidade da aplicação de fungicidas. Todavia, o uso de agroquímicos tem promovido uma série de problemas de ordem ambiental, como contaminação dos alimentos, do solo, da água, além do surgimento de patógenos resistentes. Consciente disto, a sociedade tem exigido métodos alternativos ao uso de fungicidas.

Dentro das alternativas, o controle biológico vem sendo intensivamente estudado como ferramenta no combate a fitopatógenos associados a culturas de importância econômica. Diversas espécies de microrganismos, incluindo fungos, bactérias e leveduras têm sido descritas como agentes de controle biológico. Por colonizarem eficientemente o sistema radicular de vegetais, as rizobactérias promotoras de crescimento de plantas ("Plant Growth Promoting Rhizobacteria" - PGPRs) são destaque. Como vantagens, o controle biológico apresenta baixo custo e menor impacto ambiental.

No primeiro capítulo deste trabalho foram abordados aspectos da cultura do abacaxi, além de particularidades referentes à fusariose do abacaxizeiro, tais como, etiologia, epidemiologia e controle da doença. Aspectos relacionados ao controle biológico de doenças de plantas, abrangendo histórico, conceitos, agentes de controle biológico, principais mecanismos de ação envolvidos e produtos comerciais à base de microrganismos disponíveis no mercado foram abordados. Adicionalmente, foram discutidas as implicações e perspectivas de uso de microrganismos para o controle de fitopatógenos no Brasil e no mundo.

No capítulo 2, apresentam-se resultados de pesquisa sobre o potencial de uso de bactérias endofíticas e rizobactérias para o controle da fusariose do abacaxizeiro. A hipótese testada fundamenta-se na idéia de que hospedeiros resistentes e que ainda não foram domesticados, teriam alta probabilidade de abrigar microrganismos com potencial de biocontrole. Utilizando esse raciocínio, duzentas e vinte e seis rizobactérias isoladas de genótipos de abacaxizeiro caracterizados como resistentes à fusariose foram testadas em condições controladas e em campo.

Considerando a falta de estudos direcionados ao controle biológico da fusariose do abacaxizeiro, aliada à crescente demanda por métodos alternativos ao uso de agroquímicos, o presente trabalho teve como objetivo verificar o potencial de uso de bactérias associadas ao sistema radicular de genótipos de abacaxizeiros resistentes à fusariose no controle biológico da doença.

---

# CAPÍTULO 1

**Fusariose do abacaxizeiro: Potencial de uso de  
microrganismos como agentes de biocontrole**

---

## RESUMO

### **Trocoli, R. O. Fusariose do abacaxizeiro: Potencial de uso de microrganismos como agentes de biocontrole.**

Foi realizada uma revisão sobre particularidades da cultura do abacaxi e seus problemas fitossanitários com foco na fusariose. Foram também discutidos aspectos sobre o uso e perspectivas do controle biológico de doenças de plantas. Inicialmente foi descrita a classificação botânica da espécie *Ananas comosus* var. *comosus* (L.) Merrill, incluindo seu centro de origem, diversificação e domesticação, bem como as principais variedades comerciais plantadas nas regiões produtoras. Além disso, aspectos sócio-econômicos foram abordados, ressaltando a posição atual do Brasil no *ranking* dos maiores produtores mundiais. Por constituir o principal fator limitante ao desenvolvimento da abacaxicultura, aspectos referentes à fusariose do abacaxizeiro, tais como etiologia, epidemiologia e controle foram cuidadosamente discutidos. A seguir, uma abordagem sobre aspectos relacionados ao controle biológico de doenças de plantas, abrangendo histórico, conceitos, agentes de controle biológico, principais mecanismos de ação envolvidos no biocontrole, e produtos comerciais à base de microrganismos disponíveis no mercado foi realizada. Finalmente, foram levantadas hipóteses sobre o potencial de uso de microrganismos para o controle da fusariose do abacaxizeiro no Brasil, enfatizando a necessidade da realização de trabalhos nesta direção.

**Palavras-chaves:** Abacaxi, *Ananas comosus*, mecanismos de ação, Rizobactérias.

## ABSTRACT

### **Trocoli, R. O. Fusariosis in pineapple: Potential of use of microorganisms as biocontrol agents.**

A comprehensive review about the pineapple crop and its phytosanitary problems focusing on fusariosis is presented. Aspects of the use and perspectives of biological control of plant diseases were also discussed. Details of botanic classification of *Ananas comosus* var. *comosus* (L.) Merrill, center of origin, diversification and domestication, as well as main commercial varieties cultivated in Brazil were described. Furthermore, socioeconomic issues and the current position of Brazil in the world producing rank were presented. As fusariosis is the main limiting factor for pineapple cultivation, aspects such as etiology, epidemiology, and control were carefully detailed. Subsequently, topics of biological control of plant diseases including history, concepts, biocontrol agents, mechanisms of action and microorganism-based commercial products available on the market were described. Finally, hypotheses on the potential use of microorganisms to control pineapple fusariosis were proposed, highlighting the lack of studies and research needs.

**Keywords:** Pineapple, *Ananas comosus*, Mechanisms of action, Rhizobacteria.



### 1.1. O abacaxizeiro: *Ananas comosus* var. *comosus* (L.) Merrill

O abacaxizeiro é uma monocotiledônea, herbácea, perene, pertencente à família Bromeliaceae. São conhecidos, aproximadamente, 56 gêneros e 3.010 espécies desta família. A maioria das espécies de Bromeliaceae é encontrada em condições naturais de regiões tropicais e subtropicais das Américas, e poucas em zonas temperadas (CABRAL et al., 2004; LUTHER, 2004; CLEMENT et al., 2010).

Os primeiros estudos relatam que esta planta é originária da região compreendida entre 15° N e 30° S de latitude e 40° L e 60° W de longitude, correspondendo às zonas central e sul do Brasil, o nordeste da Argentina e do Paraguai (JOHNSON, 1935; SMITH, 1939; COLLINS, 1960). Duval et al. (2001) e Coppens d'Eeckenbrugge & Duval (2009) com base em estudos de diversidade morfológica e marcadores moleculares, propuseram um centro de domesticação e diversificação localizado na Amazônia ocidental ao longo das bacias do Rio Negro e do Rio Orinoco, de onde o cultivo do abacaxi se disseminou para outras regiões do mundo (CLEMENT et al., 2010).

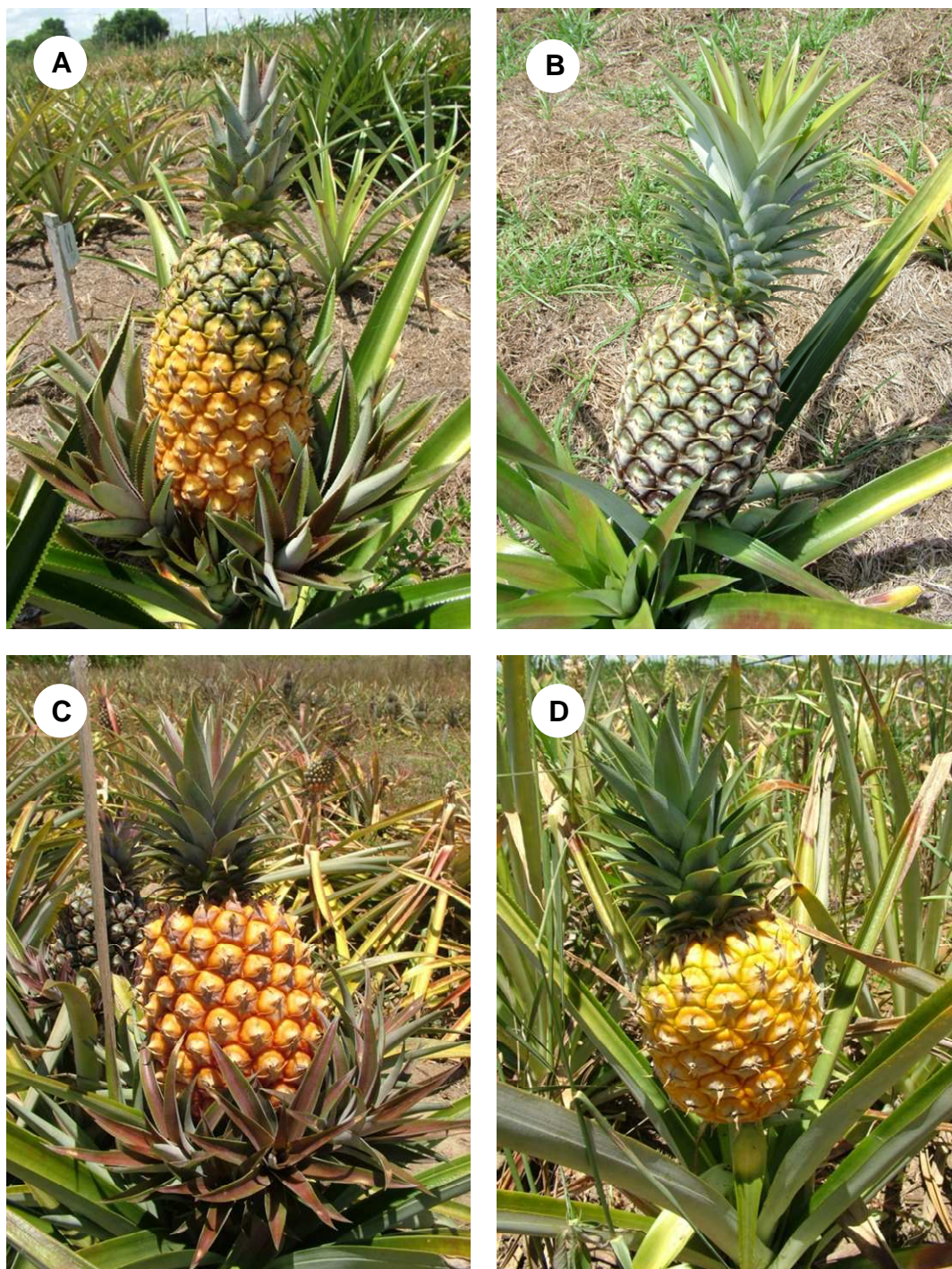
Em relação aos seus hábitos de crescimento, as espécies de abacaxizeiro são divididas em dois grupos distintos: as epífitas, aquelas que crescem sobre outras plantas; e as terrestres, que crescem no solo. Os abacaxis comerciais pertencem ao segundo grupo (COLLINS, 1960; PY et al., 1984; MOREIRA et al., 2006).

A classificação botânica da família Bromeliaceae tem sido freqüentemente revisada. Em 2003, o abacaxi (*Ananas comosus*) e o gravatá de rede (*Pseudananas sagenarius*) foram agrupados e incluídos no gênero *Ananas*, o qual se distingue dos outros pelo fato de suas espécies apresentarem um fruto do tipo sincarpo. Esta nova classificação reconhece apenas um gênero com duas espécies: *Ananas macrodontes*, chamado de gravatá de rede; e *Ananas comosus*, conhecido como ananás ou abacaxizeiro comum. Na espécie *Ananas comosus* estão incluídas cinco variedades botânicas: *Ananas comosus* var. *ananassoides*, *Ananas comosus* var. *paraguayensis*, *Ananas comosus* var. *erectifolius*, *Ananas comosus* var. *bracteatus* e *Ananas comosus* var. *comosus* (COPPENS D'EECKENBRUGGE & LEAL, 2003).

*Ananas comosus* var. *comosus* abrange todas as cultivares plantadas nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (CABRAL et al., 2004). Em plantios comerciais para produção de frutos, as cultivares utilizadas são classificadas em cinco grupos distintos: Cayenne, Spanish, Queen, Pernambuco e Mordilona Perolera (SANEWSKI & SCOTT, 2000; COPPENS D'EECKENBRUGGE & LEAL, 2001).

As principais cultivares utilizadas no mundo são: 'Smooth Cayenne', 'Pérola', 'Perolera', 'Singapore Spanish', 'Queen', 'Primavera', 'Jupi' e 'Golden' (Figura 1). Em geral, a abacaxicultura brasileira é composta por três cultivares, 'Pérola', 'Smooth Cayenne' e 'Jupi'. No entanto, outras variedades têm sido introduzidas em algumas regiões específicas do Brasil, como 'Roxo de Tefé', 'Local de Tefé', 'Alto Turi', 'Quinari', 'Gigante de Tarauacá', entre outras plantadas na região Amazônica (MATOS, 1999; MATOS & REINHARDT, 2009).

No Brasil, híbridos como 'Imperial' (Figura 1), 'Vitória' e BRS Ajubá, têm sido gerados pelo programa de melhoramento genético do abacaxi, coordenado pela Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical (CABRAL & MATOS, 2009a; CABRAL & MATOS, 2009b). Estima-se que 70 % da produção mundial correspondem à 'Smooth Cayenne'. Entretanto, no Brasil, nas principais regiões produtoras há predomínio da cultivar 'Pérola', embora suscetível à fusariose, principal problema da cultura no Brasil.



**Figura 1.** Cultivares comerciais plantadas nas principais regiões produtoras de abacaxi. **(A)** 'Pérola', mais cultivada no Brasil, cerca de 80 % da produção brasileira é proveniente dessa variedade, também conhecida por 'Pernambuco' e 'Branco de Pernambuco', o fruto pesa entre 1 e 2 Kg; **(B)** 'Smooth Cayenne', segunda variedade mais plantada no Brasil, também conhecida como 'Abacaxi Havaiano' e 'Ananás', o fruto pesa entre 1,5 e 2,5 Kg; **(C)** 'Imperial', híbrido resistente à fusariose, gerado pelo programa de melhoramento genético de abacaxi da EMBRAPA (CNPMPF), obtido a partir do cruzamento entre as cultivares 'Perolera' e 'Smooth Cayenne', em média o fruto pesa 1,7 Kg; e **(D)** 'Golden', recentemente introduzida nas principais regiões produtoras do Brasil, inclusive no Estado da Bahia, também conhecida por 'MD2', 'Gold', 'Extra Sweet' e 'Premium'.

## 1.2. A abacaxicultura: Aspectos sócio-econômicos

Atualmente, o Brasil é o maior produtor mundial de abacaxi. O País produziu 2,52 milhões de toneladas de frutos colhidos em torno de 65.982 hectares. A região Nordeste é responsável por aproximadamente 46,02 % da produção nacional, seguida pelas regiões Sudeste (25,28 %), Norte (20,72 %), Centro-oeste (7,09 %) e Sul (0,89 %), (IBGE, 2008).

A atividade agrícola exerce importante papel socioeconômico onde é praticada, contribuindo para geração de emprego e renda, além da fixação do homem no campo (MATOS & REINHARDT, 2009).

O Estado da Bahia ocupa a posição de quarto produtor nacional, sendo sua produção inferior à dos Estados da Paraíba localizado na região Nordeste, Minas Gerais (Sudeste) e Pará (Norte), primeiro, segundo e terceiro maiores produtores, respectivamente. Na Bahia, a abacaxicultura é praticada em diversas regiões. Com aproximadamente 25 % da produção estadual de abacaxi, o município de Itaberaba, localizado no semi-árido baiano, é o maior produtor deste Estado, colocando em circulação aproximadamente 10 milhões de reais por ano (IBGE, 2010).

Apesar de o Brasil ocupar a posição de maior produtor mundial de abacaxi e da expansão da área plantada nos últimos anos, a produtividade da abacaxicultura brasileira é considerada baixa, com valor médio igual a 38,14 t.ha<sup>-1</sup> (IBGE, 2008). Entre os principais produtores, o Estado de Minas Gerais apresenta rendimento em torno de 43,36 t.ha<sup>-1</sup>, seguido pelos Estados da Paraíba 43,21 t.ha<sup>-1</sup>, Pará 35,42 t.ha<sup>-1</sup> e Bahia 37,04 t.ha<sup>-1</sup> (IBGE, 2010). Em outros países produtores como Indonésia, sétimo maior produtor mundial, a produtividade média é em torno de 61,1 t.ha<sup>-1</sup> (FAOSTAT, 2010).

Vários aspectos são atribuídos à baixa produtividade da abacaxicultura brasileira, por exemplo, fatores ambientais adversos, práticas culturais inadequadas e principalmente problemas fitossanitários. No Brasil, a doença denominada como fusariose do abacaxizeiro, causada pelo fungo *Fusarium guttiforme* (NIRENBERG & O'DONNELL, 1998), é o principal fator limitante da cultura (MATOS & REINHARDT, 2009).

Na Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical (CNPMPF) pesquisas têm sido desenvolvidas com o objetivo de buscar alternativas de controle desta doença. A integração de práticas culturais que desfavoreçam o ataque do patógeno, associadas ao uso de cultivares resistentes, é a estratégia recomendada pelo CNPMPF para o controle da doença.

### **1.3. Fusariose do abacaxizeiro: Etiologia, epidemiologia e controle**

No Brasil, a fusariose do abacaxizeiro foi constatada pela primeira vez em 1962 no Estado de São Paulo, infectando frutos da cultivar 'Smooth Cayenne' (KIMATI & TOKESHI, 1964). Desde então, a fusariose está presente em praticamente todas as regiões produtoras do país, constituindo a doença mais destrutiva da cultura.

Além de o Brasil, o patógeno já foi detectado em plantios de abacaxi na Bolívia (MATOS et al., 1992; MATOS & SANCHES, 2009), Havaí, África do Sul, Argentina (ROHRBACH & TANIGUSHI, 1984), Cuba (LESLIE & SUMMERELL, 2006), e em frutos comercializados no Chile (MONTEALEGRE & LUCHSINGER, 1990).

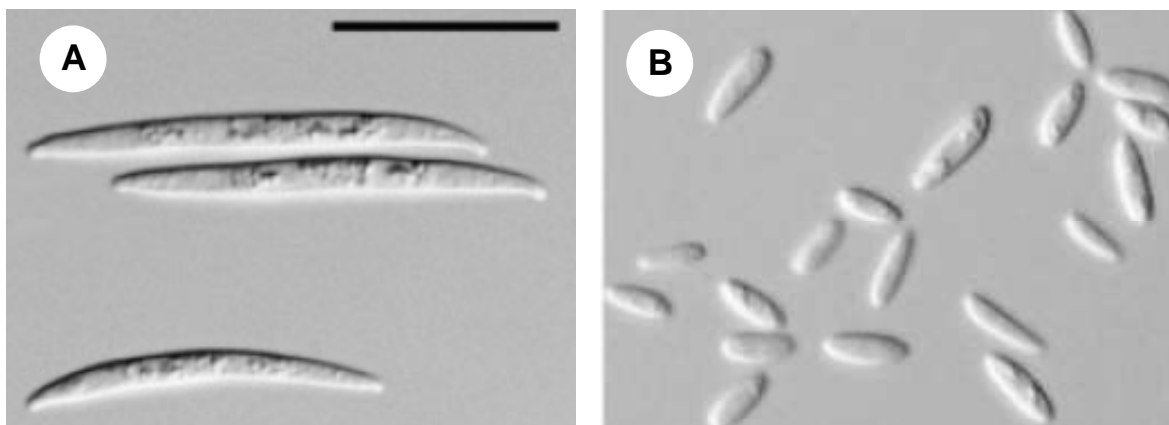
Em plantios onde há ocorrência de fusariose as perdas em produção de frutos de abacaxi podem atingir níveis de até 80 %, a depender da cultivar, da região produtora, bem como da época de plantio. Aproximadamente 40 % do material de plantio pode ser infectado, e cerca de 20 % das plantas atacadas podem morrer antes da colheita. A situação agrava-se ainda mais devido ao fato que as cultivares mais plantadas, como, 'Smooth Cayenne', 'Golden', 'Red Spanish', 'Queen' e principalmente 'Pérola', a mais cultivada no Brasil, são suscetíveis ao patógeno (MATOS, 1999; MATOS & REINHARDT, 2009; MATOS & SANCHES, 2009).

#### **1.3.1. Agente causal**

O Agente causal da fusariose do abacaxizeiro é o fungo *Fusarium guttiforme* (NIRENBERG & O'DONNELL, 1998). Também são sinônimas de *F. guttiforme*:

*Fusarium subglutinans* Nelson, Tousson & Marasas comb. nov.; *Fusarium moniliforme* Sheld var. *subglutinans* WR & GR; *Fusarium sacchari* (Butter) Gams var. *subglutinans*; *Fusarium moniliforme* Sheldon emend., (MATOS, 1999). A fase teleomórfica denominada *Gibberella fujikuroi* (Saw.) Wollenw. var. *subglutinans* Edw. ainda não foi detectada naturalmente sobre abacaxi (LESLIE & SUMMERELL, 2006).

Em condições de laboratório *F. guttiforme* apresenta inicialmente crescimento micelial branco, que passa a róseo-alaranjado, mas algumas vezes observa-se coloração violeta. O fungo produz dois tipos de esporos. O primeiro é representado pelos microconídios com formato oval produzidos abundantemente em falsas cabeças no micélio aéreo. Os macroconídios apresentam parede delgada e formato cilíndrico (Figura 2). A produção de microconídios em polifiálides sempre em falsas cabeças e a ausência de clamidósporos são características marcantes de *F. guttiforme* (NELSON et al., 1983; MATOS, 1999; LESLIE & SUMMERELL, 2006).



**Figura 2.** Tipos de esporos produzidos por *Fusarium guttiforme*. **(A)** Macroconídios; **(B)** Microconídios. Escala = 25  $\mu$ m. Fotos: Suzanne Bullock (The Fusarium Laboratory Manual, LESLIE & SUMMERELL, 2006).

Com a chegada dos propágulos do patógeno na superfície do abacaxizeiro, *Fusarium guttiforme* inicia a interação com o hospedeiro. Nas inflorescências, os principais sítios de infecção são representados pelas flores abertas. Para mudas, plantas e frutos, ferimentos mecânicos na superfície do hospedeiro, provenientes do crescimento natural da planta ou resultante da ação de fatores bióticos e

abióticos, também constituem sítios de infecção para *F. guttiforme*. Mudanças tipo filhote aderidas à planta-mãe, são infectadas naturalmente (MATOS, 1978).

Entre a quarta e a décima semana após a indução floral, as inflorescências encontram-se no período de maior suscetibilidade à *F. guttiforme*. Nas mudas tipo filhote, esse mesmo período de suscetibilidade ocorre entre a primeira e a quarta semana após a indução floral (MATOS, 1999). No entanto, até o momento, os eventos que se sucedem à chegada do patógeno na superfície do hospedeiro, tais como, germinação, penetração e colonização dos tecidos, inerentes ao patossistema *F. guttiforme* x abacaxizeiro, ainda não foram documentados, isto, em decorrência da escassez de estudos epidemiológicos e histopatológicos com essa finalidade.

