



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA



EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FLORESTAIS

SILVIA MARA COELHO DO NASCIMENTO

CONTROLE BIOLÓGICO DA PODRIDÃO BASAL (*Thielaviopsis ethacetica*) E  
NUTRIÇÃO MINERAL DA PALMA DE ÓLEO

BELÉM – PA

2017

**SILVIA MARA COELHO DO NASCIMENTO**

**CONTROLE BIOLÓGICO DA PODRIDÃO BASAL (*Thielaviopsis ethacetica*) E  
NUTRIÇÃO MINERAL DA PALMA DE ÓLEO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais da Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Ciências Florestais: área de concentração Ciências Florestais, para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Cândido Ferreira de Oliveira Neto

Co-orientador: Dr. Eudes de Arruda Carvalho

**BELÉM – PA**

**2017**

---

Nascimento, Silvia Mara Coelho do

Controle Biológico da Podridão Basal (*Thielaviopsis ethacetica*) e  
Nutrição Mineral em Palma de Óleo. / Silvia Mara Coelho do Nascimento.  
– Belém, PA, 2018.

105 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais – Ciências Florestais) –  
Universidade Federal Rural da Amazônia.

Orientador: Cândido Ferreira de Oliveira Neto. Co-Orientador: Dr.  
Eudes de Arruda Carvalho.

1. Palma de Óleo. 2. Podridão Basal - Etiologia. 3. Nutrição Mineral  
– Palma de Óleo. 4. Resistência e Fertilização Foliar. I. Oliveira Neto,  
Cândido Ferreira de, (orient.) II. Carvalho, Eudes de Arruda (Co-Orient.).  
III. Título

CDD – 633.851

---

**SILVIA MARA COELHO DO NASCIMENTO**

**CONTROLE BIOLÓGICO DA PODRIDÃO BASAL (*Thielaviopsis ethacetica*) E  
NUTRIÇÃO MINERAL DA PALMA DE ÓLEO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Ciências Florestais: área de concentração em Ciências Florestais, para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Cândido Ferreira de Oliveira Neto

Co-orientador: Eudes de Arruda Carvalho

Aprovado em 23 de Fevereiro de 2017.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Cândido Ferreira de Oliveira Neto  
Orientador

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA

---

Dr. Eudes de Arruda Carvalho  
Co-orientador  
EMBRAPA QUARENTENA VEGETAL

---

Dra. Alessandra Keiko Nakasone Ishida. 1ª Examinadora  
EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL

---

Dr. Marcelo Murad Magalhães. 2º Examinador  
EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL

---

Dr. Vinícius Ide Franzini. 3º Examinador  
EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL

A Deus meu criador,

Sei que fiz a minha parte, mas não esqueço que a vitória é sua.

## **OFEREÇO**

Áqueles que estiveram ao meu lado, em todos os momentos de minha vida, pelo incentivo, apoio e compreensão durante esta caminhada, Em especial ao meu pai **Sigismundo do Nascimento**, à minha **Mãe Maria do Socorro**, à **minha tia Mariney**, e à minha família.

## **DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

Antes de tudo, a Deus, que na sua infinita misericórdia me ofereceu juntamente com as dificuldades a força para superá-las e por ter me dado paz, saúde e discernimento ao longo do processo de pesquisa.

Aos meus pais, Maria do Socorro e Sigismundo do Nascimento, pelo amor incondicional, apoio, paciência e carinho. Por serem fonte de inspiração e exemplo de vida, por sempre acreditarem em mim e me incentivarem a não desistir dos meus sonhos.

Às minhas queridas irmãs, Silvani Miriam, Siziane Meire e Taiane Naiara, que sempre torceram por mim para que eu tivesse êxito em todos os âmbitos da vida.

Aos meus queridos e amados sobrinhos, Matheus da Silva, Sophia da Silva e Heloísa Coelho, pelas alegrias, descontrações, brincadeiras e risadas.

Às minhas amadas tias, Marinei Coelho, Nazinha Coelho e Marli Coelho que compartilharam dessa trajetória, estendendo-me em algum momento a mão para que eu continuasse.

À minha amada e querida vizinha Oldemarina Costa (in memoriam), que sempre me apoiou em todos os momentos de minha vida.

Ao meu Co-orientador da Pós-graduação e Orientador da Graduação Dr. Eudes de Arruda Carvalho, pela orientação, e a quem tenho a mais alta estima e respeito pela sua sabedoria e competência profissional, pela confiança, paciência, disponibilidade, total apoio, ensinamentos e todas as valiosas oportunidades, de fundamental importância à minha formação acadêmica e profissional.

À Dra. Alessandra Keiko, pela orientação, disposição e colaboração na execução dos trabalhos. Pelas correções e sugestões à dissertação, mas, principalmente, pelo seu profissionalismo, amizade, retidão e pela sua simplicidade e gentileza para comigo, e pela maneira com que me transmitiu conhecimento.

Ao meu orientador e incentivador Professor Dr. Cândido Ferreira de Oliveira Neto, pelos conhecimentos, pela paciência, parceria, compartilhar idéias e acima de tudo por me deixar livre para ter iniciativas.

Ao Dr. Vinicius Franzini, pela imensurável contribuição nas análises nutricionais complementares a esse trabalho, pela orientação ao longo de todo o tempo de desenvolvimento do experimento e pelas valiosas sugestões.

Aos membros da banca da minha defesa de qualificação Dra. Kenny Bonfim e Dr. Marcelo Murad, pelas contribuições e sugestões para a melhoria desse trabalho.

Aos integrantes do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa, em especial a Lísias Aline, pela prontidão com que sempre me acompanhou nas análises dos experimentos. Ao Seu Manoel Andrade, Dona Clenilda Tolentino e seu Nivaldo, pelo grande crescimento pessoal e profissional que cada um me proporcionou. Agradeço imensamente a todos pela convivência, apoio, carinho e pela ajuda na execução deste trabalho.

Às amigas, Susana Eliot, Carina Melo, Kézia Ferreira, Josiane Castro, Rayanne Alencar, Sandra Valéria e Kátia Regina pelo apoio, incentivo, solidariedade nos momentos difíceis, pelos dias agradáveis e aprendizados infindáveis e, principalmente, pelas conversas e ensinamentos que guardo com carinho.

Às amigas Lucélia Rosa, Camila Tavares, Marlene Evangelista e ao amigo Juscelino Gonçalves pelos longos anos de amizade, descontração, choros e risos.

À Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), pela oportunidade de realização deste curso.

À Embrapa Amazônia Oriental, em especial ao Laboratório de Fitopatologia pela concessão do espaço físico e estrutura para a condução dos experimentos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de mestrado.

Ao Ministério do Desenvolvimento Agrário (MDA), pelo auxílio financeiro ao desenvolvimento dessa pesquisa e aquisição da casa de vegetação e outros de equipamentos disponibilizada à Embrapa.

Às empresas produtoras de óleo de palma Denpasa e Belém Bioenergia Brasil pela doação de mudas de palma óleo para a condução dos experimentos.

Àos profissionais e respectivas empresas José do Nascimento e Eduardo Cancian (Satis); Luis Henrique (Syngenta); João Almeida, Bruno Henrique e Gabriel Vasco (Agrichem) pelas doações e recomendações de potenciais indutores de resistência para a palma de óleo.

A todas as pessoas que de qualquer forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho e que não foram supracitadas, o meu sincero agradecimento.

**Muito obrigada!**

*“Talvez não tenhamos conseguido fazer o melhor, mas lutamos para que o melhor fosse feito. Não somos o que deveríamos ser, não somos o que iremos ser... mas Graças a Deus, não somos o que éramos.”*

**(Martin Luther King)**

## SUMÁRIO

1. CONTEXTUALIZAÇÃO.....	18
1.1 Objetivo geral.....	29
1.2 Objetivos específicos.....	29
REFERÊNCIAS.....	30
2. A ETIOLOGIA DA PODRIDÃO BASAL DO ESTIPE DA PALMA DE ÓLE. ....	40
RESUMO.....	40
ABSTRACT.....	41
2.1 Introdução.....	42
2.2 Material e métodos.....	44
Isolamento do fungo e teste de patogenicidade.....	44
Mensuração do crescimento micelial e avaliações de características morfológicas.....	44
Caracterização molecular.....	45
- Extração de DNA e análise filogenética.....	45
2.3 Resultados e discussão.....	46
Isolamento do fungo e teste de patogenicidade.....	46
Mensuração do crescimento micelial e avaliações de características morfológicas.....	48
Caracterização molecular.....	49
2.4 Conclusão.....	50
REFERÊNCIAS.....	51
3. CONTROLE BIOLÓGICO NO MANEJO DA PODRIDÃO BASAL DA PALMA DE ÓLEO.....	54

RESUMO.....	54
ABSTRACT.....	55
3.1 Introdução.....	56
3.2 Material e métodos.....	57
Microorganismos.....	57
Seleção <i>in vitro</i> de agentes de controle biológico.....	58
- Antagonismo de <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>Thielaviopsis ethacetica</i> .....	58
- Antagonismo de <i>Bacillus</i> spp. sobre <i>Thielaviopsis ethacetica</i> .....	58
Produção de enzimas hidrolíticas pelos antagonistas .....	59
- Protease.....	59
- Quitinase.....	59
Seleção <i>in vivo</i> de agentes de controle biológico .....	60
- Preparo e aplicação dos antagonistas .....	60
- Preparo e aplicação do inóculo de <i>Thielaviopsis ethacetica</i> .....	60
Análise das características bioquímicas.....	60
- Coleta de amostras e extração enzimática .....	60
- Atividade de $\beta$ -1,3 glucanase ( E.C. 3.2.129).....	61
- Atividade de Quitinase .....	61
- Atividade de peroxidase (E.C. 1.11.1.7) .....	61
- Atividade de de polifenoloxidase (E.C. 1.10.3.1) .....	62
Análise estatística .....	62

3.3 Resultados e discussão.....	62
Antagonismo de <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>Thielaviopsis ethacetica</i> .....	62
Antagonismo de <i>Bacillus</i> spp. sobre <i>Thielaviopsis ethacetica</i> .....	64
Produção de enzimas hidrolíticas pelos antagonistas .....	66
Teste <i>in vivo</i> para o controle da podridão basal .....	68
Atividade de $\beta$ -1,3-glucanase e quitinase .....	70
Atividade da peroxidase do guaiacol .....	72
Atividade da polifenol oxidase .....	74
3.4 Conclusão .....	75
REFERÊNCIAS .....	76
4.INDUTORES DE RESISTÊNCIA E NUTRIÇÃO MINERAL: CRESCIMENTO NUTRIÇÃO E RELAÇÃO COM DOENÇAS EM PALMA DE ÓLEO.....	82
RESUMO.....	82
ABSTRACT.....	83
4.1 Introdução.....	84
4.2 Material e métodos.....	86
Local do estudo e características do solo.....	86
Delineamento experimental e tratamentos.....	86
Fertilização do solo.....	87
Fertilização do foliar dos tratamentos.....	88
Avaliações de desenvolvimento das plantas e do estado nutricional.....	88
Análise estatística .....	89

4.3 Resultados e discussão .....	89
Desenvolvimento vegetativo da palma de óleo .....	89
Estado nutricional da palma de óleo .....	93
4.4 Conclusão.....	100
REFERÊNCIAS.....	101
CONCLUSÕES GERAIS.....	105
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	106

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 01. Teste de patogenicidade em mudas de palma de óleo com e sem ferimentos, inoculadas com discos de micélios e por suspensão de conídios com o fungo <i>Thielaviopsis</i> sp.....	44
Figura 02. Sintomas da podridão basal em mudas de palma de óleos: Lesões necróticas marrom escuro (A, B); exsudação de resina (C); folhas amareladas que secavam e quebravam (D, E e F).....	47
Figura 03. Crescimento da colônia e surgimento de coloração branca após 24 e 48h e surgimento de coloração negra após 72h.....	48
Figura 04. Estruturas reprodutivas: micélio, endoconídios (conídios primários e secundários) e aleurioconídios.....	49
Figura 05. Dendograma filogenético máxima parcimônia das regiões ITS e EF de isolado de <i>Thielaviopsis ethacetica</i> .....	50
Figura 06. Teste de antagonismo por pareamento entre <i>Trichoderma</i> spp. e <i>Thielaviopsis ethacetica</i> : A-T03, B - T06, C - T09, D - T-07 e E-Testemunha.....	63
Figura 07. Teste de pareamento entre <i>Bacillus</i> sp. e <i>Thielaviopsis ethacetica</i> : A – Bac 03 e B –Testemunha.....	66
Figura 08. Produção de protease dos isolados de <i>Bacillus</i> spp.(Bac): A-Bac 01; B-Bac 02; C-Bac 03; D-Bac 04; E-Bac 57; F-Bac 61; G-Bac 77 e H-Bac 104.....	67
Figura 9. Área Abaixo da Curva de Progresso da Severidade (AACPS) da podridão basal mensurada pelo comprimento de lesão em mudas de palma de óleo do HIE Manicoré com 2 anos de idade tratadas com isolados de <i>Bacillus</i> spp. e <i>Trichoderma</i> spp. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.....	69

Figura 10. Severidade da podridão basal em mudas de palma de óleo tratadas com *Bacillus* spp. e *Trichoderma* spp.: A- T03, B – Bac 57 e C – Testemunha.....69

Figura 11. Atividade da  $\beta$ -1,3-glucanase em mudas de palma de óleo do HIE manicoré com 2 anos de idade tratadas com isolados de *Bacillus* spp. e *Trichoderma* spp no intervalo de 30 dias de avaliação. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.....72

Figura 12. Atividade da quitinase em mudas de palma de óleo do HIE manicoré com 2 anos de idade tratadas com isolados de *Bacillus* spp. e *Trichoderma* spp. no intervalo de 30 dias de avaliação. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.....72

Figura 13. Atividade da peroxidase em mudas de palma de óleo do HIE manicoré com 2 anos de idade tratadas com isolados de *Bacillus* spp. e *Trichoderma* spp. no intervalo de 30 dias de avaliação. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.....73

Figura 14. Atividade da polifenol oxidase em mudas de palma de óleo do HIE manicoré com 2 anos de idade tratadas com isolados de *Bacillus* spp. e *Trichoderma* spp. no intervalo de 30 dias de avaliação. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.....74

Figura 15. Tratamentos em casa de vegetação.....89

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Médias do índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) do fungo <i>Thielaviopsis ethacatica</i> no teste de antagonismo direto com isolados de <i>Trichoderma</i> spp. (T), e notas segundo a escala de Bell et al. (1982).....	63
Tabela 2. Médias do índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) do fungo <i>Thielaviopsis ethacatica</i> no teste de antagonismo direto com isolados de <i>Bacillus</i> spp.(Bac).....	65
Tabela 3. Produção de enzimas hidrolíticas dos isolados de <i>Bacillus</i> spp. (Bac) e <i>Trichoderma</i> spp. (T), produtores de protease e quitinase.....	67
Tabela 4. Tratamentos avaliados no experimento.....	87
Tabela 5. Matéria seca de parte aérea (MSPA), de raiz (MSR) e total (MST) e parâmetros de desenvolvimento vegetativo de mudas de palma de óleo.....	92
Tabela 6. Teor de macronutrientes na parte aérea de mudas de palma de óleo.....	94
Tabela 7. Acúmulo de macronutrientes na parte aérea de mudas de palma de óleo.....	96
Tabela 8. Teor e acúmulo de silício na parte aérea de mudas de palma de óleo.....	99