O patógeno apresenta capacidade para sobreviver em material propagativo, em restos culturais e em plantios abandonados, especialmente naqueles onde a incidência da doença tenha sido elevada. Mudanças infectadas, as quais não foram descartadas na seleção pré-plantio, constituem as fontes iniciais de inóculo no campo. Além disso, *F. guttiforme* pode sobreviver na superfície das folhas sem causar infecção. Essa capacidade de sobrevivência no filoplano garante a presença de inóculo antes dos sítios de infecção se apresentarem favoráveis à penetração e colonização do patógeno (MATOS, 1987; MATOS & REINHARDT, 2009).

Em contraste, a ausência de estruturas de resistência como clamidósporos, limita sua sobrevivência no solo na ausência do hospedeiro. Aliado a isto, o fato de mudas sadias não apresentarem infecção pelo patógeno, mesmo quando plantadas em áreas com histórico da doença, reforça a hipótese que o solo é um veículo inexpressivo na sobrevivência de *F. guttiforme* (MATOS, 1999).

Uma vez presente em determinada região, propágulos de *F. guttiforme* podem ser disseminados pelo vento, chuva ou ainda por alguns insetos. De fato, a movimentação de material propagativo infectado pelo patógeno constitui-se como principal veículo de disseminação da fusariose do abacaxizeiro, tanto em curtas quanto em longas distâncias. Dessa maneira, a doença tem atingido e se espalhado pelas principais regiões produtoras de abacaxi do Brasil.

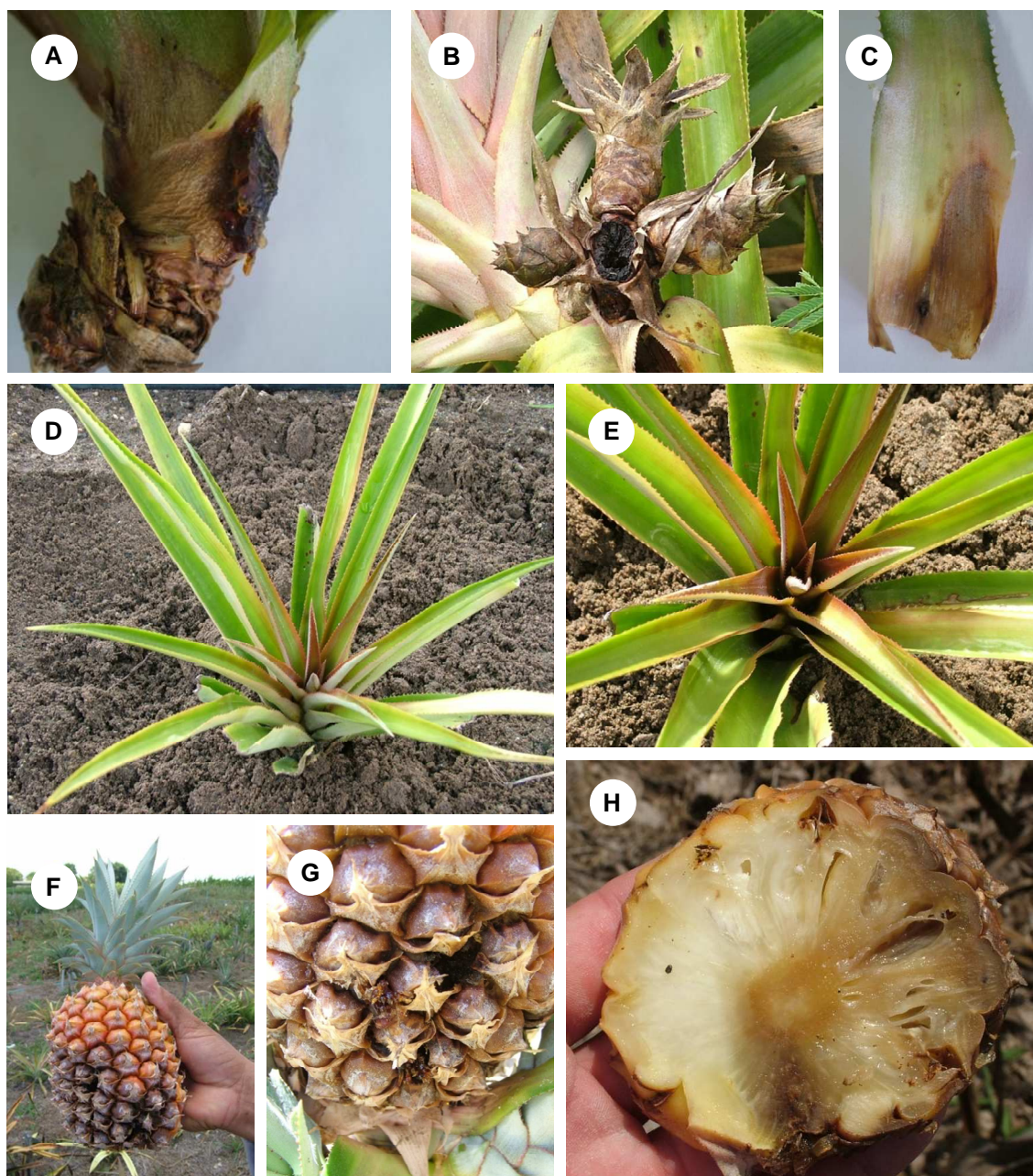
### 1.3.2. Sintomas

*Fusarium guttiforme* pode infectar todas as partes do hospedeiro (MATOS & REINHARDT, 2009), provocando exsudação de uma substância gomosa através dos tecidos infectados. Nas plantas, assim como nas mudas, a infecção se localiza no talo, progredindo para a base aclorofilada das folhas, restringindo-se a essa região. Nos frutos, onde a infecção ocorre pelas flores abertas, os sintomas caracterizam-se pela exsudação de goma através das cavidades florais, e internamente, a polpa apresenta-se apodrecida (MATOS, 1999), (Figura 3).

Além disso, as plantas infectadas também podem expressar sintomas externos, tais como: curvatura e encurtamento do talo; modificações na filotaxia, aumentando o número de folhas por espiral; redução no comprimento das folhas, e no desenvolvimento geral da planta; morte do meristema apical; modificações na arquitetura da planta que passa a ter a aparência de funil; e clorose (MATOS, 1999).

Em geral, a lesão incitada pelo patógeno no talo da planta reduz a condução de água, sais minerais e fotossintatos, resultando progressivamente em enfezamento, clorose, murcha e morte do hospedeiro. O odor semelhante à fermentação de açúcar presente no tecido lesionado é outra característica peculiar da infecção do patógeno (PISSARRA et al., 1979). Sobretudo, as mudas, especialmente do tipo filhote, quando submetidas à alta intensidade de ataque podem morrer e secar ainda aderidas a planta mãe (MATOS, 1999), (Figura 3).





**Figura 3.** Alguns sintomas da fusariose do abacaxizeiro em mudas, plantas e frutos. **(A)** muda infectada apresentando exsudação de resina; **(B)** mudas secas e mortas ainda aderidas à planta mãe; **(C)** folha de abacaxizeiro 'Pérola' apresentando infecção na base aclorofilada; **(D)** "abertura" da roseta central; **(E)** planta com alteração na filotaxia; **(F)** fruto apresentando coloração amarronzada externamente; **(G)** exsudação de substância gomosa a partir de frutinhos infectados; **(H)** fruto com polpa apodrecida internamente.

### 1.3.3. Controle

O manejo integrado da doença, o qual envolve o emprego simultâneo ou seqüencial de diversas ações de controle, por exemplo, ações biológicas, culturais, genéticas, físicas e químicas, tem sido a estratégia recomendada pela Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical para o controle da fusariose do abacaxizeiro. O controle integrado da fusariose tem como objetivo principal reduzir a incidência de doença a um nível de dano aceitável (MATOS & CABRAL, 2005).

Nesse sentido, o controle da doença baseia-se na integração de várias práticas. Redução do inóculo inicial por meio da utilização de material propagativo sadio, uso de variedades resistentes, monitoramento e erradicação de plantas infectadas durante o ciclo vegetativo e tratamento de indução floral em época que possibilite o desenvolvimento do fruto sob condições desfavoráveis à incidência do patógeno (princípio de escape) estão entre as principais práticas utilizadas. Dentro deste programa, inclui-se também a aplicação de fungicidas para proteção das inflorescências em desenvolvimento (MATOS, 1999; MATOS & REINHARDT, 2009). Todavia, o uso de fungicidas para o controle de doenças de plantas, tem promovido diversos problemas de ordem ambiental. A contaminação dos alimentos, do solo, da água e dos animais, bem como o surgimento de patógenos resistentes são aspectos de suma importância. O desequilíbrio biológico proporcionado pela aplicação intensiva de agroquímicos na agricultura causa alterações significativas na ciclagem de nutrientes e de matéria orgânica, ocasiona a eliminação de organismos benéficos e contribui para a redução da biodiversidade (NORDLUND, 1996; MORANDI & BETTIOL, 2009).

O aumento dos custos de produção é outro fator que contribui negativamente para o uso de defensivos químicos. Em plantio comercial de abacaxi o custo com fungicida para o controle da fusariose do abacaxizeiro é em torno de R\$670 / ha / aplicação (Comunicação pessoal, Aristóteles P. de Matos)<sup>1</sup>.

Considerando a necessidade de se reduzir o emprego de agroquímicos nos plantios comerciais, novas alternativas de controle de doenças têm sido

---

<sup>1</sup> Aristóteles Pires de Matos, Pesquisador da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical.

pesquisadas. Dentre elas, o controle biológico vem sendo intensivamente estudado como ferramenta no combate a diversos fitopatógenos associados a culturas de importância econômica (BAKKER, et al., 2007; KANG et al., 2007; PIETERSE & VAN LOON, 2007; LIU et al., 2009; WALTERS, 2009; SHARMA et al., 2009; ZHAO et al., 2010). Dentro desse contexto, a abacaxicultura brasileira com sua reconhecida relevância sócio-econômica também está inserida. Pois, é indispensável buscar novos métodos de controle da fusariose com baixo custo e menor agressividade ao meio ambiente. Dentre eles, o uso de microrganismos para o controle da doença constitui uma alternativa viável e promissora.

A integração do emprego de agentes de biocontrole às práticas de manejo recomendadas pelo CNPMF pode constituir-se em uma ferramenta adicional no manejo integrado da doença. Entretanto, até o momento, é inegável a ausência de pesquisas destinadas ao controle biológico da fusariose do abacaxizeiro.

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

##### **1.4.1. Breve histórico e conceitos**

Os relatos empíricos de controle biológico de doenças de plantas datam desde 5.000 anos antes de Cristo, quando os egípcios intuitivamente desfavoreciam a sobrevivência de *Sclerotium cepivorum* em cebola a partir das cheias cíclicas do rio Nilo (COOK & BAKER, 1983). Por volta de 4.000 a.C., quando a produção era considerada baixa, os chineses tinham o hábito de deixar o solo em pousio, fazendo com que a microbiota benéfica presente no solo fosse estimulada. Também de forma intuitiva, a civilização Maia a 1.000 a.C, reduzia a infestação de nematóides em seus plantios cultivando plantas de cravo-de-defunto entre as fileiras (ROMEIRO, 2007a).

Os primeiros estudos envolvendo a aplicação consciente de antagonistas para o controle de doenças de plantas foram realizados entre os anos de 1920 e 1940. Hartley (1921) objetivando controlar o tombamento de mudas de essências florestais, causado por *Pythium*, aplicou no solo treze fungos previamente selecionados *in vitro* como potenciais antagonistas. Millard & Taylor (1927) relatam a redução da severidade da sarna comum em batata, causada por

*Streptomyces scabiens*, a partir da aplicação de *S. precox* por meio de fragmentos de grama. Anos depois, Henry (1931) selecionou e adicionou a solo esterilizado, isolados de actinomicetos, bactérias e fungos, os quais promoveram proteção relativa a plantas de trigo contra *Helminthosporium sativum* e *Fusarium graminearum*. Esse experimento foi o primeiro relato bem sucedido da aplicação de antagonistas no solo. Nesse mesmo ano, o termo “controle biológico” foi empregado pela primeira vez por Sanford & Broadfoot, em virtude da promoção do efeito “supressivo do solo” a partir da aplicação de antagonistas (BAKER, 1987).

Em todo o mundo, a partir de 1940 foi dada grande ênfase às pesquisas com agentes de controle biológico. No Brasil, em 1950, foi publicado o primeiro artigo sobre o tema por Reinaldo Foster. O pesquisador do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), inativou o vírus do mosaico comum do fumo por meio da aplicação de filtrado de culturas de *Trichoderma* spp. (MORANDI & BETTIOL, 2009).

Na mesma década, nos anos 50 e 60 foram iniciados os trabalhos com microrganismos procariotos (ROMEIRO, 2007a). Dentre eles, destaca-se as pesquisas pioneiras realizadas na China por Yin et al. (1957, 1965). Os autores estudando uma coleção de 4.000 actinomicetos isolados de raízes de algodão e alfafa, os quais apresentavam potencial atividade antagônica *in vitro* contra *Verticillium albo-atrum* e *Rhizoctonia solani*, selecionaram uma cultura de *Streptomyces* sp. a qual denominaram de cepa 5406. Esta cepa foi utilizada em plantios comerciais durante duas décadas promovendo redução da severidade dos dois patógenos.

A partir da década de 1970 diversos grupos de pesquisa envolvendo controle biológico de doenças de plantas foram formados em várias partes do mundo, tais como: Broadbent et al. (1971, 1977) relataram o uso de rizobactérias tanto como agentes de controle biológico quanto promotoras de crescimento de plantas; Kerr (1980, 1984), Universidade de Adelaide, Austrália, descreveu o primeiro caso de controle biológico de uma bacteriose de planta em nível de campo; Kloepper et al. (1981) e Schroth & Becker (1990), nos EUA, também relataram o potencial de rizobactérias, principalmente do gênero *Pseudomonas*,

para o controle biológico de doenças de plantas, bem como promotoras de crescimento; Na China, Chen et al. (1996) descreveram o uso de rizobactérias como prática agrônômica rotineira desde 1960, promovendo ativação de defesa das plantas além da promoção de crescimento.

Atendendo à necessidade de buscar novas alternativas de controle, o controle biológico de doenças de plantas, reconhecidamente se transformou em uma das linhas de pesquisa mais estudadas em todo mundo entre os fitopatologistas. Atualmente, no mundo, milhares de trabalhos têm sido publicados sobre o tema, os quais envolvem isolamento, seleção e formas de aplicação de microrganismos benéficos.

Conceitualmente o controle biológico de doenças de plantas pode ser definido como sendo o controle de um patógeno por meio de outro microrganismo (BETTIOL, 1991a). Entretanto, conceitos mais amplos são atribuídos. Dentre várias definições, para Cook & Baker (1983), controle biológico é *“a redução da soma de inóculo ou das atividades determinantes da doença, provocada por um patógeno, realizada por um ou mais organismos que não o homem”*.

As atividades determinantes são representadas por algumas características intrínsecas ao patógeno, como, crescimento, infectividade, virulência, agressividade, além de processos que influenciam a infecção, desenvolvimento de sintomas e reprodução. Os organismos abrangem tanto indivíduos quanto populações avirulentas ou hipovirulentas dentro das espécies patogênicas, além de antagonistas do patógeno (COOK & BAKER, 1983).

Na abordagem de controle biológico, doença é mais do que uma íntima interação entre patógeno e hospedeiro sob a influência do meio ambiente. É o resultado da interação entre o hospedeiro, o patógeno e uma diversidade de não-patógenos que também habitam o sítio de infecção (COOK & BAKER, 1983; COOK, 1985). Nas relações ecológicas entre microrganismos, os não-patógenos apresentam potencial para limitar ou aumentar a atividade de outros microrganismos, incluindo patógenos. Sobretudo, podem atuar como naturais indutores de resistência em plantas.

Em relação ao efeito que causam às plantas, os microrganismos do solo podem ser divididos em benéficos, prejudiciais ou neutros (SCHIPPERS et

al.,1987). Os benéficos, por promoverem crescimento de plantas e/ou protegê-las contra fitopatógenos, são denominados por PGPR- *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria* (KLOEPPER et al.,1990). Também foi utilizado o termo YIB- *Yield Increasing Bacteria* para designar o mesmo grupo de rizobactérias (CHEN et al., 1996).

#### 1.4.2. Agentes de controle biológico

Independente do mecanismo de ação diversos agentes tem sido relatados no controle biológico de doenças de plantas, como, extratos vegetais (LATHA et al., 2009), indutores abióticos (WIESE et al., 2004), insetos (HATCHER & PAUL, 2000), nematóides (KOSAKA et al., 2001), e microrganismos (BAKKER et al., 2007).

Os microrganismos mais relatados como agentes de controle biológico são: fungos, principalmente do gênero *Trichoderma* sp. (WALTERS & DANIELL, 2007; COLLEEN & SINGH, 2009); micorrizas (POZO & AZCÓN-AGUILAR, 2007; LIU et al., 2007); rizobactérias promotoras de crescimento e biocontroladoras de fitopatógenos (PIETERSE & VAN LOON, 2007; WALTERS & DANIELL, 2007; WALTERS, 2009); bactérias do gênero *Bacillus* spp. (LIU et al., 2009); *Pseudomonas* spp. (KANG et al., 2007); *Streptomyces* sp. (LEHR et al., 2008).

Além de *Bacillus* e *Pseudomonas*, dentre os gêneros de bactérias mais estudados para o controle biológico, ainda pode-se citar, *Acinetobacter*, *Acetobacter*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Burkholderia*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Hydrogenophaga*, *Pantoea* e *Serratia* (KLOEPPER et al.,1988; OLIVEIRA et al., 2003; TROTEL- AZIZ et al., 2008). Adicionalmente, bactérias endofíticas que vivem em associação com plantas, colonizando o interior de tecidos vegetais, também têm sido relatadas como importantes agentes de biocontrole, promovendo resultados satisfatórios na supressão de doenças associadas a diversas culturas de importância econômica (BACON & HINTON, 2001). Dentre os microrganismos utilizados no controle biológico, as rizobactérias, por colonizarem eficientemente o sistema radicular de plantas, são destaque (PIETERSE & VAN LOON, 2007).

### 1.4.3. Rizobactérias como agentes de biocontrole

Rizobactérias têm sido testadas como agentes de biocontrole em uma extensa variedade de patossistemas, tais como: algodão x *Xanthomonas axonopodis* (ISHIDA et al., 2008); banana x *Banana bunchy top virus* (HARISH et al., 2009); batata x *Fusarium oxysporum* (KOTAN et al., 2009); cacau x *Moniliophthora perniciosa* (SILVA, 2007); café x *Hemileia vastatrix* (SILVA et al., 2008); eucalipto x *Rhizoctonia solani* (MAFIA et al., 2009); feijão x *Rhizoctonia solani* (AHMADZADEH & SHARIFI-TEHRANI, 2009); manga x *Colletotrichum gloeosporioides* (KEFIALEW & AYALEW, 2008); tomate x *Alternaria solani* (SILVA et al., 2004); trigo x *Gaeumannomyces graminis* (LIU et al., 2009); videira x *Plasmopara viticola* (PERAZZOLLI et al., 2008); entre outras.

Kotan et al. (2009) relatam a eficiência de *Burkholderia cepacia* (OSU 7) contra três espécies de *Fusarium*, (*F. oxysporum*, *F. culmorum* e *F. sambucinum*), reduzindo o diâmetro da colonização em tubérculos de batata em até 80 %. Com base em outros estudos, os autores atribuem esse comportamento a capacidade de *B.cepacia* produzir compostos antimicrobianos, como, pirrolnitrina, sideróforos, cepacinina e lipopeptídeos, ressaltando que esses metabólitos apresentam atividade contra fungos, leveduras e bactérias (STEPHAN et al., 1993; KANG et al., 1998; HWANG et al., 2002). Afirmam ainda que *B. cepacia* OSU 7 possui largo espectro de ação contra diversos fitopatógenos em várias culturas, sobretudo, apresenta grande potencial na supressão de doenças de plantas causadas por patógenos de solo. Os autores afirmam que *B. cepacia* OSU 7 apresenta elevado potencial de controle no manejo de espécies de *Fusarium* que causam podridão em batata.

Byrne et al. (2005) estudando o potencial de rizobactérias para o controle da mancha bacteriana em tomate causada por *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, relataram 40 % de redução da doença a partir do tratamento com *Bacillus macerans*. O isolado A506 (*Pseudomonas fluorescens*) promoveu redução de 39,5 %, seguido por B41 (*Pseudomonas mendocina*) 37 %, Cit7 (*Pseudomonas syringae*), B52 (*Pseudomonas putida*) 30,5 % e B36 (*Bacillus thuringiensis*) 29,2 %. Os autores afirmam que tal comportamento indica eficiência

moderada dos agentes para o controle da doença, constituindo uma alternativa viável.

#### **1.4.4. Mecanismos de ação**

A capacidade das rizobactérias de controlar fitopatógenos está associada ao fato desses microrganismos poderem atuar por meio de vários mecanismos de ação. De forma direta, promovem antibiose, parasitismo, predação, competição por nutrientes e sítios de alimentação. Indiretamente, podem induzir resistência em plantas por meio de estímulos bioquímicos. Na maioria dos casos de controle biológico de fitopatógenos, dois ou mais desses mecanismos podem ocorrer simultaneamente (VAN LOON et al., 1998; RAMAMOORTHY et al., 2001; PIETERSE et al., 2005; WALTERS, 2009). A seguir, alguns dos principais mecanismos serão apresentados.

##### **1.4.4.1. Resistência sistêmica**

É sabido que todas as plantas possuem naturalmente mecanismos de defesa contra patógenos, os quais podem ser ativados por elicitores bióticos ou abióticos (VALLAD & GOODMAN, 2004). A indução de resistência a partir de estímulos bioquímicos ativa diretamente o sistema de defesa da planta condicionando-a para expressar os genes envolvidos neste mecanismo. Uma vez induzidas, as plantas reagem mais rapidamente e com mais eficiência às tentativas de colonização de patógenos virulentos (da ROCHA & HAMMERSCHMIDT, 2005; WALTERS et al., 2005; HAMMERSCHMIDT, 2007; BAKKER et al., 2007). Assim, diz-se que a planta foi levada ao estado de indução, estado este denominado por Sticher et al., 1997 de “condicionamento” ou “sensibilização”.

A resistência induzida pode ser expressa sistemicamente na planta ou localmente em tecidos e órgãos que receberam o tratamento. O contato entre o elicitador e os tecidos da planta desencadeia a síntese de substâncias que agem como sinais bioquímicos, difundindo-se pela planta e ativando os genes de



resistência até então inativos (STICHER et al., 1997; VAN LOON et al., 1998; BECKER & SPOEL, 2006; WALTERS, 2009). Segundo Ryals et al. (1996), existem dois tipos principais de resistência induzida: Resistência Sistêmica Adquirida (*Systemic Acquired Resistance* - SAR), e Resistência Sistêmica Induzida (*Induced Systemic Resistance* - ISR).

SAR pode ser descrita como uma reação sistêmica de defesa das plantas. A ativação do sistema ocorre por meio de um processo natural mediado pelo acúmulo de ácido salicílico (SA) e de proteínas relacionadas à patogênese (PRs). O tratamento de plantas com elicitores de SAR propicia alterações na formação de papila, lignificação da parede celular, produção de espécies reativas de oxigênio, reação de hipersensibilidade, expressão de proteínas relacionadas com a patogênese e acúmulo de metabólitos antimicrobianos (HAMMERSCHMIDT, 1999; SIEGRIST et al., 2000; DURRANT & DONG, 2004; PIETERSE & VAN LOON, 2007).

Em contraste, ISR é ativado usualmente por microrganismos não patogênicos. Ao contrário do mecanismo SAR, neste caso não há acúmulo de proteínas relacionadas com a patogênese, bem como a planta não apresenta alterações visuais. A ativação da resistência sistêmica induzida é principalmente mediada pelo acúmulo de ácido jasmônico e etileno, que são consideradas moléculas chaves da rota de tradução de sinais deste mecanismo. No mecanismo ISR, o gene *npr1* é relatado como importante componente envolvido na restrição do crescimento do patógeno no local da infecção (DURRANT & DONG, 2004; PIETERSE & VAN LOON, 2007; ROMEIRO & GARCIA, 2009).

De fato, parece ser consensual que SAR e ISR são fenômenos distintos quanto aos seus mecanismos bioquímicos de ação, bem como ao tipo de indutores. Entretanto, são semelhantes quanto ao resultado fenotípico final, o qual se expressa sob forma de indução de resistência, com caráter sistêmico, sendo efetivos contra um amplo espectro de patógenos (ROMEIRO & GARCIA, 2009). Contudo, considerando que resistência pode ser induzida por uma ampla variedade de agentes, é provável que existam outras formas de resistência induzida. Por exemplo, por meio do ácido  $\beta$ -aminobutírico, "BABA" (WALTERS, 2009).

#### 1.4.4.2. Antibiose

Antibiose é a produção de substâncias bactericidas, fungicidas e nematicidas, sendo esse um dos mais importantes mecanismos de ação das rizobactérias (MELO & AZEVEDO, 1998; KANG et al., 1998; HWANG et al., 2002). Os antibióticos são compostos orgânicos de baixo peso molecular que, em baixas concentrações, são deletérios ao crescimento ou às atividades metabólicas de outros organismos (FRAVEL, 1988; PATEL et al., 2009).

Existe uma ampla diversidade de antibióticos produzidos pelas PGPRs. Compostos como, fenazinas, pioluteorinas, pirrolnitrinas, tropolonas, piocianinas, oomicina, antranilatos, amônia, pioverdinas, pioquelinas, 2,4 diacetilfloroglucinol (2,4-DAPG) e lipopeptídeos cíclicos (CHIN-A-WOENG et al., 2003).

Além destas, existem outras substâncias envolvidas na antibiose, tais como: as herbicolinas A, B, O e I (ISHMARU et al., 1988); as pantocinas A e B, excretadas por *Pantoea agglomerans* (WRIGHT & BEER, 1996); agrocina 84 (KERR, 1980); peptídeos e aminoglicosídeos (WELLER, 1988); zwittermicina e kanosamina produzidas por *Bacillus cereus* (LYVER et al., 1998).

Duffy et al. (2004) relatam que a produção de 2,4-DAPG por *Pseudomonas aureofaciens* (Q2-87) é seu principal mecanismo de biocontrole de *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. 2,4-DAPG é um membro da classe de compostos floroquinolina e pode atuar na ruptura da membrana do fungo. Adicionalmente, bactérias capazes de sintetizar tal composto podem ativar a indução de resistência sistêmica em plantas (PIERSON et al., 1998). Mutantes defectivos para a produção de 2,4-DAPG mostraram ter perdido a habilidade de inibir *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici in vitro*, comprovando a real atividade antifúngica deste antibiótico (VICENT et al., 1991; TSAI et al., 2004).

As fenazinas são moléculas heterocíclicas nitrogenadas, das quais mais de 60 diferentes derivados têm sido identificados (ZAGO et al., 2000). Possuem largo espectro de ação contra fungos e em menor grau contra bactérias. São produzidas principalmente por bactérias dos gêneros *Pseudomonas*, *Nocardia* e *Burkholderia* (CHIN-A-WOENG et al., 2003). As duas principais fenazinas relatadas no controle biológico de doenças de plantas são: fenazina-1-carboxilato (PCA) e a fenazina-1-carboxamida (PCN).

Isolados de *Pseudomonas aureofaciens* produtores de PCA apresentaram efeito antagônico contra *Gaeumannomyces graminis var. tritici* (PIERSON et al., 1998). A ação antifúngica das fenazinas é resultado da associação destas com a membrana da hifa. Assim, atuam como compostos redutores, provocando o desacoplamento da fosforilação oxidativa e causando o acúmulo de radicais superóxido e peróxidos, os quais são tóxicos às células fúngicas (PIERSON et al., 1998).

#### 1.4.4.3. Sideróforos

A produção de sideróforos é outro importante mecanismo de ação utilizado pelas rizobactérias para o controle de fitopatógenos. Sideróforos (do grego: “carreadores de ferro”) são compostos de peso molecular entre 400 e 2000 Da, quelantes de ferro, produzidos pela maioria das bactérias sob condições limitantes desse elemento. A função do sideróforo envolve o transporte de ferro através da membrana celular. A entrada do ferro no citoplasma somente acontece depois que o mesmo é reduzido e/ou desmembrado de seu ligante (NEILANDS, 1995).

Assim, como estratégia para a obtenção de ferro, as bactérias sintetizam sideróforos que se ligam ao ferro e o transportam para dentro da célula, sendo que esse elemento é primordial para alguns processos celulares (PATRIARCA et al., 2002). Desta forma, reconhecidamente, a quelação do ferro é vital para a sobrevivência de microrganismos, incluindo fitopatógenos, bem como é determinante para sua virulência (GEHRING et al., 1998).

Por exemplo, espécies pertencentes ao grupo das *Pseudomonas* spp. produzem sideróforos verde-amarelados, fluorescentes, solúveis em água, como a pioverdina, cujo nome comum é pseudobactina. De fato, esse composto apresenta alta afinidade com  $Fe^{+++}$ , tornando-o menos disponível a outros microrganismos incapazes de produzir agentes similares de transporte de ferro, ou cuja produção é comparativamente menor, ou ainda que produzam sideróforos, porém com menos afinidade por ferro em relação aqueles produzidos por PGPRs. Dessa maneira, as rizobactérias produtoras de sideróforos fixam

Fe<sup>+++</sup>, desfavorecendo a sobrevivência de fitopatógenos, reduzindo a população destes e criando um ambiente mais favorável para o crescimento das raízes de plantas (KLOEPPER et al., 1980; LUZ, 1996).

Wei & Zhang (2006) relatam a produção de sideróforos por *Pseudomonas fluorescens*, atribuindo a este potencial, a sua habilidade no controle biológico contra a doença *take-all* em trigo. Sobretudo, estudos para comprovar se a supressão de doenças era causada pela produção de sideróforos já foram bem documentados. Kloepper et al. (1980) demonstraram em experimentos controlados, que a adição de ferro, na forma de etilenodiamina tetracetato de Fe<sup>+++</sup> (Fe EDTA), aboliu a ação antagonista *in vitro* de potenciais agentes de biocontrole.

#### **1.4.5. Produtos comerciais à base de microrganismos**

No mundo, existem diversos produtos biológicos disponíveis comercialmente para o controle de doenças de plantas (Tabela 1). Dentre eles, destacam-se o Serenade<sup>®</sup> (*Bacillus subtilis*) e Sonata<sup>®</sup> (*Bacillus pumilus*), ambos registrados no *Environmental Protection Agency* (EPA) dos Estados Unidos. Entretanto, a maioria dos produtos utilizados mundialmente não é registrada nos órgãos federais do Brasil, como MAPA (Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento), ou ainda encontram-se em processo de registro (AGOSTINO & MORANDI, 2009).

O Serenade<sup>®</sup> é recomendado para o controle da sigatoka-negra em bananeira; mancha bacteriana, pinta- preta e oídio em tomate e pimentão; antracnose em manga; mofo branco em feijão; oídio em uva; podridão de *Erwinia* em maçã; oídio e crestamento gomoso em cucurbitáceas e podridão de *Sclerotinia* em alface. O produto está registrado na Argentina, Chile, Coréia do Sul, Costa Rica, Equador, Estados Unidos da América (EUA), Filipinas, França, Guatemala, Honduras, Israel, Itália, Japão, México, Nova Zelândia, Peru, Porto Rico, Suíça e em fase de registro em outros países, inclusive no Brasil (EDGECOMB & MANKER, 2007).

O Sonata<sup>®</sup> é registrado nos EUA e encontra-se em processo de registro na Coréia do Sul, México e Brasil. O produto é recomendado para o controle da pinta- preta e requeima em tomate, míldios em cucurbitáceas, além de oídio em tomate, pimentão, uva, morango, alface, cucurbitáceas e maçã (EDGECOMB & MANKER, 2007).

No Brasil, existem diversos produtos biológicos disponíveis no mercado, tais como, Tricovab<sup>®</sup> à base de *Trichoderma stromaticum* antagonista a *Moniliophthora perniciosa* (BEZERRA et al., 2000; OLIVEIRA & LUZ, 2007) e o Trichodermil<sup>®</sup> formulado a partir de *Trichoderma harzianum* pela Itaforte Bioprodutos Ltda.

Além desses, existem outros produtos a base de bactérias, como, Bioforce<sup>®</sup> (*Pantoea agglomerans* isolado 1494) produzido pela MK Química do Brasil Ltda, e recomendado para o controle de algumas doenças associadas às culturas do trigo, cevada e milho; Biopower<sup>®</sup> (*Bacillus amyloliquefaciens*), também fornecido pela MK Química do Brasil Ltda, utilizado no controle de *Fusarium graminearum*, *Drechslera tritici-repentis*, *Bipolaris sorokiniana* em Trigo; Embr.144<sup>®</sup> a base de *Paenibacillus macerans* isolado 144, empregado no controle de *Fusarium graminearum*; entre outros.

Apesar dos resultados satisfatórios obtidos em vários trabalhos envolvendo o controle biológico de doenças de plantas no Brasil, a maioria das pesquisas não desenvolve produtos comerciais, bem como não gera patentes e registros nos órgãos federais.

Como causas principais desse fato podem ser citadas: política agrícola nacional insuficiente no que se refere à adoção de práticas alternativas; poucos programas destinados ao financiamento de pesquisas para o desenvolvimento e produção em larga escala dos produtos biológicos; ausência de incentivos tributários para a produção e uso de agentes de controle biológico; e dificuldade de registro dos agentes de biocontrole, pois a legislação adotada é a mesma utilizada para defensivos químicos (MORANDI & BETTIOL, 2009).

**Tabela 1.** Produtos comerciais disponíveis no mercado para o controle biológico de doenças de plantas.

<b>Produto</b>	<b>Agente de Controle</b>	<b>Empresa</b>
Actinovate®	<i>Streptomyces lydicus</i>	Natural Industries
BioJect Spot-Less®	<i>Pseudomonas aureofaciens</i>	Eco Soil Systems.
Bio-save®	<i>Pseudomonas syringae</i>	Village Farms LLC
BlightBan®	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	NuFarm I
Cedomon®	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	BioAgri
Deny®	<i>Burkholderia cepacia</i>	Stine Microbial Products
Galltrol®	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	AgBioChem
HiStick N/T®	<i>Bacillus subtilis</i>	Becker Underwood
Intercept®	<i>Burkholderia cepacia</i>	Soil Technologies
Kodiak®	<i>Bacillus subtilis</i>	Gustafson
Mycostop®	<i>Streptomyces griseoviridis</i>	Kemira Agro Oy
Nogall®	<i>Agrobacterium radibacter</i>	Bio-care Technology
Serenade®	<i>Bacillus subtilis</i>	AgraQuest
YiledShield®	<i>Bacillus pumillus</i>	Gustafson
Subtilex®	<i>Bacillus subtilis</i>	Becker Underwood
BioPro®	<i>Bacillus subtilis</i>	Andermatt Bioc.
Cerall®	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	BioAgri
Rhapsody®	<i>Bacillus pumillus</i>	AgraQuest
Sonata®	<i>Bacillus pumillus</i>	AgraQuest
Ballad®	<i>Bacillus pumillus</i>	AgraQuest
EcoGuard®	<i>Bacillus liqueniformis</i>	Novozymes
BioYield®	<i>Bacillus subtilis</i>	Gustafson

Fonte: ZUCCHI & MELO, 2009.

#### 1.4.6. Implicações e perspectivas

Consciente dos problemas ambientais promovidos pelo uso de agroquímicos, como, contaminação dos alimentos, do solo, da água, entre outros, a sociedade exige cada vez mais a produção de alimentos sem resíduos químicos (KORSTEN, 2006; MARI et al., 2007; WALTERS, 2009; SHARMA et al., 2009). Por isso, os consumidores seguem a tendência mundial de privilegiar alimentos produzidos a partir de métodos alternativos aos agroquímicos.

A despeito da crescente demanda por produtos livres de agroquímicos e com menor impacto sobre os recursos naturais, no Brasil, o uso de agentes de

controle biológico de doenças de plantas ainda é considerado abaixo das expectativas (CAMPANHOLA & BETTIOL, 2003).

Vários fatores são atribuídos ao fato, tais como: disponibilidade limitada de produtos comerciais e princípios ativos registrados; histórico de resultados inconsistentes em campo; ação lenta dos microrganismos na maioria dos casos; cuidados especiais para o adequado manejo dos agentes; investimento limitado para o desenvolvimento de produtos; baixo nível tecnológico, além de infraestrutura deficitária no processo produtivo das formulações, o que muitas vezes gera produtos de baixa qualidade; entre outros (MORANDI & BETTIOL, 2009).

Apesar das limitações, nos últimos anos, o mercado brasileiro de agentes de controle biológico de doenças de plantas tem crescido significativamente. Dessa maneira, tem-se aumentado o número de pequenas empresas envolvidas com o desenvolvimento de produtos comerciais à base de microrganismos para o controle de diversas doenças associadas a culturas de importância econômica (POMELLA, 2008). Assim, a demanda por produtos biológicos de qualidade e com validação científica gera uma oportunidade de parcerias e contratos entre empresas e instituições de pesquisas e ensino, viabilizando investimentos na área.

Em geral, os trabalhos relacionados ao controle biológico de doenças de plantas, visam isolamento, seleção e testes dos potenciais agentes de biocontrole, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Embora resultados satisfatórios com altos níveis de controle tenham sido obtidos sob condições controladas, normalmente são observados níveis mais baixos de controle da doença no campo. De fato, o controle biológico não promove o completo controle da doença, porém reduz significativamente sua severidade (WALTERS, 2009).

Contudo, diante das potencialidades apresentadas pelas rizobactérias para o controle biológico de doenças de plantas, reconhecidamente, estes agentes atuam como uma ferramenta adicional no manejo integrado de doenças. Além disso, a associação com microrganismos benéficos pode proporcionar outras vantagens para as plantas, tais como, aumento da absorção de nutrientes, fixação de nitrogênio, solubilização de fosfato, entre outros (SMITH & GOODMAN, 1999). Por esse motivo, nos últimos dez anos, tem-se aumentado o interesse pelo

estudo destes microrganismos, os quais condicionam as plantas a resistirem ao ataque de fitopatógenos (WALTERS, 2009).

Neste sentido, o controle biológico de doenças de plantas é uma alternativa viável e extremamente promissora além de tecnicamente justificável, a qual tem sua eficiência comprovada sobre diversos patossistemas, sendo relatada em inúmeros trabalhos científicos (SHARMA et al., 2009; WALTERS, 2009). Como principais vantagens, o controle biológico apresenta baixos custos e menor impacto ambiental (NORDLUND, 1996; POMELLA, 2008).

Entretanto, até o momento, pesquisas destinadas ao controle biológico de *Fusarium guttiforme* são escassas ou nulas. Assim, considerando a necessidade de desenvolver novos métodos de controle da doença com baixo custo e menor agressividade ao meio ambiente, torna-se evidente a necessidade de realizar estudos que envolvam busca, seleção e testes de microrganismos eficientes para o controle da fusariose do abacaxizeiro.



---

## CAPÍTULO 2

**Potencial de uso de bactérias associadas ao sistema radicular de abacaxizeiros (*Ananas* spp.) no controle da fusariose (*Fusarium guttiforme* Nirenberg & O'Donnell)**

---

## RESUMO

**Trocoli, R. O. Potencial de uso de bactérias associadas ao sistema radicular de abacaxizeiros (*Ananas spp.*) no controle da fusariose (*Fusarium guttiforme* Nirenberg & O'Donnell).**

A abacaxicultura é uma atividade de alta relevância sócio-econômica para o Brasil. Todavia, a fusariose, doença causada por *Fusarium guttiforme*, provoca perdas consideráveis constituindo o principal fator limitante da cultura. O controle da doença baseia-se na integração de práticas culturais, onde o uso de variedades resistentes e a aplicação de agroquímicos têm um papel preponderante. Entretanto, a maioria das variedades exploradas comercialmente é suscetível, implicando na necessidade da aplicação de fungicidas. Considerando a falta de estudos direcionados ao controle biológico, aliada à crescente demanda por métodos alternativos ao uso de agroquímicos, o presente trabalho teve como objetivo verificar o potencial de uso de bactérias associadas ao sistema radicular de genótipos de abacaxizeiros resistentes à fusariose no controle biológico da doença. Inicialmente procedeu-se ao isolamento de bactérias do sistema radicular de 12 genótipos de abacaxizeiros previamente caracterizados como resistentes à fusariose. Foram isoladas 226 bactérias oriundas da rizosfera ou de provável origem endofítica. A seleção das bactérias revelou um grupo de 26 isolados, que reduziram totalmente a colonização de *F. guttiforme* sobre discos de talo de abacaxi. No estudo desses isolados em condições de campo um grupo de cinco isolados (E053L, E011F2, R183S5, R192MG e E043F3) reduziu significativamente a intensidade da doença. Dentre esses, E053L apresentou maior eficiência, seguido por E011F2, R183S5, R192MG e E043F3. Esses isolados são promissores agentes de biocontrole da fusariose do abacaxizeiro pelo que devem ser mais estudados visando seu uso dentro do programa de produção integrada de abacaxi no Brasil.

**Palavras-chaves:** Abacaxi, *Ananas comosus*, Controle Biológico, Rizobactérias.

## ABSTRACT

**Trocoli, R. O. Potential of use of bacteria associated to pineapple (*Ananas spp.*) roots for fusariosis (*Fusarium guttiforme* Nirenberg & O'Donnell) control.**

Pineapple cultivation is a relevant socio-economic activity in Brazil. However, the incidence of fusariosis, caused by *Fusarium guttiforme*, causes high losses, making the disease the main limiting factor of this crop. Control of pineapple fusariosis is based on the integration of management practices where resistant varieties and fungicide application play the main role. Since most commercial varieties are susceptible, fungicide spraying is inevitable. Considering the lack of studies on biological control of pineapple fusariosis and the increasing demand for alternative practices to reduce pesticide use, this work aimed at verifying the potential of bacteria isolated from resistant pineapple genotypes in the biocontrol of *F. guttiforme*. Initially, 226 bacteria from the rhizosphere or internal root tissues of 12 pineapple genotypes resistant to fusariosis were isolated. According to the reduction of pathogen colonization on a bioassay using pineapple stem slices, 26 bacterial isolates that totally inhibited the *F. guttiforme* colonization were selected. Field trials allowed the selection of a group of five isolates (E053L E011F2, R183S5, R192MG and E043F3) that significantly reduced disease severity. Isolate E053L showed the highest disease reduction followed by E011F2, R183S5, R192MG, and E043F3. These isolates are promising biocontrol agents for pineapple fusariosis and further studies aiming at their use in pineapple integrated production in Brazil should be done.

**Keywords:** *Ananas comosus*, Biological control, Pineapple, Rhizobacteria.

## INTRODUÇÃO

Atualmente, o Brasil é o maior produtor mundial de abacaxi, com uma produção de 2,52 milhões de toneladas em torno de 65 mil hectares cultivados (IBGE, 2008). Apesar do aumento significativo da área plantada nos últimos anos, é evidente a baixa produtividade da abacaxicultura nacional. Fatores ambientais adversos, práticas culturais inadequadas e principalmente problemas fitossanitários têm contribuído para este fato.

A doença conhecida por fusariose do abacaxizeiro, causada pelo fungo *Fusarium guttiforme* Nirenberg & O'Donnell (sin. *Fusarium subglutinans* f. sp. *ananas* Nelson, Tousson & Marasas comb. nov.) é considerada o principal fator limitante da cultura no Brasil (MATOS & REINHARDT, 2009). As perdas em produção de frutos de abacaxi ocasionadas pela doença podem atingir até 80 %, a depender da cultivar, da região produtora, bem como da época de plantio. A situação agrava-se ainda mais devido ao fato que as cultivares de maior expressão mundial, como, Smooth Cayenne, Red Spanish, Queen e principalmente Pérola, a mais cultivada no Brasil, serem suscetíveis (MATOS, 1999; MATOS & SANCHES, 2009).

O controle da fusariose fundamenta-se na integração de várias práticas culturais, tais como: utilização de mudas sadias, monitoramento e erradicação de plantas infectadas, indução floral em época que possibilite o desenvolvimento das inflorescências sob condições desfavoráveis à incidência da doença (princípio de escape) e aplicação de fungicidas visando proteger as inflorescências em desenvolvimento.