## RESUMO

A palma de óleo (*Elaeis guineenses*) é considerada uma das culturas perenes mais promissoras para o agronegócio em âmbito global, destacando-se como a oleaginosa de maior importância mundial. No entanto, o seu cultivo é limitado por diversas doenças fúngicas. A podridão basal do estipe tem se tornado uma ameaça ao cultivo, devido a sua rápida disseminação e ausência de controle eficaz. Sendo assim, torna-se cada vez mais importante, estudos da doença. Diante disso, este trabalho objetivou estudar a etiologia da podridão basal, bem como, selecionar *Bacillus* spp. e *Trichoderma* spp. no controle biológico, avaliar indutores de resistência e a fertilização foliar no crescimento e na nutrição mineral da palma de óleo com a capacidade de fornecer nutrientes-chave relacionados à resistência a doenças. Para isso, o isolado de *Thielaviopsis* sp. foi obtido a partir de plantas apresentando podridões no estipe e na base da folha flecha e procedeu-se a caracterização morfológica e análise filogenética. O teste de patogenicidade em palma de óleo comprovou a o fungo *Thielaviopsis* sp. como agente etiológico da Podridão Basal, tanto no híbrido intraespecífico (HIE) Manicoré, quanto no híbrido intraespecífico Tenera. O fungo foi classificado como *Thielaviopsis ethacetica* com base em características morfológicas e análises filogenéticas com base nas regiões EF-1 $\alpha$  e ITS. Para o estudo de biocontrole, foram realizados os testes *in vitro*, caracterização bioquímica (protease e quitinase), testes *in vivo* e análise de enzimas relacionadas à patogênese em mudas de palma de óleo (glucanase, quitinase, peroxidase guaiacol e polifenoloxidase). Os isolados de *Trichoderma* spp. apresentaram até 52% (T03) de inibição do crescimento do patógeno enquanto os de *Bacillus* spp. até 100% (Bac 01, Bac 02 e Bac 03). Os isolados de *Bacillus* spp. foram positivos para a protease, enquanto que para os isolados de *Trichoderma* spp. foram negativos. Nenhum dos isolados apresentou produção de quitinase. No controle *in vivo*, proporcionaram redução da dos sintomas da doença. Plantas tratadas com os isolados T06, T03, T07, Bac 61, T09, Bac 03, Bac 02, Bac 04, Bac 104 e Bac 01 reduziram a porcentagem da área do tecido lesionado e apresentaram menor progresso da doença. Houve diferença significativa entre tratamentos para a glucanase, quitinase e polifenoloxidase analisada ao final do período de 30 dias após o tratamento. O isolado Bac 03 se destacou dos demais agentes de bicontrol por apresentar um potencial antagonista no controle *in vitro* de *Thielaviopsis ethacetica*, produção de protease, além de reduzir a severidade da podridão basal e de induzir a atividade das enzimas glucanase, quitinase e polifenoloxidase na defesa da palma de óleo. Na etapa subsequente da pesquisa, avaliou-se indutores de resistência e a nutrição mineral em mudas de palma de óleo. Mudas foram cultivadas em casa de vegetação, no período entre outubro de 2014 a outubro de 2015. Os tratamentos foram os produtos comerciais: Bion<sup>®</sup>, Fulland<sup>®</sup>, Reforce<sup>®</sup>, Yantra<sup>®</sup>, Vitakelp<sup>®</sup> + Stayflex<sup>®</sup>, Dephensor<sup>®</sup>, silicato de cálcio, silicato de sódio, quatro combinações de nutrientes (A, B, C e D) e três tratamentos controle. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Os tratamentos que proporcionaram maior matéria seca de parte aérea de palma de óleo foram Fulland<sup>®</sup>, combinação D (6% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> e 15% K<sub>2</sub>O), silicato de cálcio e silicato de sódio. A correção da acidez do solo com corretivo contendo alto teor de magnésio melhorou a nutrição da palma de óleo em cálcio e magnésio. Os indutores de resistência, principalmente os que são fontes de nutrientes, e a nutrição mineral apresentaram o potencial de melhorar o crescimento e a nutrição mineral da palma de óleo em nutrientes-chave ligados à resistência de plantas a doenças.

**Palavras-chave:** Etiologia. Controle biológico. Indução de Resistência. Nutriente. *Elaeis* spp.

## ABSTRACT

The oil palm (*Elaeis guineense*) is considered one of the most promising perennial crops for agribusiness in the global sphere, standing out as the most important oilseed in the world. However, its cultivation is limited by several fungal diseases. Basal sprout rot has become a threat to the crop because of its rapid spread and lack of effective control. Thus, it becomes increasingly important, disease studies. Therefore, this work aimed to study the etiology of basal rot, as well as to select *Bacillus* spp. and *Trichoderma* spp. in the biological control, to evaluate resistance inducers and foliar fertilization in the growth and mineral nutrition of the oil palm. For this, the isolate of *Thielaviopsis* sp. was obtained from plants presenting yellowish rot in the stipe and at the base of the arrow leaf and proceeded the morphological characterization and phylogenetic analysis. The pathogenicity test in oil palm confirmed the fungus *Thielaviopsis* sp. as the etiological agent of Basal Rot in both the intraspecific hybrid (HIE) Manicoré and the intraspecific hybrid Tenera. The fungus was classified as *Thielaviopsis ethacetica* based on morphological characteristics and phylogenetic analyzes based on the EF-1 $\alpha$  and ITS regions. In vitro tests, biochemical characterization (protease and chitinase), in vivo tests and enzyme analysis related to the pathogenesis of oil palm seedlings (glucanase, chitinase, peroxidase guaiacol and polyphenoloxidase) were performed for the biocontrol study. The isolates of *Trichoderma* spp. showed up to 52% (T03) of inhibition of the growth of the pathogen while those of *Bacillus* spp. up to 100% (Bac 01, Bac 02 and Bac 03). The isolates of *Bacillus* spp. were positive for the protease, whereas for the isolates of *Trichoderma* spp. were negative. None of the isolates presented chitinase production. In the *in vivo* control, they provided a reduction in the symptoms of the disease. Plants treated with the isolates T06, T03, T07, Bac 61, T09, Bac 03, Bac 02, Bac 04, Bac 104 and Bac 01 reduced the percentage of the area of the injured tissue and showed less progress of the disease. There was a significant difference between treatments for glucanase, chitinase and polyphenoloxidase analyzed at the end of the 30 day period after treatment. Bac 03 isolated from other biocontrol agents because it presents a potential antagonist in the *in vitro* control of *Thielaviopsis ethacetica*, production of protease, besides reducing the severity of basal rot and inducing the activity of the enzymes glucanase, chitinase and polyphenoloxidase in the defense of the oil palm. In the subsequent stage of the research, resistance inducers and mineral nutrition were evaluated in oil palm seedlings. Seedlings were grown in greenhouse between October 2014 and October 2015. The treatments were commercial products: Bion®, Fulland®, Reforce®, Yantra®, Vitakelp® + Stayflex®, Dephensor®, calcium silicate, sodium silicate, four nutrient combinations (A, B, C and D) and three control treatments. Data were submitted to analysis of variance and means were compared by the Scott-Knott test at 5% probability. The treatments that provided the highest dry matter of oil palm were Fulland®, combination D (6% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> and 15% K<sub>2</sub>O), calcium silicate and sodium silicate. Correction of soil acidity with a high magnesium content corrector improved the oil palm nutrition in calcium and magnesium. Resistance inducers, primarily nutrient sources, and mineral nutrition have the potential to enhance oil palm growth and mineral nutrition in key nutrients linked to plant resistance to disease.

**Keywords:** Etiology. Biological control. Induction of Resistance. Nutrient. *Elaeis* spp.

## 1. CONTEXTUALIZAÇÃO

A palma de óleo ou dendezeiro é uma palmeira oleaginosa, monocotiledônea, pertencente à ordem Palmales e família Arecaceae (CHIA et al., 2009), de origem africana, cultivada na África, Ásia e América. O gênero compreende duas espécies, uma de origem americana, denominada de Caiaué (*Elaeis oleifera* H. B. K. Cortês), e outra africana, (*Elaeis guineensis* Jacq) (OOI et al., 1981). No Brasil, foi introduzida no estado da Bahia, no século XV e seu cultivo se expandiu para o norte do país (PANDOLFO, 1981; VENTURIERI et al., 2009).

Na espécie *E. guineensis* pode-se distinguir duas variedades quanto a espessura do endocarpo no fruto: a variedade Pisífera, que possui frutos sem endocarpo e a Dura, em que o endocarpo apresenta espessura variando entre 2-6 mm, além de um híbrido intraespecífico, o Tenera, proveniente do cruzamento de Pisífera x Dura com espessura do endocarpo menor que 2 mm. O híbrido Tenera possui a maior preferência de cultivo em virtude do seu alto rendimento de polpa do endocarpo e, conseqüentemente, elevado rentabilidade de óleo (MUNIRAN et. al, 2008; SANTOS, 2010; FERREIRA et al., 2012). Esta palmeira produz dois tipos de óleo, o óleo de palma extraído da polpa ou mesocarpo do fruto e o óleo de palmiste obtido da semente ou amêndoa, com amplos usos nas indústrias alimentícia, cosmético e biodiesel (LEVERMANN & SOUZA, 2014).

A palma de óleo é considerada uma das culturas perenes mais promissoras para o agronegócio em âmbito global, destacando-se como a oleaginosa de maior importância mundial (CORLEY & TINKER, 2003). A Indonésia e Malásia são os principais produtores, compreendendo aproximadamente 85% da produção mundial de óleo de palma (OBIDZINSKI et al., 2012; FAO, 2014). Outros grandes produtores incluem Tailândia, Colômbia e Nigéria (FAO, 2014). A produção mundial estimada em aproximadamente 275 milhões de toneladas, distribuída entre os continentes Asiático (87,44%), Africano (5,84%), Americano (5,84%) e Oceania (0,87%) (FAO, 2014).

O Brasil ocupa a décima posição no ranking de países produtores, com produção estimada em 1.393.873 de toneladas (FAO, 2014). O país possui o maior potencial mundial para a produção do óleo da palma, com ampla disponibilidade de terras para o cultivo, com aproximadamente 75 milhões de hectares de terras, com destaque para os estados do Pará, Bahia e Amapá (RAMALHO FILHO et al., 2010). No cenário nacional, o estado do Pará, destaca-se como o maior produtor de óleo de palma, com produção média anual de 770 mil toneladas por ano e uma área plantada de aproximadamente 180 mil hectares, respondendo por 83% da safra nacional (IBGE, 2015). O município de Tailândia destaca-se como maior

produtor no estado (38,93%), seguido por Acará (16,82%) e Moju (13,57%), que, juntos, perfizeram 62,39% do total da produção no Pará (IBGE, 2015). O país apresenta enorme capacidade produtiva e disponibilidade de áreas alteradas para expansão dos cultivos da palma de óleo que é indicada como uma das principais alternativas para a agricultura na Amazônia (CHIA et al., 2009; HOMMA, 2010).

Além de apresentar extensas áreas agricultáveis para o seu cultivo no Brasil, a palma de óleo se sobressai frente às demais oleaginosas, por apresentar grande potencial socioeconômico e ambiental, contribuindo para a geração de emprego e renda, com intensiva utilização de mão-de-obra local, fixação do homem no campo, alternativa para recuperação de áreas degradadas, fixação do dióxido de carbono, redução das emissões dos gases do efeito estufa e produção de energia renovável (CHIA et al., 2009; BECKER, 2010).

No entanto, a franca expansão do cultivo da palma de óleo aliada ao monocultivo da cultura enfrentam sérias limitações decorrentes da incidência de doenças, o que altera consideravelmente o metabolismo bioquímico e fisiológico das plantas, com reflexos marcantes na redução do crescimento e perda produtiva. Doenças de etiologia fúngica, como murchas, manchas foliares e podridões são as que afetam em maior escala os dendzeais em todo país (CARVALHO et al, 2011; CARVALHO & SANTOS, 2013).

Dentre elas, destaca-se a podridão basal do estipe, cujo agente etiológico é o fungo *Thielaviopsis paradoxa* (de Seynes), anamorfo do ascomiceto *Ceratocystis paradoxa* (de Seynes), recentemente reclassificado em outros patossistemas como *Thielaviopsis ethacetica* (MBENOUN et al., 2014).

### **Podridão basal**

A podridão basal do estipe em palma de óleo, cujo agente etiológico é o fungo *Thielaviopsis paradoxa*, é uma doença importante em diversos países. Foi descrita pela primeira vez em palma de óleo na Nigéria, tendo *Thielaviopsis paradoxa* como agente etiológico, causando podridão na base do estipe e morte da cultura, e em outras localidades da África, como Camarões e Ghana (ROBERTSON, 1962). No Equador, provocou grandes danos à produção (CHAVEZ, 1986). Na Colômbia também causou graves danos aos plantios de palma de óleo (TOVAR & NIETO, 1998). No Brasil, foi descrito causando podridão basal do estipe no estado do Pará (BOARI & TREMACOLDI, 2012; CARVALHO, et al., 2011) e na Bahia (MOURA et al., 2013) e, hoje, esta doença se encontra distribuída em grande parte das principais regiões produtoras do Brasil e do mundo.

*T. paradoxa* é um patógeno oportunista, que infecta monocotiledôneas, sobrevive no solo por longos períodos e em restos de culturas em decomposição, sendo associado às doenças de plantas com algum tipo de estresse (ALVAREZ et al., 2012). Pode ser dispersado pela chuva, insetos ou por ferramentas usadas na colheita ou erradicação de plantas doentes (ALVAREZ et al., 2012).

A classificação taxonômica de *Thielaviopsis paradoxa* foi recentemente redefinida para *Thielaviopsis ethacetica* a partir de análises morfológicas e filogenéticas, em outros patossistemas, segundo Mbenoun et al. (2014).

*Thielaviopsis ethacetica* Went. foi originalmente descrito em Java, como agente etiológico da podridão do abacaxi da cana de açúcar (WENT, 1983). Sendo posteriormente reavaliado e descrito como sinônimo de *Thielaviopsis paradoxa* (De Seynes) Höhn, baseado na similaridade morfológica entre os dois fungos (HOHNEL 1904). Os dois fungos por serem considerados idênticos, *T. ethacetica* foi ignorado dos estudos posteriores, permanecendo o *T. paradoxa* agente etiológico de inúmeras plantas hospedeiras (DE BEER et al., 2014).

Recentemente, através de estudos filogenéticos, o complexo de *T. paradoxa* foi reavaliado, fornecendo evidências de que *T. ethacetica* é uma entidade biológica taxonômica distinta, geneticamente diferente de *T. paradoxa* (MBENOUN, et al., 2014; DE BEER, et al., 2014), e que representam um complexo de espécies morfológicamente semelhantes e filogeneticamente diferentes. Dessa forma, acredita-se que por muitos anos *T. ethacetica* tenha sido confundido com *T. paradoxa*, como agente etiológico de diversas doenças e hospedeiros diferentes. Há, portanto, a necessidade de se determinar a espécie associada aos sintomas em palma de óleo. O fungo *T. paradoxa* já foi relatado causando doenças em diversas culturas de importância econômica, como na palma de óleo (*Elaeis guineenses* Jacq.) (ALVAREZ et al., 2012), no coqueiro (*C. nucifera* L.) (WARWICK et al., 2004), na bananeira (*Musa* sp.) (ALVINDIA et al., 2000), no abacaxizeiro (*Ananas comosus* L.) (FERRARI, 2009) e na cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) (CHAPOLA, 2010).