A utilização de variedades resistentes é a principal estratégia de controle recomendada pela Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical (CNPMP). Dentre as variedades lançadas pelo CNPMP destacam-se, 'Imperial', 'Vitória' e 'BRS Ajubá', resistentes à fusariose do abacaxizeiro (CABRAL & MATOS, 2009a; CABRAL & MATOS, 2009b). Entretanto, apesar do seu potencial, essas variedades ainda não são amplamente cultivadas no País. Desta forma o controle químico ainda é amplamente utilizado em plantios comerciais.

Todavia, o uso de fungicidas tem promovido uma série de problemas de ordem ambiental, como, contaminação dos alimentos, do solo, da água, diminuição das populações de organismos benéficos, bem como o surgimento de patógenos resistentes. Além disso, aumenta significativamente os custos de produção (NORDLUND, 1996; WALTERS, 2009). Consciente disso, a sociedade exige cada vez mais a produção de alimentos sem resíduos químicos, fazendo com que se torne imprescindível encontrar alternativas de controle eficientes que garantam a sustentabilidade da cultura e sejam menos agressivas ao meio ambiente.

Dentro das alternativas, o controle biológico se apresenta como ferramenta eficaz no combate a fitopatógenos. O controle biológico, que se caracteriza pela introdução de microrganismos não-patogênicos para controlar outros patogênicos (BETTIOL, 1999a), tem sido intensivamente estudado nos últimos anos (WALTERS, 2009).

Dentre os agentes de biocontrole, as rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (“Plant Growth Promoting Rhizobacteria” - PGPRs), por colonizarem eficientemente o sistema radicular de vegetais, são destaque. Adicionalmente, bactérias endofíticas que vivem em associação com plantas, colonizando o interior de tecidos vegetais, também têm mostrado resultados eficientes tanto no biocontrole de patógenos de solo quanto foliares (KLOEPPER & BEAUCHAMP, 1992; CHEN et al., 1996; BACON & HINTON, 2001; WALTERS & DANIELL, 2007; MELNICK et al., 2008).

O sucesso do uso desses microrganismos no controle de fitopatógenos tem sido comprovado em diferentes patossistemas. Kotan et al. (2009) relatam a eficiência de *Burkholderia cepacia* contra três espécies de *Fusarium*, (*F. oxysporum*, *F. culmorum* e *F. sambucinum*), reduzindo o diâmetro da colonização em tubérculos de batata em até 80 %. Os autores também relatam que *Pseudomonas putida* e *Bacillus subtilis* propiciaram o controle de *F. culmorum* em torno de 87 %.

Em teoria, hospedeiros resistentes e que ainda não foram domesticados, teriam maior probabilidade de abrigar rizobactérias e/ou bactérias endofíticas com potencial de biocontrole (NOWAK, 1998). O banco ativo de germoplasma de

abacaxi da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical abriga acessos de abacaxizeiro de diferentes espécies e variedades botânicas caracterizados como resistentes à fusariose que os tornam um excelente material biológico a ser explorado na busca de agentes de biocontrole. Todavia, apesar da necessidade de microrganismos eficientes para o controle da fusariose do abacaxizeiro, pesquisas destinadas a esse fim são escassas.

O presente trabalho objetivou isolar bactérias de solo rizosférico e de raízes de abacaxizeiros resistentes à fusariose provenientes do Banco Ativo de Germoplasma de abacaxi da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, visando: a) obter uma população de potenciais agentes de biocontrole; b) selecionar as bactérias obtidas quanto à redução da colonização de *F. guttiforme*; e c) verificar em condições de campo, o efeito dos isolados selecionados no controle da fusariose do abacaxizeiro.

## MATERIAL E MÉTODOS

### **Cultivo de microrganismos**

Todos os isolados de microrganismos utilizados nos ensaios em condições laboratoriais e em campo foram cultivados e armazenados na coleção de culturas do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, Cruz das Almas- BA. Os testes de seleção em tecidos de abacaxi e campo foram conduzidos com o isolado de *Fusarium guttiforme* Fgt72CA, presente na coleção do CNPMF. O fungo foi cultivado em meio batata-dextrose-ágar - BDA e preservado em plantas de abacaxi. Visando evitar a perda de patogenicidade, o patógeno foi periodicamente inoculado e re-isolado utilizando plantas da variedade 'Pérola' suscetível à fusariose.

Independentemente de seu nicho ecológico, as bactérias utilizadas neste estudo foram repicadas periodicamente em meio 523 (KADO & HESKETT, 1970) utilizando a metodologia descrita por Romeiro (2001).

### **Coleta de amostras e isolamento de bactérias associados ao sistema radicular de plantas de abacaxi**

Para o isolamento das bactérias foram utilizadas amostras de solo rizosférico e macerado de raízes de 12 genótipos de abacaxizeiros procedentes do banco ativo de germoplasma de abacaxi da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical (Tabela 1), sendo coletada uma planta por acesso. Considerou-se como solo de rizosfera as partículas de solo aderidas às raízes que se desprendiam facilmente quando as plantas eram retiradas do campo (BETTIOL, 1991b). Para o isolamento de bactérias endofíticas, as amostras de raízes foram lavadas em água corrente e desinfestadas em álcool 70 % por 1 minuto e hipoclorito de sódio (1 %) por cinco minutos, seguindo-se de três lavagens em água destilada esterilizada. Retirou-se uma alíquota da terceira água de lavagem, a qual foi transferida para placas de Petri contendo meio ágar nutriente. Dessa maneira foi constituída a contraprova do isolamento, sobre a qual não houve crescimento de

colônias bacterianas, excluindo a possibilidade do isolamento de eventuais microrganismos epifíticos.

**Tabela 1.** Acessos de *Ananas* spp. utilizados para o isolamento de bactérias associadas ao sistema radicular.

<b>Acesso</b> <sup>a</sup>	<b>Espécie hospedeira</b> <sup>b</sup>
Campo Sales	<i>Ananas comosus</i> var. <i>comosus</i>
Comum	<i>Ananas comosus</i> var. <i>comosus</i>
FRF-493=F3	<i>Ananas comosus</i> var. <i>comosus</i>
FRF-638=F1	<i>Ananas comosus</i> var. <i>comosus</i>
FRF-686=F2	<i>Ananas comosus</i> var. <i>comosus</i>
FRF-156=F4	<i>Ananas comosus</i> var. <i>comosus</i>
G-10	<i>Ananas comosus</i> var. <i>comosus</i>
LBB-740	<i>Ananas comosus</i> var. <i>comosus</i>
Minas Gerais	<i>Ananas comosus</i> var. <i>bracteatus</i>
Santo Amaro	<i>Ananas comosus</i> var. <i>bracteatus</i>
Selvagem-3	<i>Ananas macrodontes</i>
Selvagem-5	<i>Ananas comosus</i> var. <i>bracteatus</i>

<sup>a</sup> Nome ou código de trabalho dos acessos.

<sup>b</sup> Classificação quanto à espécie e variedade botânica.

Dez gramas de solo de rizosfera ou de raízes de plantas de abacaxi foram adicionados em 100 mL de solução salina (0,85 % NaCl) e submetidos a agitação contínua em agitador rotativo de plataforma durante 30 minutos, à temperatura ambiente. Decorrido este período, procedeu-se a uma diluição seriada fator 10. Tanto das amostras de solo de rizosfera quanto das raízes foi retirada uma alíquota de 100 µL de cada uma das cinco diluições, e transferida para placas de Petri contendo meio ágar nutriente (NA), procedendo-se o espalhamento com o auxílio da alça de Drigalsky. A seguir, as placas foram incubadas a 28 °C durante o período entre 24 e 48 h.

Colônias isoladas de bactérias que surgiram nas placas foram transferidas para placas de Petri contendo o mesmo meio de cultura. Visando a obtenção de culturas puras utilizou-se a técnica de esgotamento em placas. Em seguida, as bactérias foram transferidas para tubos de ensaio contendo meio NA. Uma vez crescidas as bactérias foram armazenadas em glicerol a 25 % a – 80 °C (GERHARDT, 1994). Para o uso contínuo nos ensaios realizados, as rizobactérias



foram preservadas por meio de repicagens periódicas tubo a tubo contendo 1/5 de meio de cultura 523 (KADO & HESKETT, 1970; ROMEIRO, 2001).

### **Preparo de inóculo de *Fusarium guttiforme***

Para o preparo do inóculo colônias do isolado Fgt72CA de *F. guttiforme* foram crescidas durante sete dias em meio de cultura BDA. Após este período, adicionou-se água destilada esterilizada às placas e com um pincel fino procedeu-se a liberação dos conídios, obtendo-se a suspensão conidial. Visando remover os fragmentos de micélio, a suspensão conidial foi filtrada por duas camadas de gaze. A seguir, a concentração da suspensão foi ajustada para  $10^5$  conídios.mL<sup>-1</sup> mediante contagem de conídios em hemacitômetro tipo Neubauer (MATOS & CABRAL, 2006).

### **Metodologia de inoculação de *Fusarium guttiforme* em discos de tecido de abacaxizeiro visando à seleção de bactérias com potencial de biocontrole da fusariose**

Objetivou-se desenvolver uma metodologia de inoculação de *F. guttiforme* em tecidos destacados de plantas de abacaxi que permitisse avaliar o potencial de biocontrole de bactérias isoladas de raízes de abacaxizeiro. Comparou-se o efeito da posição das folhas, e a procedência dos discos retirados do talo da planta, isto é, altura à qual os discos foram cortados. Foram inoculados discos retirados das folhas “D” e “F” (ver anexos), com e sem ferimento central. Os discos do talo da planta foram retirados na altura de 3 ou 6 cm a partir da inserção na planta mãe. O inóculo de *F. guttiforme* consistiu em suspensão a  $10^5$  conídios mL<sup>-1</sup> e a variedade utilizada foi ‘Pérola’. Em cada disco foram aplicados 200 µL da suspensão conidial. Com a finalidade de comprovar a eficiência da desinfestação dos materiais utilizados, discos não inoculados foram utilizados como controle. Após a inoculação os discos foram mantidos em câmara úmida a 26 °C, por 6 dias. Decorrido este período, avaliou-se a porcentagem de colonização de *F. guttiforme*. O experimento obedeceu ao delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições.

## **Avaliação do potencial de biocontrole de bactérias de abacaxi sobre *Fusarium guttiforme* em discos de tecidos de abacaxizeiro**

### **Material vegetal**

Discos retirados da região basal de mudas de abacaxi 'Pérola', cortados na altura de 3 cm a partir da inserção na planta mãe foram lavados em água corrente e desinfestados em álcool 70 % por 2 minutos e hipoclorito de sódio a 1 % por 5 minutos, seguido de duas lavagens em água destilada esterilizada.

### **Obtenção e preparo do inóculo das bactérias**

Para a obtenção da suspensão bacteriana, cada isolado foi crescido em tubos de ensaio de 50 mL contendo 10 mL de meio líquido 523. Em seguida, foram submetidos à agitação contínua a 100 rpm em agitador rotativo (TECNAL, Modelo TE-420) durante 12 horas, à temperatura de 25 °C. Decorrido este período, foi retirada uma alíquota de 2 mL, a qual foi transferida para tubos tipo Ependorff, e centrifugada (CENTRIFUGE, Modelo MCD-2000) a 10.000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellete re-suspenso em água de modo a completar o volume de 2 mL. Finalmente a concentração foi ajustada para aproximadamente  $10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>, utilizando como referência a turbidez 0,5 da escala de McFarland.

### **Inoculação de bactérias em discos de tecidos de abacaxizeiro e avaliação da colonização de *Fusarium guttiforme***

Discos de tecido de abacaxi, obtidos como descrito anteriormente, foram tratados com 200 µL da suspensão bacteriana. Após três minutos, período no qual a suspensão foi totalmente absorvida pelo tecido, realizou-se a inoculação com 200 µL da suspensão conidial de *Fusarium guttiforme* ( $10^5$  conídios.mL<sup>-1</sup>). Devido ao grande número de isolados a ser avaliado, operacionalmente era impossível testar os 226 simultaneamente. Assim, foram testados grupos de 25 isolados por vez. A testemunha, que foi utilizada em todos os grupos, consistiu na inoculação de *F. guttiforme* em discos de tecidos tratados apenas com água

destilada esterilizada. Com a finalidade de verificar a eficiência do processo de desinfestação foram utilizados discos não inoculados como controle. Após a aplicação dos diferentes tratamentos os discos foram acondicionados em câmara úmida a 26 °C durante 6 dias.

Decorrido este período, avaliou-se visualmente a porcentagem de colonização de *F. guttiforme*. O experimento obedeceu ao delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições. Bactérias que proporcionaram 100 % de inibição foram selecionadas e submetidas novamente a ensaios para confirmação dos resultados. Os testes foram conduzidos seguindo a mesma metodologia, porém, foram utilizadas 10 repetições para cada tratamento. Como controle foram usados três isolados de bactérias que não inibiram o crescimento do patógeno.

### **Estudo do potencial de bactérias como agentes de biocontrole da fusariose do abacaxizeiro em condições de campo**

Os experimentos a campo foram montados na área experimental da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB). Nestes, utilizaram-se os isolados com melhor desempenho na redução da colonização de *Fusarium guttiforme* nos testes em condições controladas. Foram realizados dois experimentos em campo. Ambos foram conduzidos no período de maio a agosto de 2009 com intervalo de 15 dias entre experimentos.

### **Obtenção e cultivo de mudas de abacaxizeiro**

Mudas, tipo filhote, da variedade 'Pérola' foram obtidas da área experimental da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. As mudas foram visualmente selecionadas quanto à fitossanidade e ao tamanho (aproximadamente 30 cm). Mudas que atenderam aos critérios de seleção foram plantadas em sacos plásticos contendo 3,5 kg de solo (2 partes de latossolo; 1 parte de terra preta; 1 parte de areia lavada) e acondicionadas em telado durante 60 dias.

### **Obtenção do inóculo e inoculação de mudas de abacaxizeiro**

Para a obtenção da suspensão bacteriana, os isolados de bactérias a serem utilizados foram crescidos em placas de Petri contendo meio ágar nutriente. As placas foram incubadas em BOD a 25 °C durante 24 h. Para a coleta do inóculo, 2/3 do volume das placas foram cobertos com água destilada esterilizada, procedendo-se a homogeneização da suspensão com alça de Drigalsky. A seguir, a suspensão foi transferida para tubos tipo Falcon e a concentração ajustada para  $10^8$  ufc.mL<sup>-1</sup> (ROMEIRO, 2007b). A combinação de bactérias foi preparada pela mistura de volumes iguais da suspensão bacteriana de cada isolado na concentração de  $10^8$  ufc.mL<sup>-1</sup>, de modo a se ter concentrações finais iguais a  $10^8$  ufc.mL<sup>-1</sup> (JETIYANON, 2007).

As bactérias foram aplicadas via imersão das mudas em suspensão do inóculo durante 15 minutos. A seguir, com a finalidade de evitar a lavagem da suspensão bacteriana no momento da inoculação do patógeno, as mudas permaneceram sobre o solo durante 5 minutos antes da inoculação de *F. guttiforme*, período no qual foi constatado que o sistema radicular das plantas tratadas estava visualmente seco. Decorrido esse período, as mudas foram inoculadas com uma suspensão de *F. guttiforme* a  $10^5$  conídios.mL<sup>-1</sup> por três minutos. Visando garantir a eficiência da inoculação, foram feitos ferimentos eqüidistantes na base das mudas com 2 cm de profundidade e 1 mm de diâmetro (MATOS & CABRAL, 2006).

Imediatamente após a inoculação, as mudas foram plantadas e mantidas sob condições de campo durante todo o período de condução do experimento. A área experimental foi arada e gradeada conforme Cunha & Reinhardt (2004). Em ambos os experimentos foi dispensado o manejo de adubações tanto no plantio quanto na condução dos experimentos. Foi utilizado espaçamento de 0,90 m entre linhas e 0,30 m entre plantas (CUNHA & REINHARDT, 2004). A umidade do solo foi mantida por meio de irrigação periódica.

O delineamento experimental dos experimentos realizados em campo foi inteiramente casualizado com 5 (cinco) plantas por tratamento, sendo cada planta considerada uma repetição. Plantas utilizadas como controle foram inoculadas

somente com *F. guttiforme*. Além disso, foi utilizado um controle composto por mudas tratadas com água destilada esterilizada.

Após 90 dias, procedeu-se a remoção das mudas e avaliação da severidade da fusariose. A severidade da doença foi determinada utilizando uma escala de notas variando de zero a cinco, onde: (0) planta sem sintomas; (1) início de podridão na base da planta; (2) podridão leve; (3) podridão média; (4) podridão severa e (5) base da muda totalmente apodrecida, ocorrendo morte da planta. Para facilitar a avaliação, cortes longitudinais foram realizados na base das mudas que permitiram a visualização e quantificação dos sintomas internos (MATOS & CABRAL, 2006).

### **Análise de dados**

Os dados obtidos nos experimentos de estabelecimento da metodologia de inoculação foram submetidos a análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Com os dados severidade obtidos nas avaliações de campo foi calculado o índice da doença de McKinney utilizando a formula a seguir:  $ID = [\sum(\text{grau da escala} \times \text{frequência}) / (N^\circ \text{ de plantas} \times \text{grau máximo})] \times 100$ . Os valores de índice da doença dos tratamentos foram convertidos em proporções com base nos valores do controle (plantas inoculadas com *F. guttiforme*, sem aplicação de agentes de biocontrole). Os dados originais de severidade, avaliada com escala de notas (6 classes) foram submetidos a análises não paramétricas (Kruskal Wallis, 1%), e as médias dos tratamentos analisadas por um teste de comparação múltipla não-paramétrica (5 %). No intuito de visualizar e discriminar grupos dentro dos isolados foi realizada análise de agrupamento *K-clustering* considerando-se 4 grupos. O efeito da distribuição nos tratamentos foi analisado mediante o teste de Kolmogorov-Smirnov. As análises de Kruskal-Wallis foram realizadas no programa Stastica (Versão 6). Já nas análises de Kolmogorov-Smirnov, correlação e *K-clustering* foi utilizado o programa Systat (Versão 12).

## RESULTADOS

### **Metodologia de inoculação de *Fusarium guttiforme* em discos de tecido de abacaxizeiro visando à seleção de bactérias com potencial de biocontrole da fusariose**

Discos de tecido retirados da folha “D” apresentaram maior nível de colonização de *F. guttiforme* quando comparados com os da folha “F”. Ao contrário da folha “F”, onde o ferimento não teve influência, na folha “D”, maiores porcentagens de colonização foram observados nos discos com ferimento. Em discos retirados do talo da planta, verificou-se maior nível de colonização naqueles retirados na altura de 3 cm. Não foi observado qualquer efeito do ferimento central nos tratamentos envolvendo discos de tecido de talos (Tabela 2). Considerando estes resultados, bem como o processo de infecção natural do patógeno, selecionou-se o método de inoculação em discos retirados do talo da planta, na altura de 3 cm, sem ferimento central, para a avaliação do efeito de biocontrole das bactérias isoladas de abacaxizeiro sobre *F. guttiforme*.

### **Isolamento de bactérias associadas ao sistema radicular de plantas de abacaxi e avaliação do seu potencial de biocontrole contra *Fusarium guttiforme***

Os procedimentos utilizados foram eficientes para o isolamento de bactérias. Em total, 226 bactérias foram obtidas. Destas, 128 foram provenientes da rizosfera e 98 do macerado de raízes (Tabela 3).

A seleção em condições controladas apontou 26 bactérias capazes de reduzir a colonização de *F. guttiforme* em 100 %. Neste grupo foram encontrados tanto isolados de origem endofítica quanto rizobactérias. Dentre os acessos, Minas Gerais e FRF- 686 destacaram-se, originando seis isolados cada um. Cinquenta e dois isolados não mostraram atividade contra *F. guttiforme* nas condições estudadas (Tabela 3).

No intuito de visualizar o efeito das bactérias na redução da colonização de *F. guttiforme*, os 226 isolados foram divididos em três grupos: bactérias que

proporcionaram redução entre 80 e 100 %, entre 40 e 80 % e o grupo daquelas que mostraram menos de 40 % de redução da colonização. Sessenta e três isolados ficaram alocados no primeiro grupo, 39 no segundo e o restante dos isolados (124) no terceiro (Figura 1). Dentro do intervalo entre 80 e 100 % não houve diferença quanto à frequência de rizobactérias e bactérias de origem endofítica (Figura 2).

Das 26 bactérias submetidas aos ensaios de confirmação de resultados, todas apresentaram nível de inibição do patógeno acima de 80 %. Os isolados E053L, R183S5 e R192MG, proporcionaram resultados similares nos dois experimentos, exibindo 100 % de inibição de *F. guttiforme* (Tabela 3).

**Tabela 2.** Porcentagem de colonização de *Fusarium guttiforme* em diferentes tecidos de abacaxizeiro 'Pérola'.

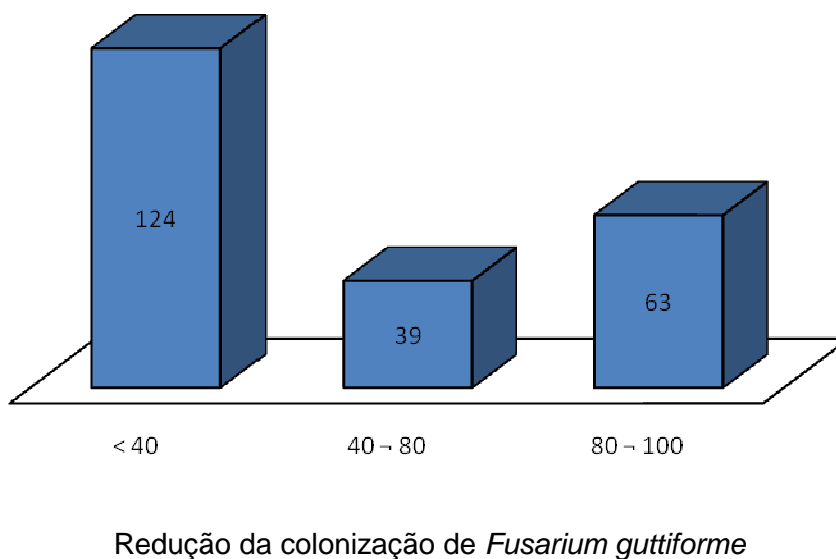
Folhas <sup>a</sup>		Talo <sup>b</sup>	
Tratamento	Média <sup>c</sup>	Tratamento	Média <sup>c</sup>
'D' com ferimento central	1,11 a	Disco sem ferimento central, retirado na altura de 3 cm	1,25 a
'D' sem ferimento central	0,84 b	Disco com ferimento central, retirado na altura de 3 cm	1,25 a
'F' sem ferimento central	0,49 c	Disco com ferimento central, retirado na altura de 6 cm	1,09 ab
'F' com ferimento central	0,31 c	Disco sem ferimento central, retirado na altura de 6 cm	0,52 c

<sup>a</sup> Discos de folhas 'D' ou 'F' com e sem ferimento central, procedentes de mudas de abacaxizeiro 'Pérola' com cinco meses de idade.

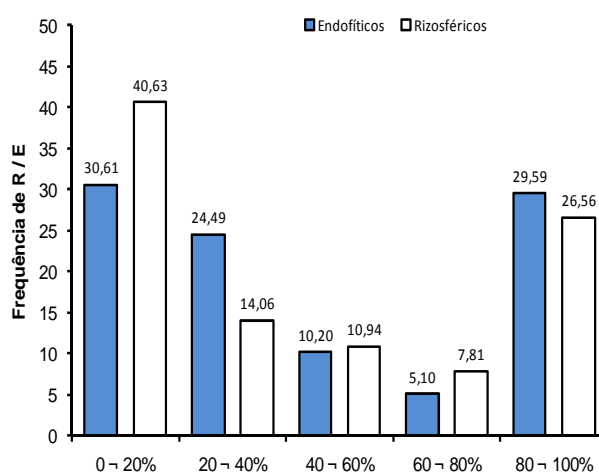
<sup>b</sup> Discos de talo provenientes de mudas de abacaxizeiro 'Pérola' cortados em diferentes alturas a partir da inserção na planta mãe.

<sup>c</sup> As médias de porcentagem de colonização de *Fusarium guttiforme* das cinco repetições foram transformadas para  $\sqrt{\text{arc. sen}}$  e submetidas à análise de variância. Valores seguidos de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5%.





**Figura 1.** Número de rizobactérias em diferentes intervalos de controle testadas contra *Fusarium guttiforme* sob condições controladas.



**Figura 2.** Frequência de isolados de origem endofítica em relação às rizobactérias em diferentes intervalos de controle.

**Tabela 3.** Bactérias isoladas de acessos de abacaxizeiro e seu efeito na redução de *Fusarium guttiforme* em discos de talos de abacaxi 'Pérola'.

<b>Acesso<sup>a</sup></b>	<b>Espécie hospedeira<sup>b</sup></b>	<b>Código do Isolado</b>	<b>Amostra<sup>c</sup></b>	<b>Redução da colonização<sup>d</sup> (%)</b>
Campo Sales	Acc	E062CS	E	100 (85,00)
Comum	Acc	E134C	E	100 (88,80)
Comum	Acc	E140C	E	100 (92,00)
FRF-156=F4	Acc	R105F4	R	100 (83,80)
FRF-493=F3	Acc	E043F3	E	100 (92,60)
FRF-493=F3	Acc	E044F3	E	100 (97,50)
FRF-493=F3	Acc	E045F3	E	100 (88,40)
FRF-493=F3	Acc	R033F3	R	100 (80,00)
FRF-686=F2	Acc	E009F2	E	100 (86,00)
FRF-686=F2	Acc	E011F2	E	100 (90,00)
FRF-686=F2	Acc	E012F2	E	100 (94,00)
FRF-686=F2	Acc	R017F2	R	100 (83,00)
FRF-686=F2	Acc	R021F2	R	100 (85,00)
FRF-686=F2	Acc	R024F2	R	100 (97,50)
G-10	Acc	R034G	R	100 (85,00)
G-10	Acc	R038G	R	100 (87,50)
LBB-740	Acc	E053L	E	100 (100)
LBB-740	Acc	R060L	R	100 (95,20)
Minas Gerais	Acb	R182MG	R	100 (80,00)
Minas Gerais	Acb	R192MG	R	100 (100)
Minas Gerais	Acb	R183S5	R	100 (100)
Minas Gerais	Acb	R202MG	R	100 (85,00)
Minas Gerais	Acb	R194MG	R	100 (90,00)
Minas Gerais	Acb	R191MG	R	100 (82,40)
Selvagem-5	Acb	R221S5	R	100 (82,00)
Selvagem-5	Acb	R208S5	R	100 (80,00)
FRF-493=F3	Acc	R027F3	R	98,80
FRF-686=F2	Acc	R019F2	R	98,80
FRF-493=F3	Acc	E039F3	E	97,50
FRF-493=F3	Acc	E040F3	E	97,50
FRF-638=F1	Acc	R008F1	R	97,50
FRF-686=F2	Acc	R022F2	R	97,50
Santo Amaro	Acb	R102S	R	97,50
Selvagem-5	Acb	R226S5	R	95,80
FRF-686=F2	Acc	E023F2	E	95,20

Tabela 3. Continuação.

<b>Acesso<sup>a</sup></b>	<b>Espécie hospedeira<sup>b</sup></b>	<b>Código do Isolado</b>	<b>Amostra<sup>c</sup></b>	<b>Redução da colonização<sup>d</sup> (%)</b>
Comum	Acc	E136C	E	95,00
Comum	Acc	E135C	E	95,00
Selvagem-5	Acb	E209S5	E	95,00
G-10	Acc	R035G	R	94,00
Selvagem-5	Acb	R212S5	R	93,90
Santo Amaro	Acb	E086S	E	92,60
Santo Amaro	Acb	R098S	R	92,50
Santo Amaro	Acb	E083S	E	91,40
Minas Gerais	Acb	E179MG	E	90,80
FRF-686=F2	Acc	E014F2	E	90,00
Santo Amaro	Acb	E087S	E	90,00
Selvagem-5	Acb	E203S5	E	90,00
Santo Amaro	Acb	R081S	R	88,80
Minas Gerais	Acb	R201MG	R	87,50
Selvagem-5	Acb	R217S5	R	87,50
Comum	Acc	R125C	R	86,30
Santo Amaro	Acb	E088S	E	86,30
Comum	Acc	R110C	R	85,00
FRF-686=F2	Acc	E013F2	E	85,00
Minas Gerais	Acb	E178S5	E	85,00
Santo Amaro	Acb	E084S	E	85,00
Santo Amaro	Acb	E085S	E	83,80
Santo Amaro	Acb	E089S	E	83,80
FRF-493=F3	Acc	R032F3	R	82,50
Comum	Acc	R122C	R	80,00
FRF-638=F1	Acc	E054F1	E	80,00
Selvagem-5	Acb	R225S5	R	80,00
Selvagem-5	Acb	R220S5	R	80,00
FRF-493=F3	Acc	E048F3	E	78,80
G-10	Acc	R036G	R	77,50
Selvagem-3	Am	R151S3	R	77,50
Santo Amaro	Acb	R094S	R	76,30
Santo Amaro	Acb	R096S	R	76,30
FRF-493=F3	Acc	E042F3	E	72,50
Santo Amaro	Acb	R100S	R	72,50

Tabela 3. Continuação.

<b>Acesso<sup>a</sup></b>	<b>Espécie hospedeira<sup>b</sup></b>	<b>Código do Isolado</b>	<b>Amostra<sup>c</sup></b>	<b>Redução da colonização<sup>d</sup> (%)</b>
FRF-156=F4	Acc	E077F4	E	70,00
Minas Gerais	Acb	R195MG	R	70,00
Selvagem-5	Acb	R218S5	R	70,00
Santo Amaro	Acb	R099S	R	68,80
Santo Amaro	Acb	E078S	R	67,50
Comum	Acc	E150C	E	62,50
Campo Sales	Acc	E067CS	E	60,00
Santo Amaro	Acb	R095S	R	60,00
Comum	Acc	E133C	E	55,00
LBB-740	Acc	E051L	E	55,00
FRF-493=F3	Acc	R031F3	R	52,50
Comum	Acc	E144C	E	50,00
Comum	Acc	E145C	E	50,00
Comum	Acc	E149C	E	50,00
FRF-156=F4	Acc	R070F4	R	50,00
FRF-493=F3	Acc	R029F3	R	50,00
FRF-638=F1	Acc	R005F1	R	50,00
FRF-638=F1	Acc	R007F1	R	50,00
FRF-638=F1	Acc	R003F1	R	50,00
FRF-686=F2	Acc	E020F2	E	50,00
FRF-686=F2	Acc	R026F2	R	50,00
Minas Gerais	Acb	E174MG	E	50,00
Selvagem-3	Am	E164S3	E	50,00
LBB-740	Acc	R059L	R	45,00
Santo Amaro	Acb	R082S	R	45,00
Selvagem-3	Am	R156S3	R	45,00
FRF-686=F2	Acc	R015F2	R	42,50
FRF-686=F2	Acc	R025F2	R	40,00
Santo Amaro	Acb	E090S	E	40,00
Santo Amaro	Acb	E092S	E	40,00
Santo Amaro	Acb	R080S	R	40,00
Selvagem-3	Am	R152S3	R	40,00
Comum	Acc	R123C	R	37,50
FRF-493=F3	Acc	E066F3	E	37,50
FRF-638=F1	Acc	R006F1	R	37,50

Tabela 3. Continuação.

<b>Acesso<sup>a</sup></b>	<b>Espécie hospedeira<sup>b</sup></b>	<b>Código do Isolado</b>	<b>Amostra<sup>c</sup></b>	<b>Redução da colonização<sup>d</sup> (%)</b>
Minas Gerais	Acb	E177MG	E	37,50
Minas Gerais	Acb	R193MG	R	37,50
Minas Gerais	Acb	R199MG	R	37,50
Selvagem-5	Acb	E206S5	E	37,50
Comum	Acc	E141C	E	35,00
Comum	Acc	E146C	E	35,00
FRF-493=F3	Acc	E047F3	E	35,00
Minas Gerais	Acb	E171MG	E	35,00
Santo Amaro	Acb	R097S	R	35,00
Selvagem-5	Acb	E205S5	E	35,00
Comum	Acc	E139C	E	32,50
FRF-156=F4	Acc	E073F4	E	32,50
LBB-740	Acc	E050L	E	32,50
Minas Gerais	Acb	E185MG	E	32,50
FRF-156=F4	Acc	R072F4	R	30,00
FRF-493=F3	Acc	E046F3	E	30,00
Santo Amaro	Acb	R093S	R	30,00
Minas Gerais	Acb	R184MG	R	28,10
Minas Gerais	Acb	R200MG	R	27,50
Minas Gerais	Acb	R189MG	R	27,50
Campo Sales	Acc	E063CS	E	25,00
Comum	Acc	E132C	E	25,00
FRF-493=F3	Acc	R028F3	R	25,00
G-10	Acc	R037G	R	25,00
LBB-740	Acc	E049L	E	25,00
LBB-740	Acc	E052L	E	25,00
Selvagem-3	Am	R155S3	R	25,00
Selvagem-3	Am	R157S3	R	25,00
Comum	Acc	R111C	R	22,50
Minas Gerais	Acb	E176MG	E	22,50
Selvagem-3	Am	R169S3	R	22,50
Selvagem-5	Acb	R224S5	R	22,50
Minas Gerais	Acb	E175MG	E	21,90
Comum	Acc	E138C	E	20,00
Comum	Acc	R124C	R	20,00

Tabela 3. Continuação.

<b>Acesso<sup>a</sup></b>	<b>Espécie hospedeira<sup>b</sup></b>	<b>Código do Isolado</b>	<b>Amostra<sup>c</sup></b>	<b>Redução da colonização<sup>d</sup> (%)</b>
FRF-156=F4	Acc	E075F4	E	20,00
Minas Gerais	Acb	E173MG	E	20,00
Selvagem-3	Am	E160S3	E	20,00
Selvagem-3	Am	E163S3	E	20,00
Santo Amaro	Acb	R079S	R	18,80
FRF-686=F2	Acc	E010F2	E	17,50
LBB-740	Acc	R057L	R	17,50
LBB-740	Acc	R058L	R	17,50
Selvagem-3	Am	E165S3	E	17,50
Comum	Acc	E148C	E	12,50
Comum	Acc	R109C	R	12,50
Santo Amaro	Acb	R103S	R	12,50
Comum	Acc	E147C	E	10,00
FRF-156=F4	Acc	R106F4	R	10,00
FRF-493=F3	Acc	R030F3	R	10,00
Minas Gerais	Acb	R187MG	R	10,00
Selvagem-3	Am	E167S3	E	10,00
Selvagem-3	Am	R168S3	R	10,00
Comum	Acc	E137C	E	9,40
Comum	Acc	R116C	R	7,50
FRF-156=F4	Acc	R071F4	R	7,50
FRF-638=F1	Acc	R002F1	R	7,50
FRF-638=F1	Acc	R004F1	R	7,50
Selvagem-3	Am	R170S3	R	7,50
Selvagem-5	Acb	E210S5	E	7,50
Selvagem-5	Acb	R219S5	R	7,50
FRF-156=F4	Acc	R069F4	R	6,30
Comum	Acc	E128C	E	5,00
Comum	Acc	R115C	R	5,00
FRF-686=F2	Acc	R016F2	R	5,00
Selvagem-3	Am	E159S3	E	5,00
Minas Gerais	Acb	E186MG	E	2,50
Minas Gerais	Acb	E172MG	E	2,50
Selvagem-5	Acb	R216S5	R	2,50
Campo Sales	Acc	E061CS	E	0,00

Tabela 3. Continuação.

<b>Acesso<sup>a</sup></b>	<b>Espécie hospedeira<sup>b</sup></b>	<b>Código do Isolado</b>	<b>Amostra<sup>c</sup></b>	<b>Redução da colonização<sup>d</sup> (%)</b>
Campo Sales	Acc	R064CS	R	0,00
Campo Sales	Acc	R065CS	R	0,00
Comum	Acc	E126C	E	0,00
Comum	Acc	E130C	E	0,00
Comum	Acc	E131C	E	0,00
Comum	Acc	E142C	E	0,00
Comum	Acc	E143C	E	0,00
Comum	Acc	R129C	R	0,00
Comum	Acc	R108C	R	0,00 (0,00)
Comum	Acc	R112C	R	0,00
Comum	Acc	R113C	R	0,00
Comum	Acc	R114C	R	0,00
Comum	Acc	R117C	R	0,00
Comum	Acc	R118C	R	0,00
Comum	Acc	R119C	R	0,00
Comum	Acc	R120C	R	0,00
Comum	Acc	R121C	R	0,00
FRF-156=F4	Acc	E074F4	E	0,00
FRF-156=F4	Acc	E076F4	E	0,00
FRF-156=F4	Acc	R107F4	R	0,00
FRF-156=F4	Acc	R068F4	R	0,00
FRF-493=F3	Acc	E041F3	E	0,00
FRF-638=F1	Acc	E055F1	E	0,00
FRF-638=F1	Acc	R001F1	R	0,00
FRF-686=F2	Acc	R018F2	R	0,00
LBB-740	Acc	R056L	R	0,00
Minas Gerais	Acb	E180MG	E	0,00
Minas Gerais	Acb	E172MG	E	0,00
Minas Gerais	Acb	R197MG	R	0,00
Minas Gerais	Acb	R196MG	R	0,00
Minas Gerais	Acb	R190MG	R	0,00
Minas Gerais	Acb	R181MG	R	0,00
Minas Gerais	Acb	R188MG	R	0,00
Minas Gerais	Acb	R198MG	R	0,00
Santo Amaro	Acb	E091S	E	0,00

Tabela 3. Continuação.

Acesso <sup>a</sup>	Espécie hospedeira <sup>b</sup>	Código do Isolado	Amostra <sup>c</sup>	Redução da colonização <sup>d</sup> (%)
Santo Amaro	Acb	R101S	R	0,00
Santo Amaro	Acb	R104S	R	0,00
Selvagem-3	Am	E161S3	E	0,00
Selvagem-3	Am	E162S3	E	0,00 (0,00)
Selvagem-3	Am	E166S3	E	0,00
Selvagem-3	Am	R153S3	R	0,00
Selvagem-3	Am	R154S3	R	0,00
Selvagem-3	Am	R158S3	R	0,00 (0,00)
Selvagem-5	Acb	E204S5	E	0,00
Selvagem-5	Acb	E207S5	E	0,00
Selvagem-5	Acb	E211S5	E	0,00
Selvagem-5	Acb	R213S5	R	0,00
Selvagem-5	Acb	R214S5	R	0,00
Selvagem-5	Acb	R215S5	R	0,00
Selvagem-5	Acb	R222S5	R	0,00
Selvagem-5	Acb	R223S5	R	0,00

<sup>a</sup> Nome ou código de trabalho dos acessos de origem dos isolados.

<sup>b</sup> Espécie e respectiva variedade botânica: Acc: *Ananas comosus* var. *comosus*, Acb: *Ananas comosus* var. *Bracteatus* e Am: *Ananas macrodentes*.

<sup>c</sup> E= bactéria de origem endofítica (macerado de raiz), R= rizobactéria (obtida de solo rizosférico).

<sup>d</sup> Valores correspondem à média (5 observações) da redução da colonização de *Fusarium guttiforme*. ( ) números entre parênteses correspondem aos valores obtidos no segundo experimento.

Com relação aos genótipos de abacaxizeiro, é de destaque o acesso FRF-686, visto que 75 % dos isolados de origem endofítica e 50 % das rizobactérias obtidos desse genótipo reduziram a colonização de *F. guttiforme* entre 80 e 100 %. Adicionalmente, 70 % das bactérias de origem endofítica provenientes do acesso Santo Amaro, bem como 50 % do acesso FRF-638 e 45 % do acesso FRF-493 proporcionaram níveis de controle nesse intervalo. Cerca de 50 %, 43 % e 42 % das rizobactérias isoladas dos acessos FRF-686, Selvagem-5 e FRF-493, respectivamente, reduziram a colonização do patógeno entre 80 e 100 %. Não foi observado nenhum isolado procedente do acesso Selvagem-3 nesse mesmo intervalo.



## Potencial de bactérias como agentes de biocontrole da fusariose do abacaxizeiro em condições de campo

O método de inoculação de *F. guttiforme* foi eficiente nos dois experimentos realizados, uma vez que sintomas externos foram observados em todos os tratamentos. Não houve relação absoluta entre os resultados obtidos em laboratório com os de campo. Os isolados R213S5, R196MG, R188MG e R065CS que no laboratório não apresentaram atividade contra *F. guttiforme*, nos experimentos em campo, mostraram eficiência moderada no controle da doença (Tabela 4). O contrário foi observado nos isolados R105F4 e R202MG, os quais em condições controladas promoveram 100 % de redução da colonização de *F. guttiforme*, porém, em nível de campo não foram eficientes contra o patógeno. Os isolados R033F3, R208S5, R034G e R194MG, que em condições laboratoriais promoveram 100 % de redução da colonização de *F. guttiforme*, mostraram baixa eficiência contra a doença em campo (Tabela 4).

Apesar da variação nos índices de doença nos experimentos de campo, houve repetibilidade dos resultados (correlação= 77.4 %). Tomando como base o nível de redução da doença em campo, foram gerados quatro grupos diferentes de bactérias a partir da análise de K-clustering (Figura 3). O grupo 1, composto por E053L, E011F2, R183S5, R192MG e E043F3 alocou as bactérias que apresentaram os melhores níveis de controle. O maior número de isolados, os quais foram moderadamente eficientes contra a doença foram incluídos no grupo 2. Já nos grupos 3 e 4 foram alocados isolados com baixa eficiência de controle. O teste de Kolmogorov-Smirnov indicou que os isolados do grupo 1 não diferiram quanto à distribuição de classes, exceto o isolado R192MG que mostrou distribuição significativamente diferente ao resto dos isolados do grupo.

Os isolados E053L, E011F2, R183S5, R192MG, E043F3, R024F2, bem como os tratamentos E011F2 + E043F3 e R056L + E091S mostraram níveis de controle consistentes nos dois experimentos. O isolado E053L foi o tratamento que apresentou maior nível de controle de *F. guttiforme*, mostrando índice de doença abaixo de 15 %. Adicionalmente, os isolados E011F2, R183S5 e R192MG apresentaram índice de doença entre 12 e 24 %, indicando significativo nível de

controle em comparação com o controle inoculado apenas com *F. guttiforme* (Tabela 4).

**Tabela 4.** Índice de doença em abacaxizeiro ‘Pérola’ após tratamento com agentes de controle biológico em condições de campo.

Tratamento	Acesso <sup>c</sup>	Amostra <sup>d</sup>	% Controle em discos de talo <sup>e</sup>	Índice de Doença <sup>a</sup>	
				Experimento 1	Experimento 2
Controle não Inoculado	-	-	-	0,09 ab <sup>f</sup>	0,04 a
E053L	LBB-740	E	100	0,04 a	0,12 ab
R183S5	Minas Gerais	R	100	0,28 ab	0,16 ab
E011F2	FRF-686	E	100	0,14 ab	0,25 abc
R192MG	Minas Gerais	R	100	0,28 ab	0,20 abc
E043F3	FRF-493	E	100	0,33 ab	0,29 abc
R024F2	FRF-686	R	100	0,33 ab	0,37 abc
E011F2+ E043F3 <sup>b</sup>	-	E+E	(100/100)	0,38 ab	0,37 abc
R056L + E091S <sup>b</sup>	-	R+E	(0/0)	0,38 ab	0,41 abc
E009F2	FRF-686	E	100	0,38 ab	0,45 abc
E045F3	FRF-493	E	100	0,38 ab	0,50 abc
R060L	LBB-740	R	100	0,42 ab	0,29 abc
E012F2	FRF-686	E	100	0,47 ab	0,29 abc
R017F2	FRF-686	R	100	0,47 ab	0,45 abc
E020F2	FRF-686	E	50,00	0,47 ab	N
R213S5	Selvagem-5	R	0,00	0,47 ab	N
R196MG	Minas Gerais	R	0,00	0,47 ab	0,66 abc
R188MG	Minas Gerais	R	0,00	0,52 ab	0,45 abc
E134C	Comum	E	100	0,52 ab	0,50 abc

Tabela 4. Continuação.