Os sintomas da podridão basal do estipe manifestam-se na parte aérea da planta, afetando caules e folhas, podendo ocorrer também à podridão em sementes (EZIASHI et al., 2006). Inicialmente nos caules ocorrem as lesões de coloração marrom escuro a negro tornando os tecidos secos e quebradiços. As folhas apresentam coloração amarelo progredindo para seca até a quebra (BUITRAGO & NIETO 1995).

Não existe um método de controle comprovadamente eficiente para a podridão basal em palma de óleo. As técnicas de manejo são paliativas e têm se restringido ao monitoramento periódico da plantação e erradicação de plantas severamente infectadas

(NIETO, 1995; TOVAR & NIETO, 1998). Há relatos de produtores que, em campo procedem cirurgia ou podas, com aplicação de fungicidas cúpricos e inseticidas naturais repelentes, como alcatrão, sobre a área lesionada (NIETO, 1995; TOVAR & NIETO, 1998). Quanto ao tratamento químico, ainda não existem produtos fitossanitários registrados para o tratamento da podridão basal (MAPA, 2017).

Desta forma, para obter produção sustentável da palma de óleo, são necessárias medidas fitossanitárias que previnam o surgimento de doenças e garantam uma boa produtividade da cultura, contudo, sem causar danos ao homem e ao ambiente. Em função disso, preconizam métodos alternativos de controle da doença. Sendo assim, o controle biológico, a indução de resistência e a nutrição mineral, inseridos no manejo integrado da doença, podem ser alternativas promissoras no controle da podridão basal em palma de óleo.

Microrganismos do gênero *Trichoderma* e rizobactérias do gênero *Bacillus* são amplamente estudados como agentes de controle biológico (YOU, et al., 2016; DUBEY, et al., 2015; MORADI et al., 2012; ZALILA-KOLS, et al., 2016) e têm grande potencial para serem utilizados no controle de doenças que afetam a cultura da palma de óleo. Além do mais, a nutrição mineral de plantas, desempenha papel fundamental na melhoria no metabolismo secundário das espécies vegetais correlacionadas com o aumento da resistência da planta a doenças (MARSCHNER, 1995) e tem se mostrado promissora no manejo de várias doenças (POZZA & POZZA, 2006).

### **Controle Biológico**

O controle biológico por microrganismos constitui importante estratégia para o manejo de doenças de plantas, reduzindo os danos ao ambiente e ao homem. O controle biológico baseia-se na relação antagônica entre microrganismo e fitopatógeno, podendo ser caracterizado por diferentes mecanismos, agindo sinergisticamente. Estes mecanismos envolvem antibiose, competição por nutrientes ou espaço, micoparasitismo, produção de enzimas líticas e indução de resistência no hospedeiro (BETTIOL, 2009).

Nas ações que envolvem antibiose, os microrganismos produzem metabólitos secundários tóxicos principalmente antibióticos, que inibem o crescimento ou a reprodução, levando à morte do patógeno (MIZUBUTI & MAFFIA, 2009), resultando na completa lise da estrutura celular, independente do contato físico entre os microrganismos (BETTIOL & GHINI, 1995). Dessa forma, o crescimento e a germinação de patógenos podem ser suprimidos por antibiose. A capacidade de competir por espaço e nutrientes possibilitam aos antagonistas vantagens quando comparado ao patógeno, pois estes são mais eficientes e rápidos ao

colonizar sítios de infecção, impedindo o estabelecimento do patógeno nas plantas. O micoparasitismo é um processo complexo onde um fungo micoparásita sobrevive à custa do outro, o qual envolve contato físico e liberação de enzimas extracelulares que degradam a parede celular dos fungos patogênicos, tais como: quitinases,  $\beta$ -1,3-glucanases e proteases. Durante este processo o antagonista perfura a parede celular e penetra nas hifas dos fungos fitopatogênicos, absorvendo o conteúdo nutritivo e conseqüentemente provocando a sua morte (HARMAN, 2004; TROIAN et al., 2014). Quando os antagonistas são aplicados de forma preventiva, são capazes de atuarem como indutores de resistência (HARMAN, 2004; SHORESH et al., 2010).

A eficácia do controle biológico de fitopatógenos depende da interação entre o antagonista, o patógeno, a planta e os fatores ambientais. Diversos grupos de microrganismos têm sido selecionados como agentes de biocontrole, incluindo fungos e bactérias. Os fungos *Trichoderma* spp. e as rizobactérias *Bacillus* spp. são altamente promissores no biocontrole de doenças de plantas e destacam-se por apresentar várias vantagens, com diversos mecanismos de ação antagônica contra fitopatógenos (MORANDI & BETTIOL, 2009; HOBLEY et al., 2013; LAILA et al., 2014).

Rizobactérias do gênero *Bacillus* compreende bactérias gram-positivas, aeróbicas ou anaeróbicas facultativas, comumente encontradas no solo e se destacam por apresentar a capacidade de formar endósporos, que são estruturas de resistência capazes de aumentar sua taxa de sobrevivência em condições adversas do ambiente (MAUGHAN et al., 2011). Além de possuírem a capacidade de colonizar e se multiplicarem na rizosfera e/ou rizoplano de plantas cultivadas, onde podem atuar como antagonistas a fitopatógenos (CARRER FILHO et al., 2015).

O antagonismo pode ocorrer pelos diversos mecanismos de ação e produção de metabólitos como a produção de compostos antimicrobianos e enzimas hidrolíticas, que atuam na degradação da parede celular de fungos, os quais contribuem com a supressão direta de diversos patógenos, além do controle proporcionado através da competição por espaço e nutrientes (CAWOY et al., 2011; HAN et al., 2015). Podem promover também crescimento, assim como ativar os mecanismos de resistência das plantas contra a infecção de fitopatógenos (YU et al., 2010; KIPNGENO et al., 2015; TAN et al., 2013).

O gênero *Trichoderma* compreende espécies de fungos de vida livre no solo ou associados a raízes de plantas, que podem ser simbiossiontes oportunistas, bem como parasitas de outros fungos (DRUZHININA et al., 2011). Caracteriza-se por apresentar crescimento rápido e capacidade de ativar mecanismos responsáveis pela competição por nutrientes e antibiose de

organismos fitopatogênicos, através da produção de substâncias antimicrobianas (STEINDORFF et al., 2012; VINALE et al., 2008). São capazes de atuarem como micoparasitas, envolvendo o crescimento e enrolamento de suas hifas na inibição do patógeno e pela produção de enzimas que degradam as paredes celulares (ALMEIDA et al., 2007; REITHNER et al., 2011; STEYAERT et al., 2003). Possuem a capacidade de competir por nutrientes e espaço mais rápidos que os patógenos, impedindo a infecção nas plantas. Algumas espécies de *Trichoderma* podem interagir diretamente com raízes, aumentando potencialmente o seu crescimento, induzindo também a resistência das plantas a doenças e estresse abiótico (HARMAN, 2004; HERMOSA, 2012). Em palma de óleo, *T. harzianum* aumentou o gene de defesa da quitinase contra *Ganoderma boninense* em comparação com a infecção apenas de *G. boninense* (NAHER et al., 2011).

Diversos trabalhos mostraram a ação de compostos produzidos por *Bacillus* spp. e *Trichoderma* spp. de atuarem no controle de doenças em diferentes patossistemas. Silva (2015) selecionou *Bacillus* spp. e *Trichoderma* spp. como potenciais antagonistas *in vitro* quando confrontados com *Thielaviopsis paradoxa* e aplicados preventivamente *in vivo*, no controle da resinose do coqueiro. Venturini et al. (2014) constataram que bactérias do gênero *Bacillus* apresentaram efeitos antagônicos na inibição da germinação de esporos e no crescimento micelial contra *Thielaviopsis paradoxa*, agente etiológico da podridão do abacaxi da cana-de-açúcar Meneghin (2008) observou que bactérias isoladas da rizosfera da cana-de-açúcar foram capazes de controlar de forma significativa o desenvolvimento do fungo *T. paradoxa*, tanto em *in vitro* como em *in vivo* em toletes de cana-de-açúcar.

Wijesinghe et al. (2010) verificaram a atividade antagonista de um isolado de *Trichoderma asperellum* contra o agente etiológico da podridão negra do abacaxi, *Thielaviopsis paradoxa*, reduzindo a severidade da doença em frutos. Além disso, estes mesmos autores observaram que os isolados de *Trichoderma* produziram compostos capazes de inibir o crescimento micelial do patógeno. Sanchez et al. (2007) avaliaram o emprego de *Trichoderma longibrachiarum* no controle de *Thielaviopsis paradoxa*, agente etiológico da podridão em *Agave tequilana*. Os autores obtiveram resultados de controle satisfatórios e constataram a produção de enzimas hidrolíticas pelo fungo antagonista.

### **Indução de Resistência**

A indução de resistência em plantas contra patógenos, tem se mostrado como uma prática promissora no controle de doenças, por meio da ativação de mecanismos de defesa latentes na planta.

O mecanismo de indução das plantas contra patógenos consiste na ativação de defesas vegetais impedindo a entrada e/ou a colonização do patógeno em seus tecidos (AGRIOS, 2005; BERGAMIN et al., 1995). Estes mecanismos estão divididos em barreiras constitutivas, que podem ser físicas ou químicas, pré-formadas, que são representadas por estruturas como ceras, cutícula, parede celular, fenóis, alcaloides fitoalexinas, inibidores protéicos e enzimas hidrolíticas (AGRIOS, 2005; PASCHOLATI & LEITE, 1995). Por outro lado, há mecanismos de defesas que se manifestam somente quando a planta é desafiada por um agressor, que envolvem o reconhecimento do patógeno pelo hospedeiro e a indução de uma série de sinais que resultam em respostas rápidas de defesa, sendo os compostos pós-formados representados papilas, halos, lignificação, fitoalexinas, espécies reativas de oxigênio e proteínas relacionadas à patogênese (Proteínas-PR) (AGRIOS, 2005; PASCHOLATI & LEITE, 1995).

A indução de resistência de plantas pode ser definida como o aumento do nível de resistência, em consequência da ativação de seus genes, após um estímulo apropriado (VAN LOON et al., 1998). A resistência está relacionada a uma série de mudanças metabólicas nas plantas, as quais asseguram maior resistência à doenças e pode ocorrer local ou sistemicamente, que são divididas em resistência sistêmica adquirida (Systemic Acquired Resistance - SAR), ou resistência sistêmica induzida (Induced Systemic Resistance - ISR) (VAN LOON, 1983; VAN LOON et al., 1998).

A SAR pode se desenvolver local ou sistemicamente em resposta ao patógeno ou aplicação de agentes indutores abióticos e a via de sinalização celular ocorre através do ácido salicílico. Por outro lado a ISR, ocorre sistemicamente, pode ser induzida por microrganismos não patogênicos, e as vias de sinalização celular ocorre pelo etileno e jasmonato (VAN LOON, 1983; VAN LOON et al., 1998).

A resistência induzida ou adquirida está relacionada à defesa da planta e pode ocorrer através da ativação de mecanismos latentes de resistência por agentes bióticos ou abióticos (SHORESH, et al., 2010), resultando no aumento de determinadas proteínas nos tecidos vegetais, denominadas proteínas relacionadas à patogênese (PRPs) (VAN LOON et al., 1998). As PRPs constituem-se de um conjunto bem diversificado de moléculas, que se acumulam nos tecidos vegetais em resposta ao ataque de patógenos ou ao tratamento com determinado composto químico (VAN LOON, 1983; VAN LOON et al., 1998). Dentre as PRPs encontram-se as enzimas peroxidase, quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanase, que estão envolvidas na formação de lignina e outros fenóis que contribuem para o desencadeamento de barreiras de defesa, reforçando as estruturas das células das plantas (VAN LOON et al., 1994).

A atividade das peroxidases (POX, EC 1.11.1.7) na defesa celular das plantas está direcionada com a lignina e suberização da parede celular, polimerizando a lignina a partir da oxidação dos compostos fenólicos em presença de peróxido de hidrogênio (HIRAGA et al., 2001). A lignificação e seus precursores tóxicos se depositam na superfície da parede celular, dificultando a invasão por patógenos (HIRAGA et al., 2001). A lignina é uma das substâncias mais importantes da parede celular do vegetal, pois proporciona suporte mecânico e impede a penetração, o crescimento e desenvolvimento de patógenos (CAVALCANTI et al., 2006).

As quitinases (CHI; 3.2.1.14) são proteínas antifúngicas que atuam hidrolisando a quitina, segundo polissacarídeo biológico mais abundante na natureza depois da celulose, que é o principal componente da parede celular dos fungos. A  $\beta$ -1,3-glucanases (GLU; EC 3.1.2.6) localizam-se no apoplasto celular e hidrolisam polímeros de  $\beta$ -1,4 glucana, compostos que também conferem resistência à parede celular dos fungos. Na indução de resistência o incremento destas enzimas relaciona-se com a defesa de plantas, exibindo ação direta sobre o patógeno ou pela ativação dos mecanismos locais ou sistêmicos de resistência, como a produção de fitoalexinas (CUTT & KLESSIG, 1992).

Indutores de resistência são substâncias químicas de natureza diversa capazes de ativar ou induzir respostas de resistência nas plantas, desencadeando respostas bioquímicas responsáveis pela proteção contra o ataque de patógenos (ROMEIRO, 1999; BOLLER & FELIX, 2009). Isso envolve a ativação de mecanismos de defesa latentes, existentes nas plantas, sem qualquer alteração em seu genoma, em resposta ao tratamento com agentes bióticos ou abióticos. Portanto, são capazes de ativar mecanismos de defesa na planta, protegendo-a contra infecções subsequentes por patógenos (ROMEIRO, 1999; BOSTOCK et al., 2014).

Diversos indutores podem ativar defesas vegetais, minimizando a presença de patógenos. Há relatos na literatura de indutores bióticos, como fungos e rizobactérias promotoras de crescimento (CHANDRASEKARAN & CHUN, 2016; Ke LIU et al., 2016; KIM et al., 2015; VINALE et al., 2008); compostos presentes em extratos vegetais (RESENDE et al., 2007; MALO et al., 2017; BONALDO et al., 2004; GARCIA-BRUGGER et al., 2006) e por indutores químicos como o acibenzolar-S metil, análogo do ácido salicílico (MCGRANN et al., 2017; BERTONCELLI et al., 2015; LYON & NEWTON, 2007; GILARDI et al., 2014), ácido salicílico (AS) (BERTONCELLI et al., 2016; EL-MOHAMEDY et al., 2017. CAMPOS, 2009; RODRIGUES & RESENDE, 2010), ácido jasmônico (SHAH et al., 2014; SHERIF et al., 2016) e fosfitos (COSTA et al., 2017; MONTEIRO et al., 2016; ACHARY et al., 2017; GADAGA et al., 2017).

Entre os principais ativadores de resistência, o mais conhecido no mercado é o acibenzolar-S-metil (ASM), análogo funcional do ácido salicílico, comercialmente conhecido como BION (Syngenta Proteção de Cultivos S,A), registrado no Brasil como ativador de plantas, sendo liberado para uso comercial para as culturas do algodão, batata, cacau, feijão, citros, melão e tomate (AGROFIT, 2017). O ASM pode atuar nas plantas ativando genes de defesa que codificam proteínas PR e enzimas relacionadas com a produção de fitoalexinas e lignina (COLE, 1999; RESENDE et al., 2000).

A ativação de resistência de plantas de mangueira por ASM foi observada contra *Ceratocystis fimbriata* (ARAÚJO et al., 2015). O ASM pulverizado sobre plantas de cacauero (*Theobroma cacao* L.) inoculadas com *Verticillium dahliae* (Kleb.) resultou em um aumento de enzimas ligadas à resistência induzida, peroxidase e polifenoloxidase, relacionadas à patogênese e ao acúmulo de lignina em epicótilo de plântulas de cacauero (PEREIRA et al., 2008).

Outros produtos comerciais tais como os fosfitos têm apresentado importância no controle de doenças de plantas. Os fosfitos são fertilizantes foliares oriundo do ácido fosforoso ( $H_3PO_3$ ), sendo rapidamente absorvido pela planta e translocado pelo xilema e, posteriormente, pelo floema (GUEST & SCHENCK, 1985; GUEST & GRANT, 1991).

Existem várias formulações disponíveis de produtos contendo em suas formulações macro e micronutrientes, como K, Ca, B, Zn e Mn. O ácido fosforoso, apresentam efeito direto sobre patógenos e também atua na ativação do sistema de defesa natural das plantas (DUNSTAN et al., 1990; SMILLIE & GRANT; GUEST, 1989), podendo estimular a produção de substâncias de defesa das plantas, como as fitoalexinas, favorecendo a resistência as plantas ao ataque de patógenos (FENN & COFFEY, 1989; SAINDRENAN et al., 1990).

O efeito direto do fosfito no metabolismo de fungos, controle de doença e na ativação do sistema de defesa natural da planta tem sido demonstrado em muitos trabalhos. Caixeta et al. (2012) observaram redução do crescimento micelial de *Colletotrichum lindemuthianum* e esporulação de *Fusarium oxysporum*, agentes etiológico de doenças do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), utilizando concentrações de 125, 250 e 500 ppm de fosfito de potássio. Araújo et al. (2010) relataram 94% de inibição do crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado de macieira, com a concentração de 1500 ppm de fosfito de potássio em meio BDA.

Em trabalho estudando aplicação de produtos contendo fosfitos em mudas de cafeeiro, Nojosa et al. (2009) observaram controle eficaz de *Phoma costarricensis* com aplicações de

produtos contendo fosfitos em mudas de cafeeiro e relataram redução da severidade da mancha de phoma, sem diferir em relação aos fungicidas tebuconazole e fosetyl-Al.

O silício, elemento benéfico, é estudado quanto à capacidade de induzir resistência às plantas. Além dos efeitos de corretivo de solo, nutrição e nos processos fisiológicos das plantas, o silício pode ter papel ativo na resistência das plantas contra patógenos, devido à produção de compostos secundários, como polifenóis, e fitoalexinas, que podem agir como substâncias inibidoras do patógeno e formação de barreiras físicas, impedindo a penetração de fungos pela deposição da lignina (CHÉRIF et al., 1992; CHÉRIF et al., 1994). Guerra et al. (2013), avaliando o efeito do silício sobre a ramulose e os aspectos bioquímicos da resistência do algodoeiro a essa doença, observaram o aumento de compostos fenólicos solúveis totais, bem como à maior atividade das enzimas peroxidase, polifenoxidase, quitinase e glucanase.

### **Nutrição mineral**

Plantas bem nutrida podem sofrer menos danos quando comparadas a plantas com deficiência ou desbalanço nutricional. De modo geral, a importância dos nutrientes para o crescimento e produtividade é explicada em termos de suas funções no metabolismo das plantas, no entanto, a nutrição pode também ter efeitos secundários, induzindo alterações no padrão de crescimento, morfologia e anatomia ou composição química das plantas, que podem aumentar ou diminuir a resistência ou tolerância das plantas a patógenos (MARSCHNER, 1986; HUBER et al., 2012).

O fornecimento de nutrientes altera a resistência das plantas a patógenos, em função de alterar o crescimento e a composição do tecido vegetal, como, por exemplo, de compostos solúveis ou de defesa (MARSCHNER, 1995; HUBER et al., 2012). A resistência pode ser conferida devido a modificações anatômicas, como espessamento das células da epiderme, lignificação, e ainda atuar nas propriedades fisiológicas e bioquímicas, pela produção de compostos secundários, fitoalexinas (ZAMBOLIM & VENTURA, 1993; HUBER et al., 2012; ZAMBOLIM et al., 2012). Dessa forma, a nutrição equilibrada em macro e micronutrientes é um fator importante na resistência de plantas, tornando-se as plantas mais tolerantes às doenças, enquanto que plantas em condições de estresse nutricional são mais suscetíveis (ZAMBOLIM et al., 2012). Vários estudos mostraram a influência dos nutrientes no manejo de doenças das plantas (CATARINO et al., 2016; DOWNER et al., 2013; MOHAMED et al., 2014). O silício, elemento benéfico, é estudado quanto à capacidade de induzir resistência às plantas. Além dos efeitos de nutrição e nos processos fisiológicos das plantas, o silício pode ter papel ativo na resistência das plantas contra patógenos, devido à

produção de compostos secundários, como polifenóis e fitoalexinas, que podem agir como substâncias inibidoras do patógeno (CHÉRIF et al., 1992) e formação de barreiras físicas, impedindo a penetração de fungos pela deposição da lignina (CHÉRIF et al., 1992; CHÉRIF et al., 1994).

Embora sejam escassas as pesquisas acerca da nutrição mineral relacionadas com a resistência de doenças da palma de óleo, existe um vasto potencial de melhorar o estado fitossanitário desta cultura por meio de manejo nutricional equilibrado, pois, segundo Munévar (2004) geralmente, a palma de óleo é cultivada em solos de baixa fertilidade.

Sendo assim, são necessários estudos sobre o potencial de *Bacillus* spp. e *Trichoderma* spp. no controle biológico da podridão basal, e o efeito de indutores comerciais e da nutrição mineral na resistência induzida em palma de óleo.

O conhecimento gerado a partir dessas pesquisas poderá contribuir para o controle alternativo da podridão basal dentro no manejo integrado de doenças da palma de óleo. Deste modo, o presente trabalho teve como hipóteses:

- O agente etiológico da podridão basal em palma de óleo é o fungo *Thielaviopsis ethacetica*;
- A severidade da podridão basal em palma de óleo pode ser atenuada pelos agentes de biocontrole *Bacillus* spp. e *Trichoderma* spp.;
- Os isolados de *Bacillus* spp. e *Trichoderma* spp. utilizados no controle da podridão basal em palma de óleo, induzem diferentes respostas no metabolismo de defesa das plantas e podem reduzir a severidade da podridão basal;
- Indutores de resistência e nutrição mineral equilibrada da palma de óleo podem estimular o crescimento de plantas e a resistência à podridão basal.

### 1.1 Objetivo geral

Estudar a etiologia da podridão basal, bem como, selecionar *Bacillus* spp. e *Trichoderma* spp. no controle biológico, avaliar indutores de resistência e a fertilização foliar no crescimento e na nutrição mineral da palma de óleo com a capacidade de fornecer nutrientes-chave relacionados à resistência a doenças

### 1.2 Objetivos Específicos

- ✓ Avaliar a caracterização morfológica, genética e patogênica de *Thielaviopsis* sp. isolado da palma de óleo;
- ✓ Verificar a eficiência de isolados *Bacillus* spp. e *Trichoderma* spp. no antagonismo de *Thielaviopsis in vitro*;
- ✓ Selecionar isolados *Bacillus* spp. e *Trichoderma* spp. como potenciais agentes de biocontrole *in vivo*;
- ✓ Avaliar a eficiência de isolados *Bacillus* spp. e *Trichoderma* spp. nos mecanismos de defesa contra *Thielaviopsis* em palma de óleo;
- ✓ Avaliar a eficiência de indutores de resistência e da fertilização foliar no crescimento e na nutrição mineral da palma de óleo.

## REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G. N. 5ª ed. San Diego: Elsevier Academic Press. **Plant pathology**, 2004.
- AGROFIT. **Desenvolvido pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Apresenta informações sobre produtos fitossanitários. 2017. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/agrofit>. Acesso em: 15 Jan. de 2017.
- ALMEIDA, F.B., CERQUEIRA, F.M., SILVA, R.N., ULHOA, C.J., LIMA, A.L. Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* strains against *Rhizoctonia solani*: evaluation of coiling and hydrolytic enzyme production. **Biotechnology Letters** v.29, p.1189–1193, 2007.
- ALVAREZ E, LLANO GA, LOKE JB. Characterization of *Thielaviopsis paradoxa* Isolates from Oil Palms in Colombia, Ecuador and Brazil. **Journal of Phytopathology** v.160, p.690-700, 2012.
- ALVINDIA, D.G., KOBAYASHI, T., YAGUCHI, Y. NATSUAKI, K.T. Symptoms and the associated fungi of postharvest diseases on non-chemical bananas imported from the Philippines. **Japanese Journal of Tropical Agriculture**. v.4.,p.87-93, 2000.
- ARAÚJO, L.; SILVA BISPO, W. M.; RIO, V. S.; FERNANDES, S. A., RODRIGUES, F. A. Induction of the Phenylpropanoid Pathway by Acibenzolar-S-Methyl and Potassium Phosphite Increases Mango Resistance to *Ceratocystis fimbriata* Infection. **Plant Disease**, v.99, p.4, 2015.
- ARAÚJO, L.; VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M.; STADNIK, M.J. Avaliação de formulações de fosfito de potássio sobre *Colletotrichum gloeosporioides in vitro* e no controle pós-infeccional da mancha foliar de Glomerella em macieira. **Tropical plant pathology**, v.35, n.1, p.54-59, 2010.
- BECKER, B. K. Recuperação de áreas desflorestadas da Amazônia: será pertinente o cultivo da palma de óleo (Dendê)? CONFINS: **Revista Franco-Brasileira de Geografia**. 10, 2010. Disponível em: <http://confins.revues.org/6609> . Acesso em: 11 maio. 2016.
- BERGAMIN F.; KIMATI, H.; AMORIM, L. Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos. São Paulo: Agronômica Ceres. 3ªed. p.919, 1995.
- BERTONCELLI, D.J.; MAZARO, S. M.; SERRÃO ROCH, R. C. D.; DALACOSTA, N. L.; ADRIANO LEWANDOWSKI, A.; WAGNER JUNIOR, A. Salicylic acid in the induction of resistance to beet seedling damping-off and antifungal activity against *Fusarium* sp., *in vitro*. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 37, n.1, p. 67-76, 2016.
- BERTONCELLI, D. J.; MAZARO, S. M.; ROCHA, R. C.D.S.; POSSENTI, J. C. ; JÚNIOR, A. V. Acibenzolar-S-methyl for induction of resistance in tomato and *Rhizoctonia solani* kuhn control *in vitro*. **Applied Research & Agrotechnology**, v.8, n.2. 2015.
- BETTIOL, W. GHINI, R. Controle biológico. In: BERGAMIN, A. F.; KIMATI, H.; AMORIN, L. (Ed.). **Manual de Fitopatologia: Princípios e conceitos**. 3 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, p.717- 728, 1995.

BOARI, A. de J.; TREMACOLDI, C. R. Podridão do estipe causada por *Thielaviopsis paradoxa* em palma de óleo no Estado do Pará. **Tropical Plant pathology**. Brasília, DF, v. 37, (Suplemento), 2012.

BOLLER T., FELIX G. A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. **Annual Review of Plant Biology**, v.60, p.379-406, 2009.

BONALDO, S. M. et al. Fungitoxicidade, atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de pepino contra *Colletotrichum lagenarium*, pelo extrato aquoso de *Eucalyptus citriodora*. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, p.128-134, 2004.

BOSTOCK, R. M.; PYE, M. F.; ROUBTSOVA, T. V. Predisposition in plant disease: Exploiting the nexus in abiotic and biotic stress perception and response. **Annual Review of Phytopathology**, v.52, n.1, p. 23-33, 2014.

BUITRAGO VM, NIETO LE. Hongos asociados con pudriciones de flecha y cogollo en palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.) em los Llanos Orientales. **Revista Palmas** (Colombia) v,16, p.9-17, 1995.

CAIXETA, A.O.; VIEIRA, B.S.; CANEDO, E.J. Efeito do fosfito de potássio sobre fungos fitopatogênicos do feijoeiro. **Cerrado Agrociências**. Patos de Minas, v.3, p.35-43, 2012.

CAMPOS A D. Considerações sobre indução de resistência a patógenos em plantas. Brasília: Embrapa. 28: 2009.

CARVALHO, E. A.; SANTOS, T.P.F. **Doenças da palma de óleo no contexto da expansão do cultivo no Estado do Pará**. Documentos/Embrapa Amazônia Oriental. Doc 389, 19, 2013.

CARVALHO, E. A.; COELHO, I. L.; TREMACOLDI, C. R.; GOMES JÚNIOR, R. A. Fungos associados ao híbrido interespecífico da palma de óleo no Estado do Pará. **Tropical Plant Pathology**, v.36, p.908 (Suplemento), 2011.

CARRER FILHO, R. C.; DIANESE, E. C.; CUNHA, M. G. Supressão da murcha de fusário em tomateiro por rizobactérias do gênero *Bacillus*. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.45, n.3, p.356-363, 2015.

CATARINO, A. D. M.; POZZA, E. A.; POZZA, A. A. A.; VASCO, G. B.; SOUZA, P. E. D. Calcium and potassium contents in nutrient solution on Phoma leaf spot intensity in coffee seedlings. **Revista Ceres**, v.63, n.4, p.486-491, 2016.

CAVALCANTI, L. S.; BRUNELLI, K. R.; STANGARLIN, J. R. Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência induzida. In: CAVALCANTI, L. S. et al. **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**, p.81-124, 2005.

CAWOY, H.; BETTIOL, W.; FICKERS, P.; ONGENA, M. *Bacillus*-based biological control of plant diseases. In: STOYTICHEVA, M. (Ed. **Pesticides in the modern world pesticides use and management**, v.13, p.273-302, 2011.

CHANDRASEKARAN, M., & CHUN, S.C. Induction of defense-related enzymes in tomato (*Solanum lycopersicum*) plants treated with *Bacillus subtilis* CBR05 against *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Biocontrol Science and technology*, 2016.

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

CHÁVEZ. M. F. **Enfermedades de la palma africana en Ecuador y su combate**. INIAP. Quito, v. 8, p.19, 1986.

CHÉRIF, M., ASSELIN, A. E. BÉLANGER, R.R. Defense responses induced by soluble silicon in cucumber roots infected by *Pythium* spp. **Phytopathology**, v.84, p.236-242, 1994.

CHÉRIF, M., BENHAMOU, N., MENZIES, J.G. E BÉLANGER, R.R. Silicon induced resistance in cucumber plants against *Pythium ultimum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.41, p.411-425, 1992.