Tratamento	Acesso <sup>c</sup>	Amostra <sup>d</sup>	% Controle em discos de talo <sup>e</sup>	Índice de Doença <sup>a</sup>	
				Experimento 1	Experimento 2
R021F2	FRF-686	R	100	0,52 ab	0,50 abc
R065CS	Campo Sales	R	0,00	0,52 ab	N
E062CS	Campo Sales	E	100	0,57 ab	0,25 abc
R220S5	Selvagem-5	R	80,00	0,57 ab	0,45 abc
R017F2+ R021F2 <sup>b</sup>	-	R+R	(100/100)	0,57 ab	0,50 abc
E140C	Comum	E	100	0,66 ab	0,33 abc
R182MG	Minas Gerais	R	100	0,66 ab	0,41 abc
E044F3	FRF-493	E	100	0,76 ab	0,41 abc
R194MG	Minas Gerais	R	100	0,76 ab	0,58 abc
R038G	G-10	R	100	0,80 ab	0,29 abc
R191MG	Minas Gerais	R	100	0,80 ab	0,37 abc
R034G	G-10	R	100	0,80 ab	0,54 abc
R208S5	Selvagem-5	R	100	0,80 ab	0,54 abc
R033F3	FRF-493	R	100	0,85 ab	N
R105F4	FRF-156	R	100	0,95 ab	N
R202MG	Minas Gerais	R	100	1,00 b	0,79 bc
Controle Inoculado	-	-	-	1,00 b	1,00 c

<sup>a</sup> Proporções de valores do índice de doença de McKinney em relação ao controle inoculado.

<sup>b</sup> Tratamento composto pela mistura de dois isolados.

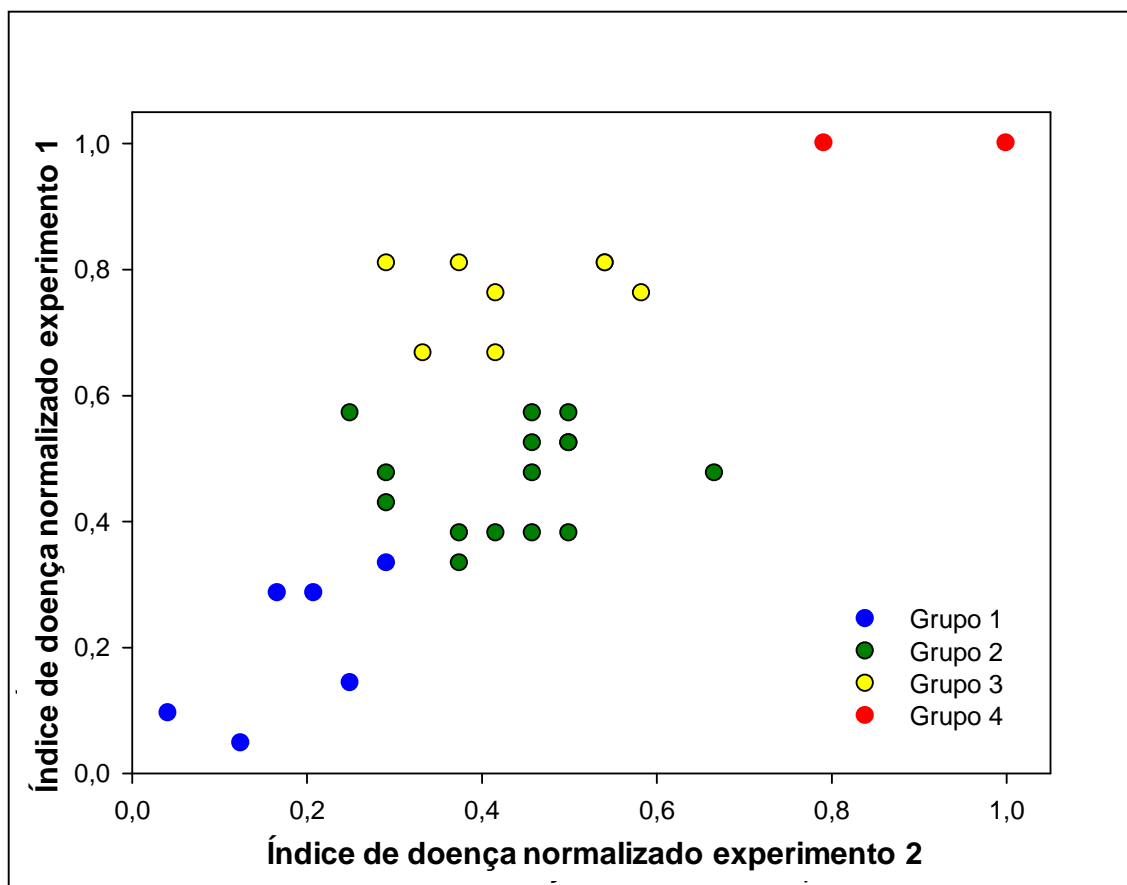
<sup>c</sup> Acessos de origem de cada rizobactéria.

<sup>d</sup> E, isolados de provável origem endofítica; R, rizobactéria.

<sup>e</sup> Porcentagens de redução da colonização de *Fusarium guttiforme* em discos de talo de abacaxi 'Pérola' em condições controladas.

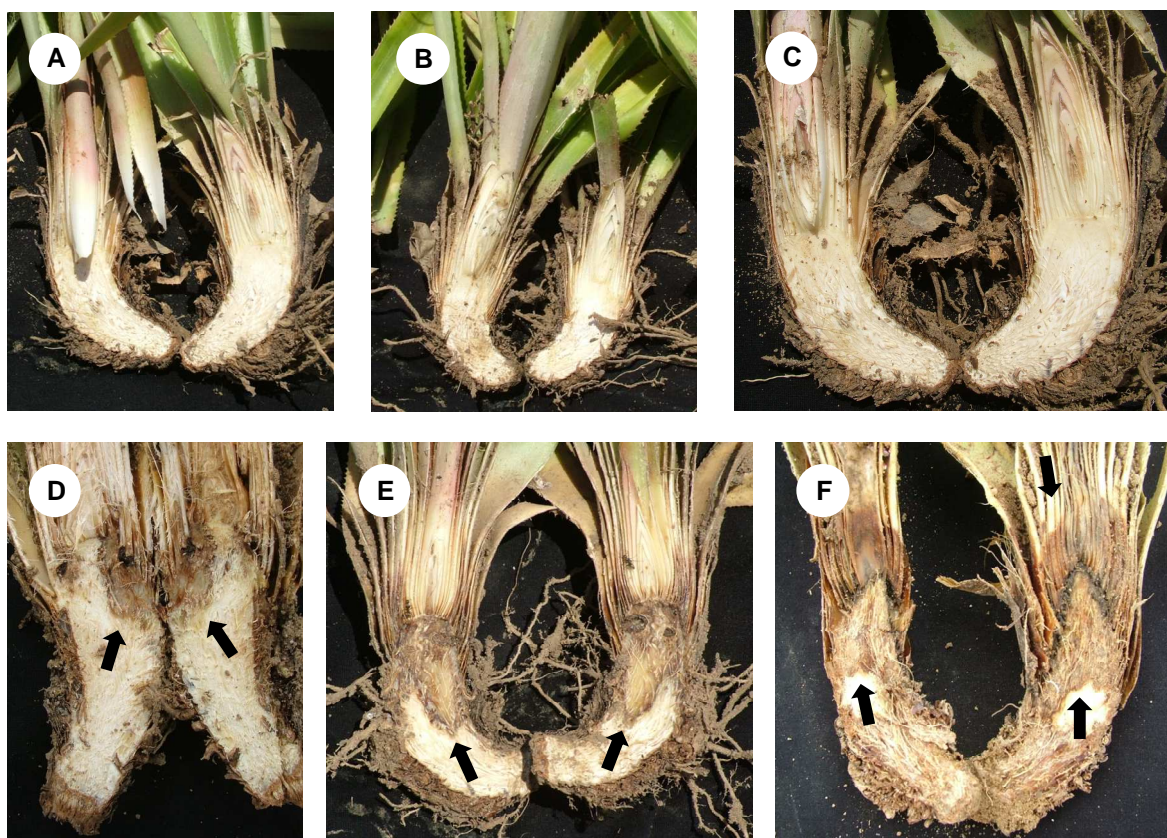
<sup>f</sup> Valores na coluna seguidos da mesma letra, não diferem entre si pelo teste de comparação múltipla não-paramétrica ( $P \leq 0.05$ ). Anexo I.

(N) Tratamentos não testados no segundo experimento.



**Figura 3.** Agrupamento de isolados em relação aos valores de índice de doença de McKinney, segundo análise de *K-clustering*. Grupo 1: E053L, E011F2, R183S5 R192MG, E043F3 e Controle não Inoculado; Grupo 2: R024F2, (E011F2+ E043F3), (R056L + E091S), E009F2, E045F3, R060L, E012F2, R017F2, R196MG, R188MG, R021F2, E134C, E062CS, R220S5 e (R017F2+ R021F2); Grupo 3: E140C, R182MG, E044F3, R194MG, R038G, R191MG, R034G, R208S5; Grupo 4: R202MG e Controle Inoculado.

Os isolados R056L e E091S que nos testes de seleção não apresentaram inibição contra *F. guttiforme*, quando aplicados em conjunto mostraram níveis de controle da doença em campo. Todavia, E011F2 e E043F3 apresentaram maior potencial de controle quando aplicados individualmente, em relação ao tratamento no qual foram aplicados em conjunto. O mesmo comportamento foi observado para R017F2 e R021F2 (Tabela 4).



**Figura 4.** Reação de plantas de abacaxi 'Pérola' à inoculação com *Fusarium guttiforme* em condições de campo após tratamento com agentes de controle biológico. **(A)** isolado E053L; **(B)** E011F2; **(C)** Controle não inoculado; **(D)** R183S5; **(E)** R202MG; e **(F)** Controle inoculado com *F. guttiforme*. Setas indicam tecido vegetal infectado pelo patógeno.

## DISCUSSÃO

Bactérias associadas ao sistema radicular de plantas constituem um importante grupo de microrganismos com potencial de uso no controle de fitopatógenos (GAMALERO et al., 2003; CHEN et al., 2003). Em teoria, hospedeiros resistentes e que ainda não foram domesticados, teriam maior probabilidade de abrigar rizobactérias e ou bactérias endofíticas com potencial de biocontrole (NOWAK, 1998). Utilizando esse raciocínio, neste estudo foram isoladas 226 bactérias de raízes de acessos de abacaxizeiro resistentes à fusariose no intuito de verificar seu potencial de uso no controle de *Fusarium guttiforme*.

Uma etapa crítica em estudos iniciais de controle biológico é a seleção de microrganismos. Ao contrário da maioria dos trabalhos, onde a seleção inicial de microrganismos é realizada *in vitro*, neste trabalho optou-se por realizar a seleção dos potenciais agentes de biocontrole em tecidos do hospedeiro. Esse critério foi estabelecido tomando como base a falta de correlação entre a eficiência de controle *in vitro* com a encontrada em casa-de-vegetação ou campo (LEMESSA E ZELLER, 2007; KILDEA et al., 2008; ZHANG et al., 2009).

Para tal, foi desenvolvida uma metodologia de inoculação de *F. guttiforme* que utiliza discos de talo de abacaxizeiro cortados na altura de 3 cm a partir da inserção na planta mãe. Embora outros métodos de inoculação de *F. guttiforme* tenham sido relatados (SANTOS, 1996), os mesmos foram desenhados para estudos de resistência varietal e sua utilização foi considerada inadequada para a seleção inicial de agentes de biocontrole. O grande número de bactérias a serem testadas e, principalmente, o fato de os métodos anteriores excluïrem a atuação direta do agente de biocontrole sobre o patógeno na superfície do tecido vegetal, foram determinantes para o desenvolvimento da nova metodologia. Considerando que tanto nas plantas quanto nas mudas, a infecção de *F. guttiforme* localiza-se no talo, progredindo para a base aclorofilada das folhas, adotou-se o método de inoculação desenvolvido neste estudo.

A maioria das bactérias isoladas neste trabalho não mostrou atividade significativa contra *F. guttiforme*. Este resultado era esperado, pois do imenso número de bactérias presentes no solo ou em associação com plantas, a maioria não é efetiva no controle biológico de doenças (CHEN et al., 1996). Esse comportamento já foi relatado em diversos estudos envolvendo a busca e seleção de agentes de controle biológico para doenças de plantas (RAJKUMAR et al., 2005; ZHANG et al., 2008). Por exemplo, Lemessa & Zeller (2007) estudando 118 bactérias isoladas de plantas de tomateiro, pimenta e batata, observaram que apenas 23 isolados foram eficientes contra *Ralstonia solanacearum* quando testados *in vitro*. Em casa-de-vegetação, apenas dois isolados (*Bacillus subtilis*-B2G e *Pseudomonas fluorescens*-APF1) reduziram significativamente a intensidade da doença em 53 % e 52 %, respectivamente.

Nos ensaios de seleção em condições controladas foram identificadas 26 bactérias que reduziram totalmente a colonização de *F. guttiforme*. Esses resultados poderiam ser explicados pela ocorrência de antagonismo direto, fenômeno bem documentado em diversas espécies de bactérias, especialmente aquelas usadas como agentes de biocontrole (CHEN et al., 1996). Para o antagonismo direto podem colaborar compostos antimicrobianos como: 2,4-diacetilfloroglucinol (DAPG) (BONSALL et al., 1997; YU et al., 2002; AHMADZADEH & SHARIFI-TEHRANI, 2009); ácido cianídrico (AHMADZADEH & SHARIFI-TEHRANI, 2009); pirolnitrina, (HWANG et al., 2002); cepacidina . (KANG et al., 1998); bacillomicina (ZHAO et al., 2010), entre outros.

A ação de compostos deste tipo sintetizados por microrganismos usados como agentes de biocontrole, tem sido descrita contra diferentes fungos fitopatogênicos, incluindo espécies de *Fusarium*. Assim, isolados de *Pseudomonas* spp. capazes de produzir 2,4 – DAPG foram eficientes contra *Rhizoctonia solani* e *Pythium ultimum* (AHMADZADEH & SHARIFI-TEHRANI, 2009). Em adição, a bacillomicina produzida por isolados de *Bacillus* spp, tem sido relatada como responsável pelo efeito antifúngico contra *Colletotrichum gloeosporioides* (LI et al., 2008) e *Verticillium dahliae* (ZHANG et al., 2008). No caso de *Fusarium*, Kotan et al. (2009) atribuíram a eficiência de *Burkholderia cepacia* no controle de três espécies (*F. oxysporum*, *F. culmorum* e *F. sambucinum*), à capacidade de produzir pirolnitrina, sideroforos, cepacinina e



lipopeptídeos, ressaltando que esses compostos apresentam amplo espectro de ação contra diversos fitopatógenos. Considerando que a capacidade de sintetizar compostos antimicrobianos é uma característica importante para microrganismos promoverem o controle de doenças de plantas (MOYNE et al. 2001), uma série de bactérias tem sido pesquisadas e ou comercializadas como agentes de controle biológico, a exemplo de *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Burkholderia cepacia*, *Bacillus cereus* e *Pseudomonas fluorescens* (EDGECOMB & MANKER, 2007; LI et al., 2008).

O presente estudo não objetivou a busca de mecanismos de ação, e nem a classificação das bactérias em nível de espécies. Todavia, estudos direcionados à identificação dos compostos envolvidos, bem como ao esclarecimento do seu papel na redução da colonização de *F. guttiforme* deverão ser conduzidos em trabalhos futuros.

Nos experimentos realizados em condições de campo, houve alta intensidade de fusariose corroborando a eficiência dos procedimentos de inoculação adotados. Todavia, o controle não inoculado também expressou sintomas da doença, embora em menor intensidade. Estes resultados podem ser explicados pelo fato de as mudas, consideradas principal veículo de disseminação da fusariose (MATOS & SANCHES, 2009), serem provenientes de áreas com histórico da doença. Nesse sentido, em futuros experimentos a procedência das mudas deverá ser cuidadosamente verificada, visando garantir que as mesmas não carreguem inóculo natural de *F. guttiforme*.

Apesar das variações observadas nos valores de intensidade da doença e níveis de controle, houve repetibilidade nos dois experimentos conduzidos em campo. Porém, ao comparar a eficiência de redução da colonização dos isolados em condições controladas com os níveis de controle observados em campo, conclui-se que não houve correspondência entre o comportamento dos isolados em ambas as condições. Este comportamento é freqüentemente observado em estudos desse tipo (HULTBERG et al., 2000; RAN, et al., 2005; RAJKUMAR et al., 2005; LEMESSA & ZELLER, 2007), sendo atribuído a diversos fatores, como, variabilidade das propriedades físicas e químicas dentro dos nichos ocupados pelos agentes de biocontrole, características do hospedeiro, bem como as

condições ambientais e experimentais que podem afetar processos inerentes aos agentes, como crescimento, colonização e expressão de mecanismos de ação (RYAN et al., 2004). Mecanismos expressos pelos isolados R105F4 e R202MG nos testes em laboratório, podem ter sido afetados ou insuficientes para promover o controle de *F. guttiforme* em campo. Em contraste, outros mecanismos que não se expressaram em condições controladas, podem ter contribuído para que os isolados R213S5, R196MG, R188MG e R065CS reduzissem a intensidade da fusariose em campo.

Com base nesses resultados pode-se concluir que, apesar de utilizar tecidos do hospedeiro como substrato, este não foi totalmente eficiente nos testes iniciais de seleção. Isto corrobora que o processo de seleção de microrganismos antagonistas continua sendo um dos grandes gargalos na busca por agentes de biocontrole. Contudo, houveram isolados, a exemplo de E053L, E011F2 e R183S5, que foram eficientes inibindo o patógeno tanto em condições controladas quanto em campo. Isto demonstra que apesar da falta de relação a seleção em discos de talo foi eficiente para identificar agentes de biocontrole.

Dos quatro grupos identificados nas análises de agrupamentos os isolados do grupo 1 (E011F2, E053L, R183S5, R192MG e E043F3) proporcionaram os melhores níveis de redução da doença. Exceto R192MG, os demais isolados não diferiram quanto à distribuição de classes, indicando a consistência dos resultados. Nesse grupo, três isolados (E011F2 e E053L E043F3) são procedentes de acessos de *Ananas comosus* var. *comosus*. Considerando que as cultivares comerciais pertencem a essa mesma espécie, estes isolados teriam grandes chances de se estabelecer e promover o biocontrole em variedades comerciais suscetíveis a exemplo de 'Smooth Cayenne'.

Diversos autores têm sugerido a combinação de agentes de biocontrole para a redução de doenças (RAUPACH & KLOEPPER, 1998; JETIYANON & KLOEPPER, 2002; HARISH et al., 2009). Nessa estratégia, tanto isolados da mesma espécie quanto isolados de espécies diferentes podem ser combinados, desde que apresentem compatibilidade entre si (JANISIEWICZ, 1996).

No presente estudo, a aplicação combinada dos isolados R056L e E091S mostrou maior eficiência de controle da doença em campo. Vale destacar que,

estes isolados não apresentaram atividade contra *F. guttiforme* em condições controladas. Latha et al. (2009) relataram a compatibilidade entre os isolados *P. fluorescens* e *B. subtilis*, sendo sua ação em conjunto responsável pela máxima redução do crescimento micelial de *Alternaria solani*. A mistura das rizobactérias *B. amyloliquefaciens* e *B. pumilus* também foi eficiente na redução da intensidade da doença em vários patossistemas (JETIYANON, 2007). Adicionalmente, a aplicação conjunta de quatro isolados de *Pseudomonas fluorescens*, reduziu significativamente em até 50 % a severidade de *Verticillium dahliae* no cultivo de algodoeiro em condições de campo (ERDOGAN & BENLIOGLU, 2009).

A aplicação em conjunto de isolados que atuam por meio de diferentes mecanismos de ação pode maximizar o potencial de controle. Esse comportamento fundamenta-se na teoria que bactérias endofíticas, as quais co-evoluíram com seu hospedeiro, têm elevado potencial em promover indução de resistência em plantas (VAN LOON et al., 1998; SILVA et al., 2008). Em adição, rizobactérias associadas ao sistema radicular de plantas não só podem atuar diretamente sobre o patógeno, mas também induzindo resistência (KOTAN et al., 2009; ZHAO et al., 2010).

Em contraste, os isolados E011F2 e E043F3 foram menos eficientes quando aplicados em conjunto em relação ao uso individual. A ineficiência da aplicação combinada de agentes de biocontrole pode ser explicada pela incompatibilidade entre os isolados, onde a produção de compostos secundários que inibem processos como, velocidade de crescimento e capacidade de colonização radicular poderiam estar envolvidos (DUFFY et al., 1996; LATHA et al., 2009).

Em muitos casos, compostos antimicrobianos se apresentam como um dos fatores determinantes para o controle de doenças de plantas, especialmente aqueles produzidos pelas rizobactérias promotoras de crescimento (BONSALL et al., 1997; KOTAN et al., 2009). A resistência sistêmica induzida também tem sido largamente apontada em diversos estudos como um dos principais mecanismos de ação envolvidos no controle de doenças de plantas (KLOPPER et al., 2004; BAKKER et al., 2007). Considerando a origem dos agentes de controle biológico testados neste trabalho e estudos preliminares que indicam alta concentração de bactérias do gênero *Bacillus* e *Pseudomonas* associadas ao sistema radicular

desses genótipos (TROCOLI et al., dados não publicados), há probabilidade de que essas espécies estejam presentes nos isolados que promoveram controle neste estudo. Desta forma, não se descarta o envolvimento de um ou mais dos mecanismos de ação descritos anteriormente. Diversos trabalhos reforçam essa teoria, uma vez que bactérias dos referidos gêneros têm sido apontadas como eficientes agentes de controle biológico de doenças de plantas em várias culturas, atuando a partir de diferentes mecanismos de ação (BAKKER et al., 2007; TROTEL-AZIZ et al., 2008; RAMOS SOLANO et al., 2008).

Independente das espécies e dos mecanismos de ação envolvidos, o presente estudo evidenciou o potencial do uso de bactérias como agentes de controle biológico da fusariose do abacaxizeiro, constituindo uma promissora alternativa para a redução do uso de fungicidas. A combinação desses agentes com práticas já estabelecidas e recomendadas para o manejo integrado da doença, certamente poderá ampliar os níveis de controle da fusariose do abacaxizeiro.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho se estudou pela primeira vez o potencial de uso de bactérias associadas ao sistema radicular de abacaxizeiros resistentes no controle da fusariose do abacaxi. Foi selecionado um grupo de bactérias que mostraram níveis significativos de controle da fusariose em campo. Nesse grupo foram encontradas tanto rizobactérias quanto bactérias de origem endofítica. O fato de que tanto rizobactérias quanto bactérias de origem endofítica terem mostrado ação contra *Fusarium guttiforme*, abre a oportunidade do uso futuro de inoculação dupla visando à ação conjunta de diferentes mecanismos de ação que a sua vez atuem em diferentes etapas do processo de infecção do patógeno.

Os níveis de controle alcançados em campo na variedade Pérola, podem ser considerados satisfatórios. Todavia, outras variedades suscetíveis com ampla presença no mercado, a exemplo de 'MD2' deverão também ser estudadas. O fato de ter identificado um grupo de isolados com níveis aceitáveis de controle em campo, aumenta as chances de encontrar bactérias que se estabeleçam e reduzam a incidência da fusariose em outros genótipos.