CHIA, G. S.; LOPES, R.; CUNHA, R. N. V. ROCHA, R. N. C. da.; LOPES, M T. G. Repetibilidade da produção de cachos de híbridos interespecíficos entre o caiaué e o dendezeiro. **Revista Acta Amazônica**, v.39, n.2, p. 249-254, 2009.

COLE, D.L. The efficacy of acibenzolar-S-methyl, an inducer of systemic acquired resistance, against bacterial and fungal disease of tobacco. **Crop Protection**, v.18, p.267-273. 1999.

CORLEY, R. H. V; TINKER, P. B. H. **The oil palm**. **Blackwell Science**. Ltd. 4<sup>a</sup> ed. Oxford. 2003.

COSTA, B. H. G.; RESENDE, M.L.V.; MONTEIRO, A.C.A.; RIBEIRO JÚNIOR, P. M.; BOTELHO, D.M. S.; SILVA, B; M. Potassium phosphites in the protection of common bean plants against anthracnose and biochemical defence responses. **Journal of Phytopathology** .v.166, p.95–102, 2017.

CUTT, J, R.; KLESSIG, D. F. Pathogenesis-related proteins. In: BOLLER, T.; MEINS, F. JR. **Plant Gene Research**, p;181-216, 1992.

DALIO, R. J. D. et al. O triplo modo de ação dos fosfitos em plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.20, p.206-243, 2012.

DE BEER ZW, DUONG TA, BARNES I, Wingfield BD, Wingfield MJ, Redefining *Ceratocystis* and allied genera. **Studies in Mycology**, v.79. p.187–219, 2014.

DOWNER A.J; HODEL D.R; MATTHEWS D.M; PITTENGER D.R. Effect of fertilizer nitrogen source on susceptibility of five species of field grown palms to *Fusarium oxysporum* f. sp. *canariensis*. **Palms**, v.57, p.89-92, 2013.

DUBEY, S. C.; SINGH, V.; PRIYANKA, K.; UPADHYAY, B. K.; SINGH, B. Combined application of fungal and bacterial bio-agents, together with fungicide and Mesorhizobium for

integrated management of Fusarium wilt of chickpea. **Biological Control**. v.60, n.3, p. 413-424, 2015.

DUNSTAN, R. H.; SMILLIE, R. H.; GRANT, B. R. The effects of sub-toxic levels of phosphonate on the metabolism and potential virulence factors of *Phytophthora palmivora*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.36, p.205-220, 1990.

DRUZHININA, I.S.; SEIDL-SEIBOTH, V.; HERRERA-ESTRELLA A.; HORWITZ B.A.; KENERLEY, C.M.; MONTE, E.; MUKHERJEE, P.K.; ZEILINGER, S.; GRIGORIEV, I.V.; KUBICEK, C.P. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. **Nature Reviews Microbiology**. v.9, n.10, p.749–759,2011.

EZIASHI, E.I.; UMA, N.U.; ADEKUNLE, A.A.;AIREDE, C.E. Effect of metabolites produced by *Trichoderma* species against *Ceratocystis paradoxa* in culture médium. **African Journal of Biotechnology**, v.5, n.9, p.703-706, 2006.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Estatísticas da produção mundial 2014. Disponível em: < [http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/browse/Q/\\*S](http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/browse/Q/*S)>. Acesso em: 11 de fevereiro de 2017.

FENN, M. E E COFFEY, M. D. Studies on the *in vitro* antifungal activity of fosethyl-al and phosphorous acid. **Phytopathology**, v.74, p.606-611, 1984

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

FERREIRA, C. B. B. et al. Diversidade genética molecular de progênes de dendezeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.47, p.378-384, 2012.

CARRER FILHO, R. C.; DIANESE, E. C.; CUNHA, M. G. Supressão da murcha de fusário em tomateiro por rizobactérias do gênero *Bacillus*. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.45, n.3, p.356-363, 2015.

GARCIA-BRUGGER, A., LAMOTTE, O., VANDELLE, E. Early signalling events induced by elicitors of plant defenses. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.9 n.7. p.711–724, 2006.

GUEST, D. I E GRANT, B. R. The complex action of phosphonates as antifungal agents. **Biological Review**, v.66.p.159-187, 1991.

GUEST, D. J.; UPTON, J. C. R.; ROWAN, K. S. Fosethyl-al alters the respiratory response in *Phytophthora nicotianae* var. *nicotianae* infected tobacco. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.34, p.257-265, 1989.

GILARDI, G., DEMARCHI, S., GULLINO, M.L., GARIBALDI, A. Managing *Phytophthora* crown and root rot of tomato by pre-plant treatments with biocontrol agents, resistance inducers, organic and mineral fertilize under nursery conditions. **Phytopathologia Mediterranea**. v.53, p.313-323. 2014.

- GUERRA, A. M. N. M. et al. Aspectos bioquímicos da resistência do algodoeiro à ramulose potencializada pelo silício. **Bragantia**, v.72, n.3, p.292-303, 2013.
- HAN, J. H.; SHIM, H.; SHIN, J. H.; KIM, K. S. Antagonistic activities of *Bacillus* spp. strains isolated from tidal flat sediment towards anthracnose pathogens *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* in South Korea. **The plant pathology journal**, v.31, n.2, p.165, 2015.
- HARMAN, G. E.; HOWELL, C. R.; VITERBO, A.; CHET, I.; LORITO, M. *Trichoderma* species - Opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews Microbiology**, v.2, n.1, p.43-56, 2004.
- HERMOSA, R., VITERBO, A., ILAN CHET, I., MONTE, E. Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. **Microbiology**, v.158, p.17–25, 2012.
- HIRAGA, S. et al. A large family of class III plant peroxidases. **Plant and Cell Physiology**, v.42, n.5, p.462-468, 2001.
- HOBLEY, L., OSTROWSKI, A., RAO, F.V., BROMLEY, K.M., PORTER, M., PRESCOTT, A.R., MACPHEE, C.E., VAN AALTEN, D.M., STANLEY-WALL, N.R., BslA is a self-assembling bacterial hydrophobin that coats the *Bacillus subtilis* biofilm. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.110, p.13600-13605, 2013.
- HÖHNEL FXR. Zur kenntniss einige fadenpilze. *Hedwigia*. v.43, p.295-299, 1904.
- HOMMA, A. Agroenergia: a entrada de um novo ciclo na Amazônia. In: GOMES JUNIOR, R. A. (Ed.). Bases técnicas para a cultura da palma de óleo integrado na unidade produtiva da agricultura familiar. **Embrapa Amazônia Oriental**, p.3-5, 2010.
- HUBER, D.; RÖMHELD, V.; WEINMANN, M. Relationship between nutrition, plant diseases and pests. In: Marschner P (Eds.). Marschner's mineral nutrition of higher plants. Third edition. New York: Academic Press (Elsevier), 2012.
- IBGE**- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo Agropecuário. Pesquisa Agrícola. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria>. Acesso em 12 Fev 2016.
- YOU, J.; ZHANG, J.; WU, M.; YANG, L.; CHEN, W.; LI, G. Multiple criteria-based screening of *Trichoderma* isolates for biological control of *Botrytis cinerea* on tomato. **Biological Control**, v.101, p.31-38, 2016.
- KIM, J.I.; LEE1, J.L.; LEE, C.H.; WOO,S.Y.; KANG, H.; SEO. S.G.; KIM, S.H. Activation of Pathogenesis-related Genes by the Rhizobacterium, *Bacillus* sp. JS, Which Induces Systemic Resistance in Tobacco Plants. **Plant Pathology**. v.31, n;2, p.195-201, 2015.

KE LIU,G.; C., FADAMIRO; H., J. W. KLOEPPER. Induction of systemic resistance in Chinese cabbage against black rot by plant growth-promoting rhizobacteria. **Biological Control**. v99, p.8-13, 2016.

KIPNGENO, P.; LOSENGE, T.; MAINA, N.; KAHANGI, E.; JUMA, P. Efficacy of *Bacillus subtilis* and *Trichoderma asperellum* against *Pythium aphanidermatum* in tomatoes. **Biological Control**, v.90, p.92-95, 2015.

LAILA, N., KALSOM, Y.U., AHMAD, I. *Trichoderma* spp.: a biocontrol agent for sustainable management of plant diseases. **Pakistan Journal of Botany**. v.46, n.4, p.1489–1493, 2014.

LEVERMAN, R. A.; SOUZA, J. P. M. Óleo de palma: o crescimento da indústria global. **Agroanalysis**, v.34, n.2, p.1-34, 2014.

LYON, G.D., NEWTON, A.C., Do resistance elicitors offer new opportunities in integrated disease control strategies? **Plant Pathology**, v.46, p.636–641, 2007.

MALO. I.; BASTIANI, M.; AREVALO, P.; BERNACCHIA, G. Natural extracts from pepper, wild rue and clove can activate defenses against pathogens in tomato plants. **Europa Journal Plant Pathology**. P.17-168, 2017.

MAPA. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. O Setor Produtivo da Fruticultura. 2017. Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 03 Jna. 2017.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. London: Academic Press: 674, 1986.

MARSCHNER, H. **Mineral Nutrition of Higher Plants**. 2nd Edition. London: Academic Press, 1995.

MAUGHAN, H.; GERALDINE, V.A. *Bacillus* taxonomy in the genomic era finds phenotypes to be essential though often misleading. *Infection, Genetics and Evolution*, v.11, p.789-797, 2011.

MBENOUN M, DE BEER ZW, WINGFIELD MJ. Reconsidering species boundaries in the *Ceratocystis paradoxa* complex, including a new species from oil palm and cacao in Cameroon. **Mycologia** v.106, p.757–784, 2014.

MENEGHIN, S. P. Efeito da aplicação de fitorreguladores em rizobactérias isoladas de diferentes variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.), no município de Araras-SP. **Tese (Doutorado em Ciências Biológicas)**, 110f. , Universidade Estadual Paulista, 2008.

MORANDI, M.A. B.; BETTIO, W.G. Controle biológico de doenças de plantas. In. Bettiol W & Morandi MAB (Eds). **Biocontrole de doenças de plantas: usos e perspectivas**. Jaguariúna, p.7-14, 2009.

SILVA, J.C. Controle biológico da resinose do coqueiro. **Tese (Doutorado em proteção de plantas)**, 92f. Universidade Federal de Alagoas, 2015.

MCGRANN, G.R.D., YOXALL, T., PATERSON, L.J. Control of light leaf spot and clubroot in brassica crops using defence elicitors. **European Journal of Plant Pathology** v.148, p.447, 2017.

MIZUBUTI, E. S. G.; MAFFIA, L. A. **Introdução à Fitopatologia**. Viçosa: UFV, 190, 2009.

MOHAMED MH, GADO EAM, EL-DEEB SH E MOSTAFA MH. Effect of nitrate levels as a fertilizer or as a fungal nutrition on the aggressiveness of *Rhizoctonia solani* on faba bean. **European Journal of Advanced Research in Biological and Life Sciences**, v.2, n.1, p.13, 2014.

MONTEIRO, A. C. A. Indutores de resistência no manejo da ferrugem e cercosporiose do cafeeiro (*Coffea arabica*) : análises bioquímicas e moleculares – Lavras : UFLA, p.132, 2014.

MORADI, H. et al. Suppression of chickpea (*Cicer arietinum* L.) *Fusarium* wilt by *Bacillus subtilis* and *Trichoderma harzianum*. **Plant Omics Journal**, v.5, n.2, p. 68-74, 2012.

MOURA. J.I.L.; OLIVEIRA,L.; LUZ, E. D. M. N.; SILVA, S.D.V.M.; SANTOS, R.S. Weel associated to Gummosis in oil palm (*Eleaes guineensis* Jacq) in Brazil. **Revista de Agricultura**, v.88, p.87 – 89, 2013.

MUNÉVAR, F. Relación entre la nutrición y las enfermedades de las plantas. **Palmas**, v.25, p.171-178, 2004.

MUNIRAN, F; BHORE, S. J; SHAH, F. H. Micropropagation of *Elaeis guineensis* Jacq. “Dura”: Comparison Of Three Basal Media For Efficient Regeneration. **Indian Journal of Experimental Biology**, v.46, p.79-82, 2008.

NAHER. L., C.L. HO, S.G. TAN, U.K. YUSUF; F. ABDULLAH. Cloning transcripts encoding chitinases from *Elaeis guineensis* Jacq. and their expression profiles in response to fungal infections. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.76, p.96-103, 2011.

NIETO, L.E. Incidencia de pudriciones de estípites de la palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq) en Colombia. **Palmas**. v.16, p.227-232, 1995.

NOJOSA, G. B. A.; RESENDE, M. L. V.; BARGUIL, B. M.; MORAES, S. R. G.; VILAS BOAS, C. H. Effect of resistance inducers on coffee against Phoma leaf spot. **Summa Phytopathologica**, v.35. n.1, p.60-62, 2009.

OBIDZINSKI, K., R. ANDRIANI, H. KOMARUDIN, AND A. ANDRIANTO. Environmental and social impacts of oil palm plantations and their implications for biofuel production in Indonesia. **Ecology and Society**, v.17, p.1-25, 2012.

PEREIRA, R. B.; RESENDE, M. L. V.; JÚNIOR, P. M. R.; DANIEL RUFINO AMARAL, D. R. A.; LUCAS, G. C.; CAVALCANTI, F. R. Ativação de defesa em cacaueteiro contra a murcha-de-verticílio por extratos naturais e acibenzolar-S-metil . **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, n.2, p. 171-178, 2008.

PANDOLFO, C. A. **A cultura do dendê na Amazônia**. Belém: SUDAM, p.35, 1981.

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A. et al. (Ed.). **Manual de Fitopatologia** - Princípios e conceitos. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, p. 417-454, 1995.

POZZA E.A; POZZA A.A.A A nutrição mineral no controle de doenças de plantas. In: VENZON M, PAULA JÚNIOR TJ E PALLINI A (Eds.) Tecnologias alternativas para o controle de pragas e doenças. Viçosa, EPAMIG, p.49-80,2006.

RAMALHO FILHO, A. **Zoneamento agroecológico, produção e manejo da cultura de palma de óleo na Amazônia**. Embrapa solos, 2010.

RESENDE, M. L. V.; COSTA, J. C. B.; CAVALCANTI, F. R.; RIBEIRO JÚNIOR, P. M.; CAMILO, F.R. Seleção de extratos vegetais para indução de resistência e ativação de respostas de defesa em cacaueteiro contra a vassoura-de-bruxa. **Fitopatologia Brasileira** v.32, n.3, p.213-221. 2007.

REITHNER, B.; IBARRA-LACLETTE, E.; MACH, R.L.; HERRERA-ESTRELLA, A. Identification of mycoparasitism-related genes in *Trichoderma atroviride*. **Applied Environmental Microbiology**. v.77, p.4361–4370, 2011.

ROBERTSON, J. S. Dry basal rot, a new disease of oil palms caused by *Ceratocystis paradoxa* (Dade) Moreau. **Transactions of the British Mycological Society**. v.45: p.475-478, 1962.

RODRIGUES, A. F.; RESENDE, R. S. Silício na potencialização da resistência de plantas a patógenos. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA A PATÓGENOS, 5. Lavras. **Anais.**, p.171-180, 2010.

ROMEIRO, R.S. Indução de Resistência em plantas a patógenos. Viçosa, UFV. Cadernos didáticos, p.56,1999.

SAINDRENAN, P.; BARCHIETTO, T.; BOMPEIX, G. Effects of phosphonate on the elicitor activity of culture filtrates of *Pytophthora cryptogea* in *Vigna unguiculate*. **Plant Science**, v.76, p.245-251, 1990.

SANCHEZ, V.; REBOLLEDO, O.; PICASO, R. M.; CARDENAS, E.; CORDOVA, J. GONZALES, O.; SAMUELS, G. J. *In vitro* antagonism of *Thielaviopsis paradoxa* by *Trichoderma longibrachiatum*. **Mycopathologia**, v.163, p.49-58, 2007.

SANTOS, E. A. Caracterização de dendezeiros subespontâneos com base na produção de frutos e cachos. **Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal)** Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 74f, 2010.

SILVA, J.C. Controle biológico da resinose do coqueiro. **Tese (Doutorado em proteção de plantas)**, 92f. Universidade Federal de Alagoas, 2015.

SHAH, J. AND ZEIER, J. Long-distance communication and signal amplification in systemic acquired resistance.. **Plant Science**. v.4, p.30, 2013.

SHERIF, S. M; SHUKLA, M. R; MURCH, S. J.; BERNIER L; SAXENA, P. K. Simultaneous induction of jasmonic acid and disease-responsive genes signifies tolerance of American elm to Dutch elm disease. **scientific reports**. v.6, p.21934, 2016.

SHORESH, M., YEDIDIA, I., CHET, I., Involvement of jasmonic acid/ethylene signaling pathway in the systemic resistance induced in cucumber by *Trichoderma asperellum*T203. **Phytopathology**, v.95, p.76-84, 2005.

SHORESH, M.; HARMAN, G. E.; MASTOURI, F. Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agentes. **Annual Review Phytopathology**, v.48: p.21-43, 2010.

SMILLE, R.; GRANT, B. R.; GUEST, D. The mode of action of phosphite: Evidence for both direct and indirect modes of action on three *Phytophthora* spp. in plants. **Phytopathology**, v.79, p.921- 926, 1989.

STEYAERT, J. M; H.J. RIDGWAY, Y. ELAD; A. STEWART. Genetic basis of mycoparasitism: A mechanism of biological control by species of *Trichoderma*. **Journal of Crop and Horticultural Science**, v.31, p.281-291, 2003.

STEINDORFF, A.S.; SILVA, R.N.; COELHO, A.S.G.; NORONHA, E. F.; ULHOA C.J. *Trichoderma harzianum* expressed sequence tags for identification of genes with putative roles in mycoparasitism against *F. solani*. **Biological Control**. v.61, n.2, p.134–140, 2012.

OOI, S. C; SILVA, E. B; MÜLLER, A. A; NASCIMENTO, J. C. Oil palm genetic resources: native *E. oleifera* populations in Brazil offer promising sources. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.16, n.3, p.385-395, 1981.

TAN, S; YANG, C.; MEI,X.; SHEN, S.; RAZA, W.; SHEN, Q.; XU, Y. The effect of organic acids from tomato root exudates on rhizosphere colonization of *Bacillus amyloliquefaciens* T-5. **Applied Soil Ecology**, v.64, n.1,15-22, 2013.

TOVAR, J. Y L. NIETO. Caracterización de las principales pudriciones de estúpide de la palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq), en la Zona Norte de Colombia. **Palmas**, v.19, n.2, 45-52, 1998.

TROIAN, R.F., STEINDORFF, A.S., RAMADA, M.H.S., ARRUDA, W., ULHOA, C.J., Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* against *Sclerotinia sclerotiorum*: evaluation of antagonism and expression of cell wall-degrading enzymes genes. **Biotechnology Letters**, v.36, n.10, p.2095-2101, 2014

VENTURIERI, A. et al. **Relação entre Ocorrência do Amarelecimento Fatal do Dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) e Variáveis Ambientais no Estado do Pará**. In: Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto, Anais XIV, v.25, n.30, 523-530, 2009.

VENTURINI, G.; BRANDI, F.; BETTIOL, W. **Inibição do crescimento micelial e da germinação de esporos de *Thielaviopsis paradoxa* por *Bacillus subtilis* e *Bacillus pumilus***. Congresso interinstitucional de iniciação científica, Campinas, 2014

- VINALE, F.; SIVASITHAMPARAM, K.; GHISALBERTI, E.L.; MARRA, R.; WOO, S.L.; LORITO, M. *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. *Soil Biol. Biochem.* v.40, p.1-10, 2008.
- VAN LOON, L.C., BAKKER, P.A.H.M. & PIETERSE, C.M.J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual Review Phytopathology**, v.36, p.453-483, 1998
- VAN LOON, L. C.; PIERPOINT, W. S.; BOLLER, T.; CONEJERO, V. Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. **Plant molecular biology reporter**. n. 3, v. 12, P. 245-264, 1994.
- VAN LOON, L.C.; VAN STRIEN, E.A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 55, p. 85-97, 1999.
- VINALE, F., SIVASITHAMPARAM, K., GHISALBERTI, E.L., MARRA, R., WOO, S.I., LORITO, M., *Trichoderma* plant pathogen interaction. **Soil Biology. Biochemistry.** v.40, p.1-10. 2008.
- WARWICK, D. R. N.; FERREIRA, J. M. S.; PASSOS, E. E. M. Ocorrência de resinose do estipe do coqueiro em Sergipe provocada por *Chalara paradoxa*. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, p.171 (suplemento), 2004.
- WIJESINGHE, C. J.; WIJERATNAM, R. W.; SAMARASEKARA, J. K. R. R.; WIJESUNDERA, R. L. C. Biological control of *Thielaviopsis paradoxa* on pineapple by an isolate of *Trichoderma asperellum*. **Biological Control**, v.53, n.3, p.285-290, 2010.
- WENT, FAFC. De ananasziekte van het suikerriet. Mededeelingen van het Proefstation **West-Java**, v.5, p.1-8, 1893.
- YU, X.; AI, C.; XIN, L.; ZHOU, G. The siderophore-producing bacterium, *Bacillus subtilis* CAS15, has a biocontrol effect on Fusarium wilt and promotes the growth of pepper. **European Journal of Soil Biology**, p.1-8, 2010.
- ZAMBOLIM, L.; VENTURA, J. A. **Resistência a doenças induzidas pela nutrição mineral das plantas**. In: Revisão Anual de Patologia de Plantas. Passo Fundo: Editor W. C. Luz, v.1, p.275-318, 1993.
- ZAMBOLIM, L.; VENTURA, J.A.; JÚNIOR, L.A.Z. **Efeito da nutrição mineral no controle de doenças de plantas**. Viçosa - MG: Suprema Gráfica e Editora, v.321, 2012.
- ZALILA-KOLSI; I., MAHMOUD; A. B., ALI, H.; SELLAMI, S.; NASFI, Z.; TOUNSI, S.; JAMOSSI, K. Antagonist effects of *Bacillus* spp. strains against *Fusarium graminearum* for protection of durum wheat (*Triticum turgidum* L. subsp. durum). *Microbiological research*, v.192, p.148-158, 2016.

## 2. A ETIOLOGIA DA PODRIDÃO BASAL DO ESTIPE DA PALMA DE ÓLEO

### RESUMO

A podridão basal do estipe é uma importante doença da palma de óleo e pode causar sérios prejuízos devido a sua severidade e a rápida dispersão do agente etiológico. O trabalho teve como objetivo estudar a etiologia da doença podridão basal em palma de óleo. O isolado de *Thielaviopsis* sp. foi obtido do estipe de plantas de palma de óleo, com aparentes sintomas de podridão. A patogenicidade foi avaliada em duas cultivares de palma de óleo, o híbrido interespecífico Manicoré e o híbrido intraespecífico Tenera. As mudas foram inoculadas por suspensão de conídios na concentração de  $1 \times 10^7$  ou discos de micélios, com e sem ferimentos na ráquis de folhas. O isolado foi cultivado em meio de cultura BDA para a caracterização morfológica. A análise filogenética foi realizada com base em comparação de sequências das regiões EF-1 $\alpha$  e ITS com sequências disponíveis no GenBank-NCBI e analisadas no Mega 6.0. O isolado foi patogênico nas duas cultivares da palma de óleo em mudas previamente feridas, causando sintomas de podridão de coloração marrom, com formação de um halo amarelado na ráquis, com o progresso da doença, as folhas apresentavam coloração amarelo progredindo para seca até a quebra da ráquis. O isolado de *Thielaviopsis* sp. apresentou crescimento rápido com índice de velocidade de crescimento micelial de 50,76 mm dia<sup>-1</sup> e com dois dias ocupou totalmente a placa de Petri de 90 mm. A colônia, de coloração inicialmente branca, tornou-se negra com a esporulação e produção de dois tipos de conídios: os endoconídios e aleuroconídios. Após as análises filogenéticas, foi possível comprovar a espécie *Thielaviopsis ethacetica* como agente etiológico da Podridão Basal da palma de óleo, distinguindo-a da espécie *T. paradoxa*.

**Palavras-chave:** *Thielaviopsis ethacetica*. Filogenia. *Elaeis* spp.

## ABSTRACT

Basal stem rot is an important oil palm disease and can cause serious damage due to its severity and the rapid spread of *Thielaviopsis paradoxa*. The objective of this work was to study the etiology of basal rot disease in oil palm. The isolate was obtained from symptomatic palm oil plants. The pathogenicity was evaluated in two oil palm cultivars, HIE Manicoré and Tenera, in which seedlings were inoculated by suspension of conidia in the concentration of  $1 \times 10^7$  and disks of mycelia with wound and without injury in leaf rachis. The morphological and cultural characterization of the isolate was carried out in BDA culture medium. Phylogenetic analysis was performed based on comparison of sequences of the gene encoding the EF-1 $\alpha$  and ITS elongation factor with sequences from the *Thielaviopsis ethacetica* species complex available from GenBank-NCBI. The isolate was pathogenic in the two oil palm cultivars in previously injured seedlings, causing symptoms of brown rot with a yellowish halo formation in the rachis, with the progress of the disease, the leaves showed yellow coloration progressing to dry until the break. The isolate of *Thielaviopsis* sp. Presented rapid growth, with two occupied the petri dish of 90 mm, the IVCm was 50.76 mm day<sup>-1</sup>. The colony, initially white, became black with sporulation and produced two types of conidia: the endoconides and aleuroconidia. After the phylogenetic analyzes, it was possible to prove the species *T.ethacetica* as the etiological agent of the Basal Rot of the oil palm, distinguishing it from *T. paradoxa*.

Key words: *Thielaviopsis paradoxa*. *Thielaviopsis ethacetica*. Phylogeny. *Elaeis* spp.

## 2.1 INTRODUÇÃO

A palma de óleo é considerada uma das oleaginosas mais promissoras para o agronegócio em âmbito global (CORLEY & TINKER, 2008; SHEIL et al., 2009). A Indonésia e a Malásia são os principais produtores, compreendendo 85% de toda produção mundial (MURPHY, 2014; OBIDZINSKI et al., 2012). O Brasil apresenta enorme capacidade produtiva, com disponibilidade de áreas para expansão dos cultivos, notadamente na região amazônica (CHIA et al., 2009; HOMMA, 2010). O Estado do Pará é o maior produtor, responsável por 83% da produção nacional (FAPESPA, 2015).

No entanto, a cultura é acometida por diversos problemas fitossanitários que podem refletir na produtividade e no aumento dos custos de produção (CARVALHO & SANTOS, 2013). Dentre os fitopatógenos, principalmente de origem fúngica, destaca-se o fungo *Thielaviopsis paradoxa*, agente etiológico da podridão basal da palma de óleo (ALVAREZ et al., 2012; ROBERTSON, 1962).

*Thielaviopsis paradoxa* é considerado um patógeno agressivo e de difícil controle, oportunista, que infecta monocotiledôneas, sobrevive no solo por longos períodos e em restos de culturas em decomposição, sendo associado às doenças de plantas com algum tipo estresse como déficit hídrico e deficiência nutricional (ALVAREZ et al. 2012; NIETO, 1995; TOVAR & NIETO, 1998). Pode ser dispersado pela chuva, vento, insetos ou por ferimento e ferramentas usadas na colheita, tratamentos culturais ou erradicação de plantas doentes (ALVAREZ et al., 2012; TOVAR & NIETO, 1998). *Thielaviopsis paradoxa* é a fase assexual do patógeno, sendo responsável pela produção de dois tipos de conídios, os endoconídios e os clamidósporos. Em sua fase sexual é denominado de *Ceratocystis paradoxa* (Dade) C Moreau (ALVAREZ et al., 2012; TOVAR & NIETO, 1998).

A podridão basal do estipe constitui risco adicional à palma de óleo e pode causar sérios prejuízos devido a sua severidade e a rápida disseminação. As áreas susceptíveis à ocorrência da podridão basal apresentam comprometimento da produção, em função do apodrecimento dos tecidos, amarelecimento dos folíolos do pecíolo, secamento e quebra das folhas reduzindo, conseqüentemente a sustentação dos cachos provocando queda de frutos imaturos (KILE, 1993).

A doença encontra-se distribuída em grande parte das principais regiões produtoras do Brasil e do mundo, sendo relatadas perdas econômicas em diversos países. Na Nigéria, causou sérios danos ao plantio, devido à podridão na base do estipe e morte de plantas (ROBERTSON, 1962). No Equador, provocou grandes danos à produção (CHAVEZ, 1986). Na Colômbia causou graves danos aos plantios de palma de óleo, com perdas de até 70% das

plantações (TOVAR & NIETO, 1998). No Brasil, já foi relatado à ocorrência da doença nos estados do Pará (BOARI et al., 2012; CARVALHO et al., 2011) e na Bahia (MOURA et al., 2013). Além da palma de óleo, o patógeno apresenta ampla gama de hospedeiros, incluindo espécies de importância econômica, como na cultura do coqueiro (WARWICK et al., 2004), bananeira (ALVINDIA et al., 2000), abacaxizeiro (FERRARI, 2009) e cana-de-açúcar (CHAPOLA, 2010).

Entretanto, a partir de estudos de isolados da palma de óleo, cacau e abacaxi através de sequência do DNA, análises morfológicas e filogenéticas do complexo *Ceratocystis paradoxa*, uma redefinição taxonômica, onde o agente etiológico responsável da podridão basal, e de várias doenças em ampla gama de hospedeiro foi denominado de *Thielaviopsis ethacetica* na fase anamórfica e *Ceratocystis ethacetica* compreende a fase teleomórfica (MBENOUN et al. 2014; DE BEER et al., 2014).

O fungo *Ceratocystis ethacetica* foi relatado pela primeira vez em 1924 (DADE, 1928) *Ceratocystis ethacetica* Went. foi originalmente descrito em Java, como agente etiológico da podridão do abacaxi da cana de açúcar (WENT, 1983). Sendo posteriormente reavaliado e descrito como sinônimo de *Thielaviopsis paradoxa* (De Seynes) Höhn, baseado na similaridade morfológica entre os dois fungos (HOHNEL, 1904).