Pesquisas futuras são indispensáveis para, identificar as bactérias selecionadas como promissores agentes de biocontrole em nível de espécie, determinar os mecanismos de ação e compostos antimicrobianos envolvidos na redução da colonização de *F. guttiforme*, estabilidade dos agentes em condições de campo, bem como a compatibilidade com produtos utilizados na produção comercial de abacaxi.

Adicionalmente, estudos de formulação e formas de aplicação dos agentes de biocontrole serão necessários. Neste estudo o agente de biocontrole e o patógeno foram aplicados quase simultaneamente, sendo o patógeno inoculado em concentrações significativamente mais altas quando comparado ao que acontece naturalmente em campo. Desta forma, pelo menos duas opções deveriam ser exploradas em estudos futuros: a) aplicar o agente de biocontrole antecipadamente, de maneira a permitir sua estabilidade no sistema radicular das plantas e depois proceder à inoculação das mudas; e b) aplicar o agente de

biocontrole e plantar as mudas em condições de infecção natural em campo. Parâmetros como altura, matéria seca, produção e principalmente intensidade da doença em frutos também deverão ser cuidadosamente estudados, antes da recomendação destes agentes para uso comercial. Adicionalmente, será necessário avaliar o impacto ambiental da introdução em larga escala desses microrganismos no ambiente.

Considerando que agentes de biocontrole podem ser efetivos contra um amplo espectro de fitopatógenos, estudos visando à avaliação da eficiência dos isolados identificados neste estudo sobre outros patógenos do abacaxizeiro, como: *Penicillium funiculosum* (*Fusarium moniliforme*), *Phytophthora nicotianae* var. *parasítica*, *Phytophthora cinnamomi* e *Erwinia ananas* devem ser conduzidos.

Independentemente dos mecanismos envolvidos e dos estudos que deverão ser realizados no futuro, o presente estudo mostrou o potencial de uso de bactérias isoladas de raízes de abacaxizeiros como agentes de controle biológico da fusariose. Este é o primeiro relato de controle biológico da doença por meio de bactérias endofíticas e rizobactérias em condições de campo, constituindo uma promissora alternativa para a redução do uso de fungicidas. O uso destes agentes de biocontrole dentro do programa de manejo integrado da fusariose do abacaxizeiro poderá ser uma prática viável de elevado potencial de uso comercial. O fato de a produção integrada de abacaxi ser recomendada pela Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, instituição onde se desenvolveram estes trabalhos, facilitará sem dúvidas a continuidade destes estudos e a futura exploração comercial de agentes com comprovada eficiência em várias regiões produtoras do País. Espera-se que a combinação desses agentes com práticas já estabelecidas e recomendadas para o manejo integrado da doença, reduza a aplicação de fungicidas sem comprometer o controle eficiente da fusariose do abacaxizeiro no Brasil.

## REFERÊNCIAS

- AGOSTINO, F.; MORANDI, M. A. B. Análise da viabilidade comercial de produtos à base de *Bacillus subtilis* e *Bacillus pumilus* para o controle de fitopatógenos no Brasil. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. (Eds.). **Biocontrole de doenças de plantas: Uso e perspectivas**. Jaguariuna: Embrapa Meio Ambiente, p.298-316, 2009.
- AHMADZADEH, M.; SHARIFI-TEHRANI, A. Evaluation of fluorescent pseudomonads for plant growth promotion, antifungal activity against *Rhizoctonia solani* on common bean, and biocontrol potential. **Biological Control**, v.48, p.101-107, 2009.
- BACON, C. W.; HINTON, D. M. Endophytic and Biological Control Potential of *Bacillus mojavensis* and Related Species. **Biological Control** v.23, p.274-284, 2001.
- BAKER K. F. Evolving Concepts of Biological Control of Plant Pathogens. **Annual Reviews of Phytopathology**, v.25, p.67-85, 1987.
- BAKKER, P. A. H. M.; PIETERSE, C. M. J.; VAN LOON, L. C. Induced systemic resistance by fluorescent *Pseudomonas* spp. **Phytopathology**, v.97, p.239-243, 2007.
- BECKER, G. J. M.; SPOEL, H. S. Fine-tuning plant defence signaling: Salicylate versus jasmonate. **Plant Biology**, v.8, p.1-10, 2006.
- BETTIOL, W. Componentes do Controle Biológico de Doenças de Plantas. In: BETTIOL, W. (Ed.). **Controle Biológico de Doenças de Plantas**. Jaguariuna: Embrapa-CNPMA, p.1-5, 1991a.
- BETTIOL, W. Seleção de microrganismos antagônicos a fitopatógenos. In: BETTIOL, W. (Ed.). **Controle biológico de doenças de plantas**. Brasília: Embrapa Meio Ambiente, 1991b. 388p.
- BEZERRA, J. L.; COSTA, J. C. B.; POMELLA, A. W. V.; ALMEIDA, O. C. Como produzir Tricovab para controlar a vassoura-de-bruxa do cacauzeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.25, p.359, 2000.
- BONSALL, R. F.; WELLER, D. M.; THOMASHOW, L. S. Quantification of 2,4-diacetylphloroglucinol produced by fluorescent *Pseudomonas* sp. in vitro and in the rhizosphere of wheat. **Applied Environmental Microbiology**, v.63, p.951-955, 1997.
- BROADBENT, P.; BAKER, K. F.; WATERWORTH, Y. Bacterial and actinomycetes antagonistic to fungal root pathogens in Australian soils. **Australian Journal of Biological Science**, v.24, p.925-944, 1971.

BROADBENT, P.; BAKER, K. F.; WATERWORTH, Y. Effect of *Bacillus* spp. on increased growth of seedlings in steamed and nontreated soils. **Phytopathology**, v.67, p.1027-1033, 1977.

BYRNE, J. M.; DIANESE, A. C.; JI, P.; CAMPBELL, H. L.; CUPPELS, D. A.; LOUWS, F. J.; MILLER, S. A.; JONES, J. B.; WILSON, M. Biological control of bacterial spot of tomato under Weld conditions at several locations in North America. **Biological Control**, V.32, p.408-418, 2005.

CABRAL, J. R. S.; CASTELLEN, M. da S.; SOUZA, F. V. D.; MATOS, A. P. de.; FERREIRA, F. R. **Banco Ativo de Germoplasma de Abacaxi**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 35p. (Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. Circular Técnico, 146). 2004.

CABRAL, J. R. S.; MATOS, A. P. de. **BRS Ajubá, nova cultivar de abacaxi**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 4p. (Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. Comunicado Técnico, 126), 2009a.

CABRAL, J. R. S.; MATOS, A. P. de. Imperial, a New Pineapple Cultivar Resistant to Fusariosis. **Acta Horticulturae**, v.822, p.47-51, 2009b.

CAMPANHOLA, C.; BETTIOL, W. Controle biológico de pragas e outras técnicas alternativas. In: CAMPANHOLA, C.; BETTIOL, W. (Eds.). **Métodos alternativos de controle Fitossanitário**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente. p.97-163, 2003.

CHEN, W. Q.; MORGAN, D. P.; FELTS, D.; MICHAILIDES, T. J. Antagonism of *Paenibacillus lentimorbus* to *Botryosphaeria dothidea* and biological control of panicle and shoot blight of pistachio. **Plant Disease**, v.87, p.359–365, 2003.

CHEN, Y.; MEI, R.; LU, S.; LIU, L.; KLOEPPER, J. W. The use of yield increasing bacteria (YIB) as plant growth-promoting rhizobacteria in Chinese agriculture. In: UTKHEDE, R. S.; GUPTA, V. K. (Eds.). **Management of soil borne diseases**. New Delhi: Kalyani Publishers, p.165-84, 1996.

CHIN-A-WOENG, T. F. C.; BLOEMBERG, G. V.; LUGTENBERG, B. J. J. Phenazines and their role in biocontrol by *Pseudomonas* bacteria. **New Phytologist**, v.157, p.503-523, 2003.

CLEMENT, C. R.; CRISTO-ARAÚJO, M. de; D'EECKENBRUGGE, G. C.; PEREIRA, A. A.; PICANÇO-RODRIGUES, D. Origin and Domestication of Native Amazonian Crops. **Diversity**, v. 2, p.72-106, 2010.

COLLEEN, C.; SINGH, T. *In vitro* evaluation of combination of *Trichoderma harzianum* and chitosan for control of sapstain. **Biological Control**, v.50, p.262-266, 2009.

COLLINS, J. L. **The Pineapple: botany, cultivation, and utilization**. London: Leonard Hill, 1960. 294p.

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



COOK, R. J.; BAKER, K. F. **The nature and practice of plant pathogens**. St. Paul, Minnesota: APS Press, American Phytopathological Society, 1983. 539p.

COPPENS D'EECKENBRUGGE, G., LEAL, F. **Fruits from America: An ethno botanical inventory**. 2001. Disponível em: <http://www.cefe.cnrs.fr/ibc/pdf/coppens/Fruits%20from%20America/Fruits%20from%20America.htm>. Acessado em: 20 de janeiro de 2010.

COPPENS D'EECKENCCBRUGGE, G.; DUVAL, M. F. The domestication of pineapple: context and hypotheses. **Pineapple News**, v.16, p.15-27, 2009.

COPPENS D' EECKENBRUGGE, G.; LEAL, F. Morphology, Anatomy and Taxonomy. In: BARTHOLOMEW, D. P.; PAULL, R. E.; ROHRBACH, K. G. (Eds.). **The Pineapple: Botany, Production and Uses**. Wallingford: CAB International, p.13-32, 2003.

CUNHA, G. A. P. da; REINHARDT, D. H. R. C. **Orientações básicas para o cultivo do abacaxizeiro**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 4p. (Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. Comunicado Técnico, 110), 2004.

Da ROCHA, A. R.; HAMMERSCHMIDT, R. History and perspectives on the use of disease resistance inducers in horticultural crops. **Horttechnology**, v.15, p.518–529, 2005.

DUFFY, B.; KEEL, C.; DEFAGO, G. Potential role of pathogen signaling in multitrophic plant-microbe interactions involved in disease protection. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, n.3, p.1836-1842, 2004.

DUFFY, B. K.; SIMON, A.; WELLER, D. M. Combination of *Trichoderma koningii* with fluorescent pseudomonads for control of take-all on wheat. **Phytopathology**, v.86, p.188–194, 1996.

DURRANT, W. E.; DONG, X. Systemic Acquired Resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v. 42, p.185–209, 2004.

DUVAL, M-F.; NOYER, J-L.; PERRIER, X.; COPPENS D'EECKENBRUGGE, G.; HAMON, P. Molecular diversity in pineapple assessed by RFLP markers. **Theoretical and applied genetics**, v.102, p.83-90, 2001.

EDGECOMB, D. W.; MANKER, D. C. Serenade (*Bacillus subtilis* strain QST 713) and Sonata (*Bacillus pumilus* strain QST 2808), new biological tools for integrate and organic disease control programs. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS DE PLANTAS, 9., 2007, São Paulo. **Anais**. São Paulo: UNICAMP, 2007.

ERDOGAN, O.; BENLIOGLU, K. Biological control of Verticillium wilt on cotton by the use of fluorescent *Pseudomonas* spp. under field conditions. **Biological Control**, doi:10.1016/j.biocontrol.2009.11.011, 2009.

FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of United Nations. **Agricultural Database**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/381/DesktopDefault.aspx?>> Acessado em: 20 de janeiro de 2010.

FRAVEL, D. R. Role of antibiotics in the biocontrol of plant disease. **Annual Review of Phytopathology**, v.26, p.75-91, 1988.

GAMALERO, E.; LINGUA, G.; BERTA, G.; LEMANCEAU, P. Methods for studying root colonization by introduced beneficial bacteria. **Agronomie** v.23, p.407-418, 2003.

GEHRING, A. M.; MORI, I.; WALSH, C. T. Reconstitution and characterization of the *Escherichia coli* enterobactin synthetase from *EntB*, *EntE* and *EntF*. **Biochemistry**, v.37, p.2648-2659, 1998.

GERHARDT, P. **Methods for General and Molecular Bacteriology**. Washington: American Society for Microbiology, 1994. 791p.

HAAS, D.; DEFAGO, G.; Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. **Nature Review Microbiology**, v.3, n.4, p.307-319, 2005.

HAMMERSCHMIDT, R. Induced disease resistance: how do induced plants stop pathogens? **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.55, p.77-84, 1999.

HAMMERSCHMIDT, R. Introduction: definitions and some history. In: WALTERS, D.; NEWTON, A.; LYON, G. (Eds.). **Induced Resistance for Plant Disease Control: A Sustainable Approach to Crop Protection**. Oxford: Blackwell Publishing, p.1-8, 2007.

HARISH, S.; KAVINO, M.; KUMAR, N.; BALASUBRAMANIAN, P.; SAMIYAPPAN, R. Induction of defense-related proteins by mixtures of plant growth promoting endophytic bacteria against Banana bunchy top virus. **Biological Control**, v.51, p.16-25, 2009.

HATCHER, P. E.; PAUL, N. D. Beetle grazing reduces natural infection of *Rumex obtusifolius* by fungal pathogens. **New Phytology**, v.146, p.325-333, 2000.

HULTBERG, M.; ALSANIUS, B.; SUNDIN, P. *In Vivo* and *in Vitro* Interactions between *Pseudomonas fluorescens* and *Pythium ultimum* in the Suppression of Damping-off in Tomato Seedlings. **Biological Control**, v.19, p.1-8, 2000.

HWANG, J.; CHILTON, W. S.; BENSON, D. M. Pyrrolnitrin production by *Burkholderia cepacia* and biocontrol of *Rhizoctonia* stem rot of poinsettia. **Biological Control**, v.25, p.56-63, 2002.

IBGE. INSTI. TUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção Agrícola Municipal**. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acessado em: 22 de fevereiro de 2010.

IBGE. INSTI. TUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção Agrícola Municipal**. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acessado em: 18 de setembro de 2009.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acessado em: 08 de janeiro de 2010.

ISHIDA, A. K. N.; SOUZA, R. M.; RESENDE, M. L. V.; CAVALCANTI, F. R.; OLIVEIRA, D. L.; POZZA, E. A. *Rhizobacterium* and acibenzolar-S-methyl (ASM) in resistance induction against bacterial blight and expression of responses in cotton. **Tropical Plant Pathology**, v.33, n.1, p.27-34, 2008.

ISHMARU, C. A.; KLOS, E. J.; BRUBAKER, R. R. Multiple antibiotic production by *Erwinia herbicola*. **Phytopathology**, v.78, n.6, p.746-750, 1988.

JANISIEWICZ, W. J. Ecological diversity, niche overlay and coexistence of antagonists used in developing mixtures for biocontrol of postharvest diseases of apples. **Phytopathology**, v.86, p.473-479, 1996.

JETIYANON, K. Defensive-related enzyme response in plants treated with a mixture of *Bacillus* strains (IN937a and IN937b) against different pathogens. **Biological Control**, v.42, p.178-185, 2007.

JETIYANON, K.; KLOEPPER, J. W. Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria for induction of systemic resistance against multiple plant diseases. **Biological Control**, v.24, p. 285-291, 2002

KADO, C. I.; HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, v.60, p.669-679, 1970.

KANG, S. H.; CHO, H. S.; CHEONG, H.; RYU, C. M.; KIM, J. F.; PARK, S. H. Two bacterial endophytes eliciting both plant growth promotion and plant defense on pepper (*Capsicum annuum* L.). **Journal Microbiology Biotechnology**, v.17, p.96-103, 2007.

KANG, Y.; CARLSON, R.; THARPE, W.; SCHELL, M. A. Characterization of genes involved in biosynthesis of a novel antibiotic from *Burkholderia cepacia* BC11 and their role in biological control of *Rhizoctonia solani*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, p.3939-3947, 1998.

KEFIALEW, Y.; AYALEW, A. Postharvest biological control of anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) on mango (*Mangifera indica*). **Postharvest Biology and Technology**, v.50, p.8-11, 2008.

KERR, A. Biological control of crown gall through production of Agrocin 84. **Plant Disease**, v.64, p.24-30, 1980.

KERR, A.; TATE, M. E. Agrocins and the biological control of crown gall. **Microbiology Science**, v.1, n.1, p.1-4, 1984.

KILDEA, S.; RANSBOTYN, V.; KHAN, M. R.; FAGAN, B.; LEONARD, G.; MULLINS, E.; DOOHAN, F. M. *Bacillus megaterium* shows potential for the biocontrol of septoria tritici blotch of wheat. **Biological Control**, v.47, p.37-45, 2008.

KIMATI, H.; TOKESHI, H. Nota sobre a ocorrência de *Fusarium* sp. causando resinose fúngica em abacaxi. **Revista de Agricultura**, v.39, p.131-133, 1964.

KLOEPPER, J. W.; BEAUCHAMP, C. J. A review of issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, v.38, p.1219-32, 1992.

KLOEPPER, J. W.; BREWER, J. W.; HARRISON, M. D. Insect transmission of *Erwinia corotovora* var *corotovora* and *Erwinia corotovora* var *atroseptica* to potato plants in the field. **American Journal of Potato Research**, v.58, n.4, p.165-175, 1981.

KLOEPPER, J. W.; LEONG, J.; TEINTZE, M.; SCROTH, M.N. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature*, v.286, p.885-886, 1980.

KLOEPPER, J. W.; LIFSHITZ, R.; SCHROTH, M. N. ***Pseudomonas* inoculants to benefit plant production**. ISI Atlas Science: Animal Plant Science, p.60-64, 1988.

KLOEPPER, J. W.; RYU, C. M.; ZHANG, S.; Induced resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. **Phytopathology**, v.94, p.1259–1266, 2004.

KLOEPPER, J. W.; ZABLOTOWICZ, R. M.; LIFSHITZ, R. Plant growth-promoting mediated by rhizosphere colonizers. In: KEISTER, D.; CREGAN, P. B. (Eds.). **The rhizosphere and plant growth**. Dordrecht: Academic Publishers, p.315-326, 1990.

KORSTEN, L. Advances in control of postharvest diseases in tropical fresh produce. **International Journal of Postharvest Technology and Innovation**, v.1 n.1, p.48–61, 2006.

KOSAKA, H.; AIKAWA, T.; OGURA, N.; TABATA, K.; KIYOHARA, T. Pine wilt disease caused by the pine wood nematode: the induced resistance of pine trees by the avirulent isolates of nematode. **European Journal of Plant Pathology**, v.107, p.667–675, 2001.

KOTAN R.; FIKRETTIN, S.; ERKOL, D.; CAFER, E. Biological control of the potato dry rot caused by *Fusarium* species using PGPR strains. **Biological Control**, v.50, p.194–198, 2009.

JOHNSON, M.O. **The Pineapple**. Hawaii: Honolulu. 1935. 306p.

LATHA, P.; ANAND, T.; RAGUPATHI, N.; PRAKASAM, V.; SAMIYAPPAN, R. Antimicrobial activity of plant extracts and induction of systemic resistance in tomato plants by mixtures of PGPR strains and Zimmu leaf extract against *Alternaria solani*. **Biological Control**, v.50, p.85–93, 2009.

LEMESSA, F.; ZELLER, W. Screening rhizobacteria for biological control of *Ralstonia solanacearum* in Ethiopia. **Biological Control**, v.42, p.336–344, 2007.

LEHR, N. A.; SCHREY, S. D.; HAMPP, R.; TARKKA, M. T. Root inoculation with a forest soil streptomycete leads to locally and systemically increased resistance against phytopathogens in Norway spruce. **New Phytopathology**, v.177, p.965–976, 2008.

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. **The *Fusarium* Laboratory Manual**. Blackwell Publishing, 2006. 369p.

LI, L. B.; ZHANG, C. Y.; LI, S. N.; LI, J.; GUO, X. J.; ZHU, B. C. Isolation and identification of the antagonistic bacterial strain 8-59 against *Colletotrichum gloeosporioides*. **Journal of Agricultural University of Hebei**, v.31, n.3, p.64–68, 2008.

LIU, B.; QIAO, H.; HUANG, L.; BUCHENAUER, H.; HAN, Q.; KANG, Z.; GONG, Y. Biological control of take-all in wheat by endophytic *Bacillus subtilis* E1R-j and potential mode of action. **Biological Control**, v.49, p.277–285, 2009.

LIU, J. Y.; MALDONADO-MENDOZA, I.; LOPEZ-MEYER, M.; CHEUNG, F.; TOWN, C. D.; HARRISON, M. J. Arbuscular mycorrhizal symbiosis is accompanied by local and systemic alterations in gene expression and an increase in disease resistance in the shoots. **Plant Journal**, v.50, p.529–544, 2007.

LUTHER, H. E. **An alphabetical list of Bromeliad binomials**. 9 ed. Sarasota: The Bromeliad Society International, 2004. 109p.

LUZ, W. C. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas e de bioproteção. In: LUZ, W. C. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.4, p.1-49, 1996.

LYVER, A.; SMITH, J. P.; AUSTIN, J.; BLANCHFIELD, B. Competitive inhibition of *Clostridium botulinum* type E by *Bacillus* species in a value-added seafood product packaged under modified atmosphere. **Food Research International**, v.31, n.4, p.311-319, 1998.

MAFIA, R. G.; ALFENAS, A. C.; MAFFIA, L. A.; FERREIRA, E. M.; BINOT, D. H. B.; MAFIA, G. M. V. Plant growth promoting rhizobacteria as agents in the biocontrol of eucalyptus mini-cutting rot. **Tropical Plant Pathology**, v.34, n.1, p.10-17, 2009.

MARI, M.; NERI, F.; BERTOLINI, P. Novel Approaches to Prevent and Control Postharvest Diseases of Fruit. **Stewart Postharvest Review**, v.3 n.6, Article 4, 2007.

MATOS, A. P. de. Doença e seu controle. In: CUNHA, DA G. A. P.; CABRAL, J. R. S.; SOUZA, L. F. da S. (Eds.). **O abacaxizeiro: Cultivo, agroindústria e economia**. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, p.269-305, 1999.

MATOS, A. P. de. Pineapple fusariosis in Brazil: an overview. **Fruits**, v. 42, n.7/8, p. 417-422, 1987.

MATOS, A. P. de. Métodos de inoculação com *Fusarium moniliforme* Sheld. var. *subglutinans* MR & RG em abacaxi 'Pérola'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.1, p.37-41, 1978.