Segundo Mbenoun et al. (2014), *C. ethacetica* e *C. paradoxa*, são patógenos diferentes que apresentam morfologias semelhantes. Entre tanto, conforme os autores há uma grande diversidade genética do gênero *Ceratocystis*, de modo que as espécies apresentam similaridade morfológica e são filogeneticamente diferentes. Estudos envolvendo a interação entre os fungos *C. ethacetica* ou *C. paradoxa* e palma de óleo, são ainda escassos no Brasil, sendo assim, a identificação correta do patógeno prevalecente nos plantios de palma de óleo e o esclarecimento baseado nos teste de patogenicidade e métodos de inoculações, são importantes na identificação da sintomatologia e caracterização das relações patógeno-hospedeiro. O conhecimento aprofundado sobre a etiologia é fundamental para a identificação de potenciais fontes de resistência, uma vez que pode contribuir para a elaboração de estratégias preventivas mais eficientes de controle (FERREIRA et al., 2013).

Dessa forma, diante da importância econômica da cultura da palma de óleo, e da reclassificação da espécie em outros patossistemas no mundo, o objetivo desta pesquisa foi estudar a etiologia da podridão basal em palma de óleo.

## 2.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Amazônia Oriental.

### ▪ Isolamento do fungo e teste de patogenicidade

O isolado de *Thielaviopsis* sp. foi obtido a partir de plantas sintomáticas de podridões de tecidos internos do estipe e na base da folha flecha em palma de óleo. O teste de patogenicidade foi conduzido em mudas do híbrido interespecífico - HIE BRS Manicoré e do híbrido intraespecífico Tenera, com 2 e 1,5 anos de idade, respectivamente. Realizou-se a inoculação com suspensão de conídios a  $1 \times 10^7$  conídios.mL<sup>-1</sup> ou por discos de micélio na ráquis de folhas, com e sem ferimento prévio (Figura 1). Cada ponto de inoculação foi envolvido com parafilme por 72 horas e as mudas mantidas em casa de vegetação sob temperatura média de 28 °C e umidade relativa do ar média de 95%.

Adotou-se delineamento experimental inteiramente ao acaso com 10 repetições. Os tratamentos controle constituíram-se de plantas de cada híbrido, com e sem ferimento, porém não inoculadas. Foi determinado o Período de Incubação (PI), sendo observado o tempo em dias, decorrido desde a inoculação do patógeno até o aparecimento dos primeiros sintomas da doença.

**Figura 1.** Teste de patogenicidade em mudas de palma de óleo com e sem ferimentos, inoculadas com discos de micélios ou por suspensão de conídios com o fungo *Thielaviopsis* sp.



Fonte: O Autor.

### ▪ Mensuração do crescimento micelial e avaliações de características morfológicas

O crescimento micelial e as características morfológicas do fungo foram avaliados *in vitro*. Para tanto, discos de micélio de 5 mm de diâmetro, de cultura cultivada por cinco dias, foram repicados para placas de Petri, contendo o meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA) e incubados durante três dias em câmara de crescimento tipo BOD à temperatura de 28

°C e fotoperíodo de 12 h. Foram tomadas medidas do diâmetro da colônia em dois eixos perpendiculares marcados no fundo de cada placa. Calculou-se o índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM), utilizando-se a equação descrita por Oliveira (1991):  $IVCM = \frac{\sum (D - D_a)}{N}$ , onde o IVCM = índice de velocidade de crescimento micelial; D = diâmetro médio atual da colônia;  $D_a$  = diâmetro médio da colônia do dia anterior e N = número de dias após a inoculação. Outras características fúngicas como coloração da colônia também foram registradas. As dimensões dos conídios foram mensuradas por microscopia de luz a partir de uma suspensão de inóculo preparada de colônias com cinco dias de incubação. Foram registrados o comprimento e largura de 100 conídios amostrados ao acaso em lâminas de microscopia de luz sob aumento de 40 vezes. Foram expressas as médias de comprimento e de largura, assim como registrados os limites superiores e inferiores de cada dimensão.

#### ▪ **Caracterização Molecular**

##### - **Extração de DNA e análise filogenética**

Para a extração do DNA, Utilizou-se uma colônia do isolado fúngico cultivada em meio de cultura batata dextrose- ágar (BDA) por cinco dias. A extração de DNA foi realizada utilizando-se o protocolo de descrita por Joshi et al. (2009), adaptada por Oliveira et al. (2012).

As reações em cadeia de polimerase (PCR) foi realizada em um volume final de 50  $\mu$ L contendo 2 $\mu$ L do DNA fúngico, 10 $\mu$ L de tampão 5X, 6 $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub>, 0,5 $\mu$ L dos primers ITS4 e ITS5; EF1 e EF2 1 $\mu$ L de dNTP, 0,3 $\mu$ L de Taq polimerase e 29,7 $\mu$ L de água ultra pura. As condições de amplificação foram: 95°C, por 2 min, e desnaturação inicial de 95 °C por 95 s, seguido de 35 ciclos de 58 °C, por 60 s, 72 °C por 72 s e 94 °C por 30 s, seguido de 58 °C por 1 min, com uma extensão final de 72 °C por 30 min. O produto do PCR foi avaliado em gel de agarose 0,8%, corado com GelRed (Biotium) e fotodocumentado. Posteriormente, realizou-se a limpeza do produto do PCR, seguido da quantificação de DNA. Os produtos de PCR das regiões ITS e EF foram sequenciados pela empresa ACTGene. A análise filogenética foi realizada com base em comparação de sequências do gene EF-1 $\alpha$  e ITS com sequências disponíveis no GenBank-NCBI. As sequências foram avaliadas utilizando o programa Mega 6.0. As análises filogenéticas foram realizadas para a máxima parcimônia.

## 2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

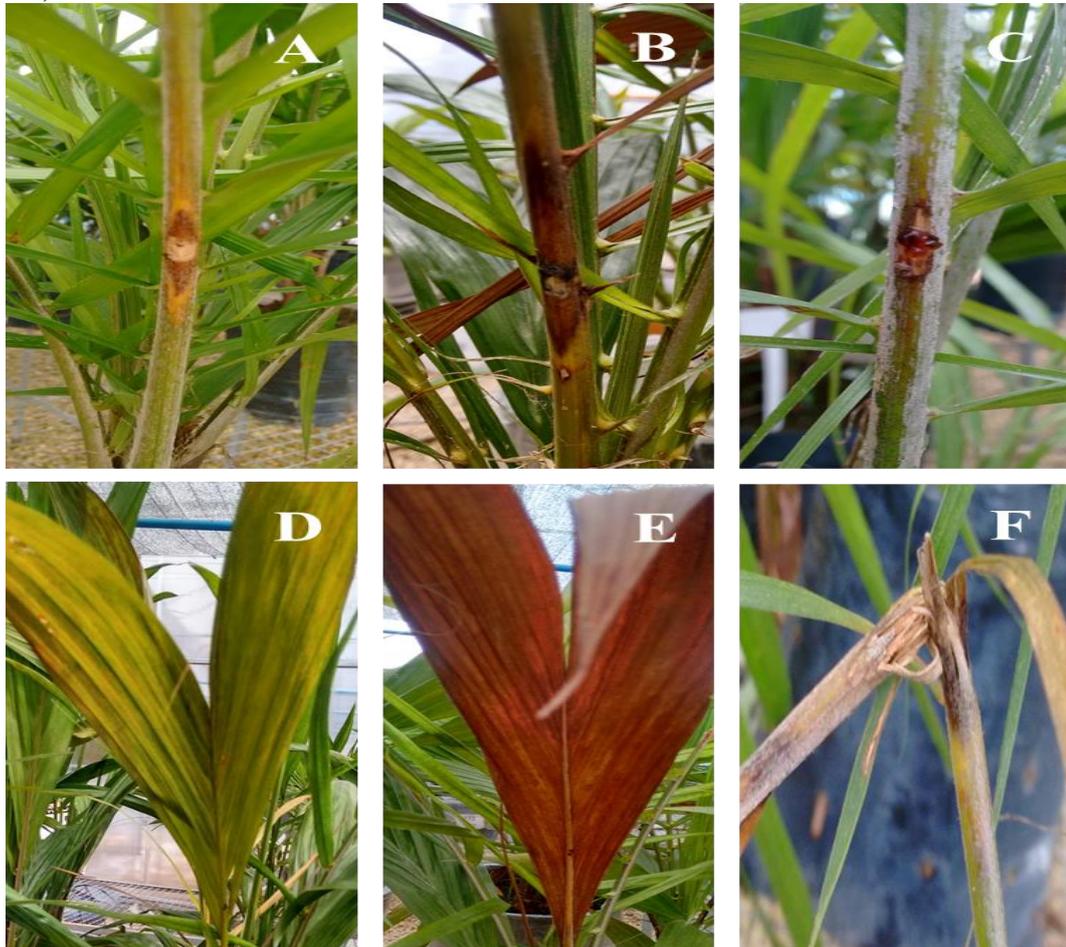
### ▪ Isolamento do fungo e teste de patogenicidade

Foi isolado o fungo *Thielaviopsis* sp. associado as lesões necróticas do estipe da palma de óleo, sendo patogênico nas duas cultivares da palma de óleo. Todas as mudas com ferimento prévio na ráquis inoculadas por disco de micélio e suspensão de conídios manifestaram sintomas aos 5 dias após inoculação. No entanto, nas plantas sem ferimento e no tratamento controle não foram observados sintomas da podridão basal. O fungo não conseguiu infectar e colonizar o tecido no local inoculado, quando se utilizou o método sem ferimento.

O resultado apresentado neste trabalho comprovou que, para ocorrer infecção por *Thielaviopsis* sp. em mudas de palma de óleo, são necessários ferimentos no tecido vegetal. O resultado corroborou com os resultados Silva (2015) quando em estudo a resinose do coqueiro, observou no teste de patogenicidade com *T. paradoxa* em mudas de coqueiro que a infecção ocorreu através de ferimento prévio na ráquis e que mudas inoculadas sem ferimento permaneceram sadias, sem sintoma da resinose do coqueiro. *T. paradoxa* é um patógeno que causa infecção através de ferimentos e das fissuras naturais (NELSON, 2005). Conforme Alvarez et al. (2012) e Robertson (1962) *T. paradoxa* vem associado a processos patogênicos em plantas estressadas em palma de óleo.

Nas plantas inoculadas com ferimentos na ráquis, observaram-se sintomas externos como lesões necróticas marrom escuro no ponto de inoculação, ocorrendo por vezes a formação de um halo amarelado e exsudação de resina. Com o progresso da doença, verificou-se folhas amareladas, que secavam e quebravam (Figura 2).

**Figura 02.** Sintomas da podridão basal em mudas de palma de óleos: Lesões necróticas marron escuro (A, B); exsudação de resina (C); folhas amareladas que secavam e quebravam (D, E e F).



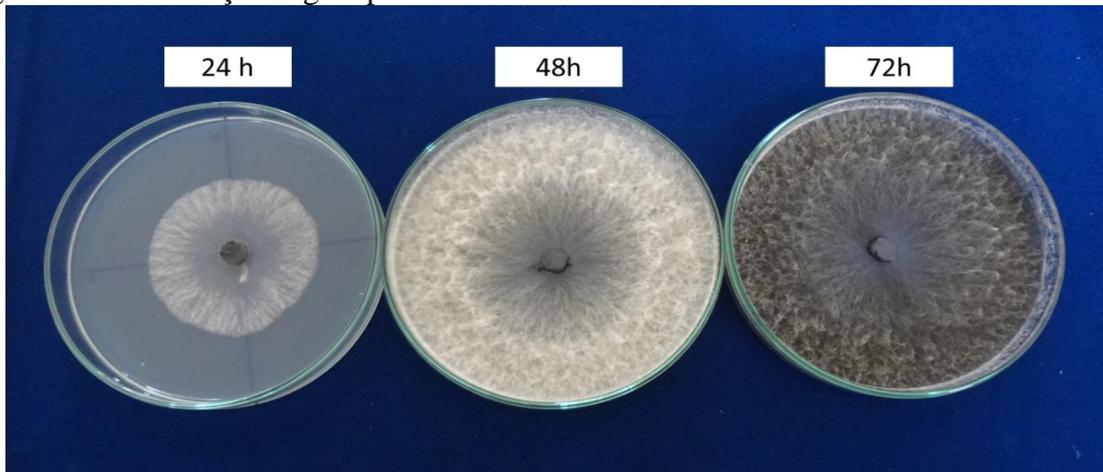
Fonte: O Autor

Resultados semelhantes foram observados por Robertson (1962) quando testou a patogenicidade de *Ceratocystis paradoxa* em mudas de palma de óleo e verificou lesões necróticas de coloração marrom na ráquis e nas folhas apical, se espalhando sobre a superfície da folha, seguido de secagem e quebra. Alvarez et al. (2012), observaram os sintomas em mudas de palma de óleo em uma semana após a inoculação com *T. paradoxa* durante o teste de patogenicidade, com lesões necróticas castanho e clorose que se estendiam por toda a folha. Verificou-se o apodrecimento dos tecidos internos com comprometimento de vasos condutores, o que explica a subsequente seca das folhas inoculadas. Segundo Alvarez et al. (2012), quando submetidas a algum tipo de estresse, as plantas ficam mais predispostas à infecção por este fungo. O fungo *Thielaviopsis* sp. foi patogênico nas cultivares de palma de óleo.

▪ **Mensuração do crescimento micelial e avaliações de características morfológicas**

O fungo apresentou crescimento rápido sendo que com 48h, após a repicagem, a colônia já ocupava toda a superfície da placa de Petri de 90 mm. O IVCM foi de 50,76 mm dia<sup>-1</sup>. Observou-se durante 3 dias de crescimento, a coloração variou, apresentando-se o micélio branco, entre os dois primeiros dias, e no terceiro dia a coloração negra. O isolado apresentou-se textura micelial aveludada com micélio ralo e aéreo (Figura 3).

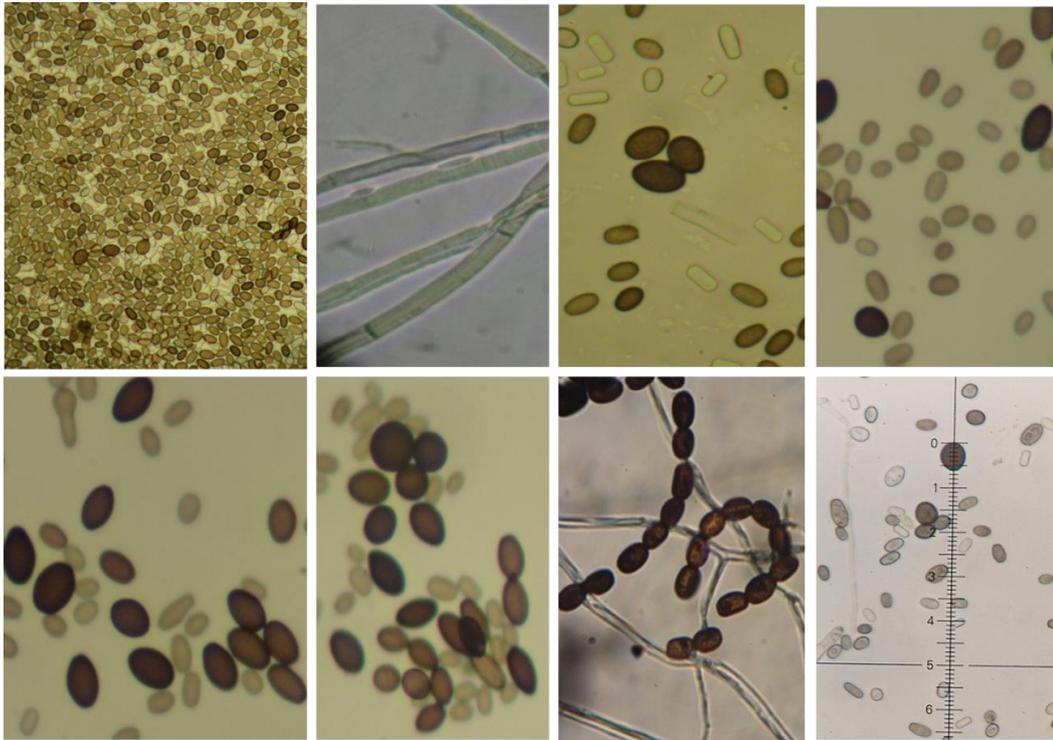
**Figura 03.** Crescimento da colônia e surgimento de coloração branca após 24 e 48h e surgimento de coloração negra após 72h.