MATOS, A. P. de; CABRAL, J. R. S. Evaluation of Pineapple Genotypes for Resistance to *Fusarium subglutinans*. **Acta Horticulturae**, v.702, p.73-77, 2006.

- MATOS, A. P. de; CABRAL, J. R. S. **Manejo integrado da fusariose do abacaxizeiro**, 2p. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. (Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. Boletim técnico - Abacaxi em Foco, 32), 2005.
- MATOS, A. P. de; MOURICHON, X.; PINON, A. Occurrence of *Fusarium moniliforme*. var. *subglutinans* on pineapple in Bolívia. **Fruit**, v.47, p.33, 1992.
- MATOS, A. P. de; REINHARDT, D. H. Pineapple in Brazil: Characteristics, Research and Perspectives. **Acta Horticulturae**, v.822, p.25-36, 2009.
- MATOS, A. P. de; SANCHES, N. F.; TEIXEIRA, F. A.; ELIAS JÚNIOR, J. Integrated Management of Fusariosis in Pineapple Fields under Integrated Production System. **Acta Horticulturae**, v.822, p.199-204, 2009.
- MAVRODI, D. V.; BLANKENFELDT, W.; THOMASHOW, L. S. Phenazine compounds in fluorescent *Pseudomonas* spp. biosynthesis and regulation. **Annual Review of Phytopathology**, v.44, p.417-445, 2006.
- MELNICK, R. L.; ZIDACK, N. K.; BAILEY, B. A.; MAXIMOVA, S. N.; GUILTINAN, M.; BACKMAN, P. A. Bacterial endophytes: *Bacillus* spp. from annual crops as potential biological control agents of black pod rot of cacao. **Biological Control**, v.46, p.46-56, 2008.
- MELO I. S.; AZEVEDO J. L. **Ecologia Microbiana**. Embrapa-CNPMA, Jaguariúna-SP, 1998. 488p.
- MONTEALEGRE, J. R.; LUCHSINGER, L. E. Postharvest rot of pineapple fruits marketed in Chile. **Fitopatologia**, v.25, n.2, p.51-53, 1990.
- MORANDI, M. A. B.; BETTIOL, W. Controle biológico de doenças de plantas no Brasil. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. (Eds.). **Biocontrole de Doenças de Plantas: Uso e Perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente. p.07-14, 2009.
- MOREIRA, B. A.; WANDERLEY, M. G. L.; BARROS, M. A.V. C. **Bromélias: importância ecológica e diversidade. Taxonomia e morfologia** - Curso de Capacitação de Monitores. São Paulo: Instituto de Botânica, 2006. 12 p.
- MOYNE, A. L.; SHELBY, R.; CLEVELAND, T. E.; TUZUN, S.; Bacillomycin D: an iturin with antifungal activity against *Aspergillus flavus*. **Journal of Applied Microbiology**, v.90, p.622-629, 2001.
- NEILANDS, J. B. Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. **The Journal of Biological Chemistry**, v.270 p.26723-26726, 1995.
- NELSON, P. E.; TOUSSON, T. A.; MARASAS, W. F. O. **Fusarium species an illustrated manual for identification**. The Pennsylvania State: University Press, University Park and London, 1983. 193 p.
- NIRENBERG, H. I.; K. O'DONNELL. New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex. **Mycologia**, v.90, p.434-458, 1998.

NORDLUND, D. A. Biological control, integrated pest management and conceptual models. **Biocontrol News and Information**, v.17, p.35N-44N, 1996.

NOWAK, J. Benefits of *in vitro* 'biotization' of plant tissue cultures with microbial inoculants. **In Vitro Cellular & Developmental Biology**, v.34, p.122-130, 1998.

OLIVEIRA, A. L. M.; URQUIAGA S.; BALDANI, J. I. **Processos e mecanismos envolvidos na influência de microrganismos sobre o crescimento vegetal**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 40p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 161), 2003.

OLIVEIRA, A. M. G.; CABRAL, J. R. S.; SOUZA, L. F. da S.; REINHARDT, D. H. **Época de plantio e indução floral do abacaxizeiro 'pérola', em assentamentos do extremo sul da Bahia**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2p. (Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. Comunicado Técnico, abacaxi em foco, n. 25), 2004.

OLIVEIRA, M. L.; LUZ, E. D. M. N. Identificação e manejo das principais doenças do cacaueteiro no Brasil. In: VALLE, R. R. (Ed.). **Ciência, tecnologia e manejo do cacaueteiro**. 1. ed. Itabuna: Gráfica e Editora Vital Ltda, p.123-188, 2007.

PATEL, A.; DESHATTIWAR, M.; CHAUDHARI, B.; CHINCHOLKAR, S. Production, purification and chemical characterization of the catecholate siderophore from potent probiotic strains of *Bacillus* spp.. **Bioresource Technology**, v.100, p.368-373, 2009.

PATRIARCA, E. J.; TATÉ, R.; IACCARINO, M. Key role of bacterial NH<sub>4</sub> metabolism in *Rhizobium*-plant Symbiosis. **Microbiology and Molecular Biology Review**, v.66, p.203-222, 2002.

PERAZZOLLI, M.; DAGOSTIN, S.; FERRARI, A.; ELAD, Y.; PERTOT, I. Induction of systemic resistance against *Plasmopara viticola* in grapevine by *Trichoderma harzianum* T39 and benzothiadiazole. **Biological Control**, v.47, p.228-234, 2008.

PIERSON, L. S. III.; PIERSON, E. A.; MORELO, J. E. N-acyl-homoserine lactone-mediated gene regulation in biological control by fluorescent pseudomonads: Current knowledge and future work. **European Journal of Plant Pathology**, v.104, p.1-9, 1998.

PIETERSE, C. M. J.; VAN LOON, L. C. Signalling cascades involved in induced resistance. In: WALTERS, D.; NEWTON, A.; LYON, G. (Eds.). **Induced Resistance for Plant Disease Control: A Sustainable Approach to Crop Protection**. Blackwell Publishing, Oxford, p. 65-88, 2007.

PIETERSE, C. M. J.; VAN PELT, J. A.; VAN WEES, S. C. M.; TON, J.; VERHAGEN, B. W. M.; LÉON-KLOOSTERZIEL, K.; HASE, S.; DE VOS, M.; VAN OOSTEN, V.; POZO, M.; SPOEL, S.; VAN DER ENT, S.; KOORNNEEF, A.; CHALFUN-JUNIOR, A.; RESENDE, M.L.V.; VAN LOON, L.C. Indução de resistência sistêmica por rizobactérias e comunicação na rota de sinalização para uma defesa refinada. **Revisão de Patologia de Plantas**, v.13, p.277-319, 2005.

PISSARRA, T. B.; CHAVES, G. M.; VENTURA, J. A. Sintomatologia da fusariose (*Fusarium moniliforme* Scheld.var. *subglutinans* Wr. & Rq.) do abacaxizeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.4, p.225-263, 1979.

POMELLA, A. W. V. A utilização do controle biológico para grandes culturas – a experiência do grupo Sementes Faroupilha. **Summa Phytopathologica**, v.34, p.195-196, 2008.

POZO, M. J.; AZCÓN-AGUILAR, C. Unraveling mycorrhiza-induced resistance. **Current Opinion in Plant Biology**, v.10, p.393–398, 2007.

PY, C.; LACOEUILHE, J. J.; TEISON, C. L. **Ananas, as culture, ses produits**. Paris: G. P. Maisonneuve et Larose et A. C. C. T., 1984. 562p.

RAJKUMAR, M.; LEE, W. H.; LEE, K. J. Screening of bacterial antagonists for biological control of *Phytophthora* blight of pepper. **Journal of Basic Microbiology**, v.45, p.55–63, 2005.

RAMAMOORTHY, V.; VISWANATHAN, R.; RAGUCHANDER, T.; PRAKASAM, V.; SAMIYAPPAN, R. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. **Crop Protection**, v.20, p.1–11, 2001.

RAMOS SOLANO, B.; BARRIUSO MAICAS, J.; PEREYRA DE LA IGLESIA, M. T.; DOMENECH, J.; GUTIÉRREZ MAÑERO, F. J. Systemic disease protection elicited by plant growth promoting rhizobacteria strains: Relationship between metabolic responses, systemic disease protection, and biotic elicitors. **Phytopathology**, v.98, p.451-457, 2008.

RAN, L. X.; LIU, C. Y.; WU, G. J.; VAN LOON, L. C.; BAKKER, P. A. H. M. Suppression of bacterial wilt in *Eucalyptus urophylla* by fluorescent *Pseudomonas* spp in China. **Biological Control**, v.32, p.111–120, 2005.

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

ROHRBACH, K. G.; TANIGUCHI, G. Effects of temperature, moisture, and stage of inflorescence development on infection of pineapple by *Penicillium funiculosum* and *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*. **Phytopathology**, v.74, n.8, p.995-1000, 1984.

ROMEIRO, R. da S. **Controle biológico de doenças de plantas: Fundamentos**. Viçosa: Editora UFV, 2007a. 269p.

ROMEIRO, R. da S. **Controle Biológico de Doenças de Plantas: Procedimentos**. Viçosa: Editora UFV, 2007b. 172p.

ROMEIRO, R. da S. **Métodos em bacteriologia de plantas**. Viçosa: Editora UFV, 2001. 279p.

ROMEIRO, R. S.; GARCIA, F. A. O. Indução de resistência em plantas a patógenos por eliciadores de natureza bacteriana. In: BETTIOL, W.; MORANDI,



M. A. B. (Eds.). **Biocontrole de doenças de plantas: Uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, p.85-99, 2009.

RYALS, J. A.; NEUENSCHWANDER, U. H.; WILLITS, M.G.; STEINER, H. Y.; HUNT, M. D. Systemic acquired resistance. **Plant Cell**, v.8, p.1808–1819, 1996.

RYAN, A. D.; KINKEL, L. L.; SCHOTTEL, J. L. Effect of pathogen isolate, potato cultivar, and antagonist strain on potato scab severity and biological control. **Biocontrol Science and Technology**, v.14, p.301–311, 2004.

SANEWSKI, G.; SCOTT, C. The Australian pineapple Industry. In: SUBHADRABANDHU, S.; CHAIRIDCHAI, P. (Eds.). **Proceedings of the Third International Pineapple Symposium**. Thailand: International Society for Horticultural Science, p.53-55, 2000.

SANTOS, R. L. M. S. **Técnicas de inoculação com *Fusarium subglutinans* em folhas destacadas de abacaxizeiro e estudos da interação patógeno/hospedeiro**. 1996, 45p., Dissertação (Mestrado em Agronomia, Universidade Federal da Bahia). Cruz das Almas, Universidade Federal da Bahia, 1996.

SCHIPPERS, A. B.; BAKKER, A. W.; BAKKER, P. H. M. A. Interactions of Deleterious and Beneficial Rhizosphere Microorganisms and the Effect of Cropping Practices. **Annual Review of Phytopathology**, v. 5, p.339-358, 1987.

SCHROTH, M. N.; BECKER, J. O. Concepts of ecological and physiological activities of rhizobacteria related to biological control and plant growth promotion. **Biological Control of Soil Borne Plant Pathogens**, v.87, p.51-54, 1990.

SHARMA, R. R.; DINESH, S.; RAJBIR, S. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. **Biological Control** v.50, p.205–221, 2009.

SIEGRIST, J.; OROBER, M.; BUCHENAUER, H. DL- $\beta$ -aminobutyric acid-mediated enhancement of resistance in tobacco to tobacco mosaic virus depends on the accumulation of salicylic acid. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.56, n.3, p.95-106, 2000.

SILVA, A. C. M. **Diversidade genética, densidade populacional e potencial de promoção de crescimento de rizobactérias associadas ao cacauzeiro**. 2007, 88p., Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias). Cruz das Almas: Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2007.

SILVA, H. S. A.; ROMEIRO, R. S.; MACAGNAN, D.; HALFELD-VIEIRA, B. A.; PEREIRA, M. C. B.; MOUNTEER, A. Rhizobacterial induction of systemic resistance in tomato plants: non-specific protection and increase in enzyme activities. **Biological Control**, v.29, n.2, p.288-295, 2004.

SILVA, H. S. A.; TERRASAN, C. R. F.; TOZZI, J. P. L.; MELO, I. S.; BETTIOL, W. Bactérias endófitas do cafeeiro e a indução de enzimas relacionadas com o controle da ferrugem (*Hemileia vastratrix*). **Tropical Plant Pathology**, v.33, n.1, p.49-54, 2008.

SMITH, K. P.; GOODMAN, R. M. Host variation for interactions with beneficial plant-associated microbes. **Annual Review of Phytopathology**, v.37, p.473-491, 1999.

SMITH, L. B. **Notes on Taxonomy of Ananas and Pseudananas**. Harvard: Botanical Museum Leaflet, p.73-81, 1939.

STEPHAN, H.; FREUND, S.; BECK, W.; JUNG, G.; MEYER, J.M.; WINKELMANN, G. Ornibactin a new family of siderophores from *Pseudomonas*. **Biomaterials**, v.6, p.93–100, 1993.

STICHER, L., MAUCH MANI, B.; METRAUX, J. P. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v.35, p. 35-270, 1997.

TROTEL-AZIZ, P.; COUDERCHET, M.; BIAGIANTI, S.; AZIZ, A. Characterization of new bacterial biocontrol agents *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Pantoea* and *Pseudomonas* spp. mediating grapevine resistance against *Botrytis cinerea*. **Environmental and Experimental Botany**, v.64, p.21–32, 2008.

TSAI, Y.L.; LIN, Y.C.; HSU, S.T.; TZENG, K.C. The relation of antibiosis to the biocontrol of bacterial spot of sweet pepper by *Pseudomonas putida* YLFP14. **Plant Pathology Bulletin**, v.13, n.3, p.201-210, 2004.

VALLAD, G. E.; GOODMAN, R. M. Systemic Acquired Resistance and Induced Systemic Resistance in Conventional Agriculture. **Crop Science Society of America**, v.44, n.6, p.1920–1934, 2004.

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

VICENT, M. N.; HARRISON, L.A.; BRACKIN, J.M.; KOVACEVICH, P.A.; MUKERJI, P.; WELLER, D.M., PIERSON, E.A. Genetic analysis of the antifungal activity of a soilborne *Pseudomonas aureofaciens* strain. **Applied and Environmental Microbiology**, v.57, p.2928–2934, 1991.

WALTERS, D. R. Are plants in the field already induced? Implications for practical disease control. **Crop Protection**, v.28, p.459-465, 2009.

WALTERS, D. R.; DANIELL, T. Microbial induction of resistance to pathogens. In: WALTERS, D., NEWTON, A., LYON, G. (Eds.). **Induced Resistance for Plant Disease Control: A Sustainable Approach to Crop Protection**. Blackwell Publishing, Oxford, p.65–88, 2007.

WALTERS, D.; WALSH, D.; NEWTON, A.; LYON, G. Induced resistance for plant disease control: maximising the efficacy of resistance inducers. **Phytopathology**, v.95, p.1368–1373, 2005.

WEI, H. L.; ZHANG, L. Q. Quorum-sensing system influences root colonization and biological control ability in *Pseudomonas fluorescens* 2p24. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.89, p.267-280, 2006.

WELLER, D. M. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. **Annual Review Phytopathology**, v.26, p.379-407, 1988.

WIESE, J.; KRANZ, T.; SCHUBERT, S. Induction of pathogen resistance in barley by abiotic stress. **Plant Biology**, v.6, p.529–536, 2004.

WRIGHT, S. A. I.; BEER, S. V.; BONN, W. G. The role of antibiotics in biological control of fire blight by *Erwinia herbicola* strain EH318. **Acta Horticulturae**, v.411, p.309-311, 1996.

YIN, S. W.; CHANG, J. K.; XUN, P. C. Studies in the mechanisms of antagonistic fertilizer "5406" IV. The distribution of the antagonistic in soil and its influence on the rhizosphere. **Acta Phytopathologica Sinica**, v.11, p.259-288, 1965.

YIN, S. W.; KENG, D. C.; YANG, K. Y.; CHEU, D. A further study on the biological control of *verticillium* wilt of cotton. **Acta Phytopathologica Sinica**, v.3, p.55-61, 1957.

YU, G. Y.; SINCLAIR, J. B.; HARTMAN, G. L.; BERTAGNOLLI, B. L.; Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*. **Soil Biology and Biochemistry**, v.34, p.955–963, 2002.

ZAGO, V. C. P.; DE-POLLI, H.; RUMJANEK, N. G. **Pseudomonas spp. Fluorescentes – Bactérias promotoras de crescimento de plantas e biocontroladoras de fitopatógenos em sistemas de produção agrícola**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 32p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 127), 2000.

ZHANG, H.; YANG, X. M.; RAN, W.; XU, Y. C.; SHEN, Q. R. Screening of bacterial antagonistic against soil-borne cotton *Verticillium* wilt and their biological effects on the soil cotton system. **Acta Pedol. Sinica**, v.45, n.6, p.1095–1100, 2008.

ZHANG, S.; WHITE, T. L.; MARTINEZ, M. C.; MCINROY, J. A.; KLOEPPER, J. W.; KLASSEN, W. Evaluation of plant growth-promoting rhizobacteria for control of *Phytophthora* blight on squash under greenhouse conditions. **Biological Control**, In prelo, doi:10.1016/j.biocontrol.2009.10.015, 2009.

ZHAO, Z.; WANG, Q.; WANG, K.; BRIAN, K.; LIU, C.; GU, Y. Study of the antifungal activity of *Bacillus vallismortis* ZZ185 in vitro and identification of its antifungal components. **Bioresource Technology**, v.101, p.292–297, 2010.

ZUCCHI, T. D.; MELO, I. S. de. Controle biológico de fungos aflatoxigênicos. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. (Eds.). **Biocontrole de Doenças de Plantas: Uso e Perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente. p.68-84, 2009.

## ANEXOS

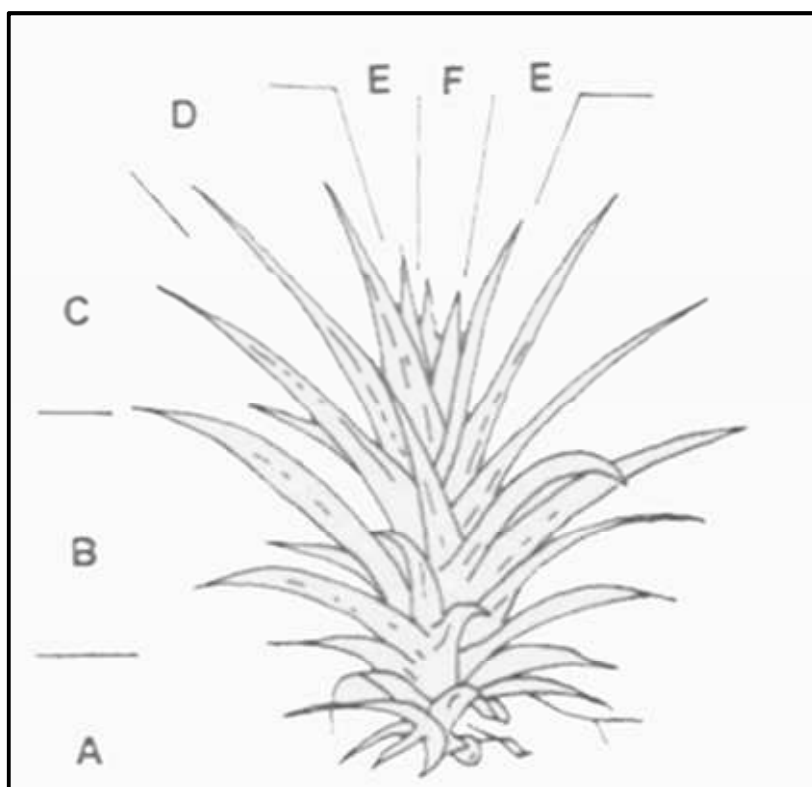
---

**ANEXO I.** Análises de estatística não paramétrica dos experimentos de campo. Valores nas colunas correspondem à soma dos *rankings* dos dados de severidade registrados com base na escala de avaliação de 6 classes.

Experimento 1		Experimento 2	
Tratamento	Soma dos <i>rankings</i> *	Tratamento	Soma dos <i>rankings</i> *
E053L	84,50 a*	CN	63,50 a
CN	116,50 ab	E053L	125,50 ab
E011F2	148,50 ab	R183S5	156,50 ab
R192MG	254,00 ab	R192MG	211,50 abc
R183S5	263,50 ab	E011F2	230,50 abc
E043F3	296,50 ab	E062CS	232,00 abc
R024F2	302,00 ab	R038G	273,50 abc
E011F2+E043F3 <sup>b</sup>	333,00 ab	R060L	273,50 abc
E045F3	334,00 ab	E012F2	275,00 abc
E009F2	337,00 ab	E140C	316,50 abc
R056L + E091S <sup>b</sup>	338,50 ab	R056L + E091S <sup>b</sup>	325,00 abc
R060L	365,00 ab	E044F3	334,00 abc
E012F2	380,50 ab	R024F2	349,00 abc
R196MG	398,00 ab	R021F2	350,50 abc
R017F2	402,00 ab	R182MG	381,50 abc
R213S5	416,00 ab	E011F2+E043F3 <sup>b</sup>	381,50 abc
E020F2	416,00 ab	R188MG	400,50 abc
R188MG	418,00 ab	R017F2	411,00 abc
R021F2	431,50 ab	R220S5	411,00 abc
R065CS	439,50 ab	E009F2	414,00 abc
E134C	457,50 ab	E134C	420,00 abc
E062CS	463,50 ab	R208S5	452,50 abc
R017F2+R021F2 <sup>b</sup>	477,00 ab	R021F2	457,00 abc
R220S5	491,00 ab	R017F2+R021F2 <sup>b</sup>	457,00 abc
R182MG	546,00 ab	R194MG	485,00 abc
E140C	560,00 ab	R034G	500,00 abc
R194MG	603,50 ab	R196MG	570,50 abc
E044F3	607,50 ab	R202MG	631,00 bc
R038G	627,50 ab	CP	696,00 c
R191MG	631,00 ab	-	-
R034G	645,00 ab	-	-
R208S5	655,00 ab	-	-
R033F3	665,00 ab	-	-
R105F4	698,50 ab	-	-
R202MG	750,00 b	-	-
CP	757,50 b	-	-

\* Valores na coluna seguidos da mesma letra, não diferem entre si pelo teste de comparação múltipla não-paramétrica a 5 % de probabilidade.

**ANEXO II.** Filotaxia em abacaxizeiro. Localização das folhas “D” e “F”.



**Fonte:** Oliveira et al., 2004.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)