Fonte: O Autor.

O isolado apresentou abundante formação de conídios, sendo observados dois tipos, os endoconídios que são classificados como conídios primários, sendo asseptados, hialino e retangular, medindo 3,0-4,0 x 1,5-3,0  $\mu\text{m}$ ; e conídios secundários, asseptados, amarronzado, oblongos a ovais, medindo 7,0-10,0 x 3,0-5,0  $\mu\text{m}$ ; e os aleurioconídio, esféricos e lisos, de paredes espessas e marron, medindo 5-7 x 5-7  $\mu\text{m}$ .

**Figura 04.** Estruturas reprodutivas: micélio, endoconídios (conídios primários e secundários) e aleurioconídios.



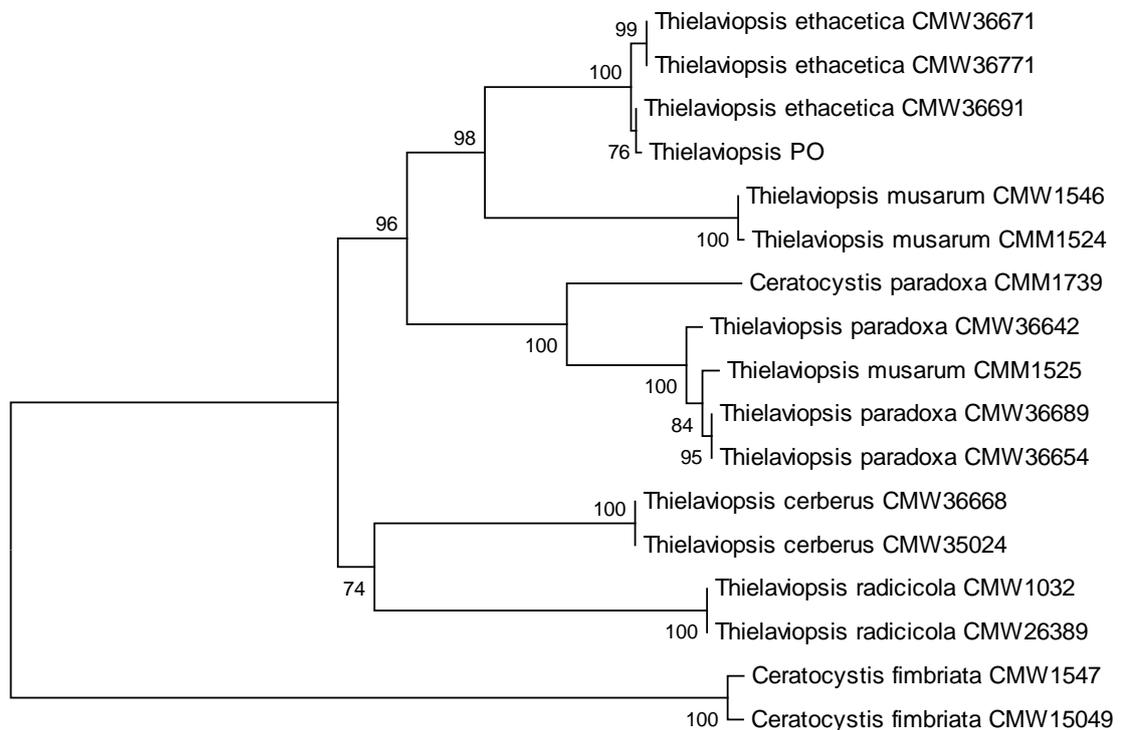
Fonte: O Autor.

O estudo sobre a classificação dos conídios apresentados neste trabalho é importante, uma vez que, os conídios possuem funções na sobrevivência, dispersão e patogenicidade. Os clamidósporos desempenham um papel de sobrevivência do patógeno no solo pode estar envolvido na infecção inicial e desencadear sintomas nas ráquis da palma de óleo. Com a recente reclassificação de *T. paradoxa* para *T. ethacetica*, faz-se necessário alinhar a etiologia da podridão basal da palma de óleo, até então atribuída ao fungo *T. paradoxa*. São escassos os trabalhos envolvendo a caracterização morfológica de *T. ethacetica*. Segundo Mbenoun et al (2014), as duas espécies têm características morfológicas semelhantes.

#### ▪ Caracterização Molecular

Foi construído o dendrograma a partir das amplificações e sequenciamento das regiões ITS e EF, para a comparação com sequências depositadas no GenBank (Figura 5). Observou-se que o *Thielaviopsis* sp. foi alocado no mesmo grupo que as espécies *Thielaviopsis ethacetica*, com suporte de bootstrap de 100% por análise máxima parcimônia. Portanto, de acordo com o sequenciamento da região ITS e EF, pode-se concluir que se trata da espécie *Thielaviopsis ethacetica*. Este resultado corrobora a análise morfológica.

**Figura 5.** Dendograma filogenético máxima parcimônia das regiões ITS e EF de isolado de *Thielaviopsis ethacetica*.



0.02

Fonte: O Autor.

Em estudos baseados na análise de sequência de DNA e caracterização morfológica do complexo *Ceratocystis paradoxa*, teleomorfo do fungo *Thielaviopsis paradoxa* (De Seynes) Hohn., foram reconhecidas cinco espécies do complexo, incluindo *Ceratocystis paradoxa* e *Ceratocystis ethacetica*, que apresenta linhagens filogenéticas distintas e características morfológicas semelhantes dentro do mesmo complexo (MBENOUN et al., 2014). *Ceratocystis ethacetica* foi reiterado como um táxon distinto através de análises filogenéticas de DNA (MBENOUN et al., 2014).

Mbenoun et al. (2014) relataram alta diversidade genética entre os isolados de *Ceratocystis* em Camarões. A correta identificação de fungo patogênico de planta e a caracterização morfológica são de extrema importância para estudos da etiologia e na definição de medidas de controle, dentro do manejo integrado de doenças.

## 2.4 CONCLUSÃO

O fungo *Thielaviopsis ethacetica* é o agente etiológico da podridão basal da palma de óleo.

## REFERÊNCIAS

- ALVAREZ, A. E.; LLANO, A, G. JOHN B; LOKE, J.B ; CHACON, M. C. Characterization o *Thielaviopsis paradoxa* Isolates from Oil Palms in Colombia, Ecuador and Brazil. **Journal Phytopathol**, v.160, p.690-700, 2012.
- ALVINDIA, D.G., KOBAYASHI, T., YAGUCHI, Y. NATSUAKI, K.T. Symptoms and the associated fungi of postharvest diseases on non-chemical bananas imported from the Philippines. **Japanese Journal of Tropical Agriculture**, v.44, p.87-93. 2000.
- BOARI, A. de J.; TREMACOLDI, C. R.Podridão do estipe causada por *Thielaviopsis paradoxa* em palma de óleo no Estado do Pará. **Tropical Plant pathology**. Brasília, DF, v. 37, (Suplemento), 2012.
- CARVALHO, E. A.; COELHO, I. L.; TREMACOLDI, C. R.; GOMES JÚNIOR, R. A. Fungos associados ao híbrido interespecífico da palma de óleo no Estado do Pará. **Tropical Plant Pathology**. Brasília, DF, v. 36, p. 908, (Suplemento), 2011
- CHAPOLA, R. G. Controle da Podridão Abacaxi da cana-de-açúcar por meio da pulverização de fungicidas em mudas no sulco de plantio. **Dissertação de Mestrado. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**, 2010
- CHÁVEZ. M. F. **Enfermedades de la palma africana en Ecuador y su combate**. INIAP. Quito. v..8, p.19, 1986.
- CHIA, G. S.; LOPES, R.; CUNHA, R. N. V. ROCHA, R. N. C.; LOPES, M T. G. Repetibilidade da produção de cachos de híbridos interespecíficos entre o caiaué e o dendezeiro. **Revista Acta Amazônica**, v.39, p.249-254, 2009.
- CORLEY, R. H. V.; TINKER, P. B. **The Oil Palm**. 4. ed. Oxford: Blackwell Publishing,. E-books. 2003.
- DE BEER ZW, DUONG TA, BARNES I, Wingfield BD, Wingfield MJ, Redefining *Ceratocystis* and allied genera. **Studies in Mycology**, v.79, p.187–219, 2014.
- FERRARI, J.T. Podridão Negra do Abacaxi. Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Vegetal. Divulgação Técnica. **Instituto Biológico**,v.71, p.49-51, 2009.
- FERREIRA, D. F. **Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0**. In: Reunião anual da região brasileira da sociedade internacional de biometria, v.45, p.255-258. 2000.
- HORNEL FXR. Zur kentniss einige fadenpilze. **Hedwigia**, v.43, p.295-299, 1904.
- JOSHI, S.D.; SANJAY,D.; BABY, U.I.; ANDAL, A.K.A. Molecular characterization of *Pestalotiopsis* spp. associated with tea (*Camellia sinensis*) In southern India using RAPD and ISSR markers. **Indian Journal of Biotechnology**, v.8, p.377-383, 2009.
- KILE GA. Plant diseases caused by species of *Ceratocystis* sensu stricto and Chalara. In: Wingfield MJ, Seifert KA, Webber JF. (eds) *Ceratocystis* and Ophiostoma Taxonomy,

Ecology, and Pathogenicity. **The American Phytopathological Society**, St. Paul, Minnesota, APS Press, p.173–183, 1993.

MBENOUN M, DE BEER ZW, WINGFIELD MJ. Reconsidering species boundaries in the *Ceratocystis paradoxa* complex, including a new species from oil palm and cacao in Cameroon. **Mycologia** v.106, p.757–784, 2014.

MOURA. J.I.L.; OLIVEIRA, L.; LUZ, E. D. M. N.; SILVA, S.D.V.M.; SANTOS, R.S. Weel associated to Gummosis in oil palm (*Eleaes guineensis* Jacq) in Brazil. **Revista de Agricultura**, v.88, p.87 – 89, 2013.

NELSON, S. Stem bleeding of coconut palm. Plant Disease. Cooperative Extension Service, College of Tropical Agriculture and Human Resources. **University of Hawaii at Manoa**, Disponível em: <http://www.ctahr.hawaii.edu/freepubs/pdf/PD-30.pdf>. Acesso em 06 agosto 2016.

NIETO P.L.E. Incidencia de pudriciones de estipe de la palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.) em Colombia. **Palmas**, 6: Número Especial, 1995.

OBIDZINSKI, K. ANDRIANI, R; KOMARUDIN, H., ANDRIANTO, A. Environmental and social impacts of oil palm plantations and their implications for biofuel production in indonesia. **Ecology and Society**, v.17, p.1- 25, 2012.

OLIVEIRA, J. S. F.; CARVALHO, K. B. A.; CARVALHO, E. A. Protocolo Modificado para extração de DNA do gênero *Pestalotiopsis*. In: II Congresso Brasileiro de Recursos Genéticos. Belém. Anais do II Congresso Brasileiro de Recursos Genéticos, v.1, p.619-622, 2012.

ROBERTSON, J. S. Dry basal rot, a new disease of oil palms caused by *Ceratocystis paradoxa* (Dade) Moreau. **Transactions of the British Mycological**, v.45, p.475- 478, 1962.

RODRIGUES, J. **Trichoderma spp. associado a níveis de adubação NPK no patossistema Sclerotinia sclerotiorum-feijoeiro. 2010.** 85f. Dissertação (Mestrado em Agronomia: Área de Concentração Fitopatologia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

IDENTIFICAÇÃO E UTILIZAÇÃO DE *Trichoderma* spp. ARMAZENADOS E NATIVOS NO BIOCONTROLE DE *Sclerotinia sclerotiorum* (PDF Download Available). Available from:

[https://www.researchgate.net/publication/284177247\\_IDENTIFICACAO\\_E\\_UTILIZACAO\\_DE\\_Trichoderma\\_spp\\_ARMAZENADOS\\_E\\_NATIVOS\\_NO\\_BIOCONTROLE\\_DE\\_Sclerotinia\\_sclerotiorum](https://www.researchgate.net/publication/284177247_IDENTIFICACAO_E_UTILIZACAO_DE_Trichoderma_spp_ARMAZENADOS_E_NATIVOS_NO_BIOCONTROLE_DE_Sclerotinia_sclerotiorum) [accessed Mar 16 2018].

SILVA, J.C. Controle biológico da resinose do coqueiro. **Tese (Doutorado em proteção de plantas)**, 92f. Universidade Federal de Alagoas, 2015.

TOVAR, J.P.& NIETO, P.E. N Caracterización de las principales pudriciones de estipe de la palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.), en la Zona Norte de Colombia. **Palmas**, v.19, p.2, 1998.

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

WENT, FAFC. De ananasziekte van het suikerriet. **Mededeelingen van het Proefstation West-Java** v.5, p.1–8, 1893.

### 3. CONTROLE BIOLÓGICO DA PODRIDÃO BASAL DA PALMA DE ÓLEO

#### RESUMO

A podridão basal, cujo agente etiológico é o fungo *Thielaviopsis ethacetica*, é uma das principais doenças que afetam a cultura da palma de óleo. O nosso objetivo com este trabalho foi avaliar o controle biológico da podridão basal da palma de óleo. Isolados de *Bacillus* spp. e *Trichoderma* spp. foram avaliados *in vitro* quanto ao antagonismo pelo teste de pareamento e quanto à produção de protease e quitinase. Nos testes *in vivo*, avaliou-se a severidade da doença e quantificou-se proteínas relacionadas a patogênese (PR's proteínas) Glucanase (GLU), Quitinase (QUI), Peroxidase do Guaiacol (POX) e Polifenoloxidase (POL), em mudas de palma de óleo inoculadas preventivamente com os agentes de controle biológico. Em ambos os experimentos, *in vitro* e *in vivo*, o delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com 12 tratamentos e cinco repetições, mais a testemunha. Todos os isolados *Trichoderma* spp. e *Bacillus* spp. reduziram o crescimento micelial do patógeno *in vitro* quando comparado à testemunha. Os isolados de *Trichoderma* spp. apresentaram até 52% (T03) de inibição do crescimento do patógeno, enquanto os de *Bacillus* spp. até 100% (Bac 01, Bac 02 e Bac 03). Apenas os isolados de *Bacillus* spp. foram positivos para a protease. Nenhum dos isolados apresentou produção de quitinase. No experimento *in vivo*, todos os isolados reduziram a severidade da doença. Houve diferença significativa entre tratamentos para a glucanase, quitinase e polifenol oxidase analisadas ao final do período de 30 dias. O isolado de *Bacillus* spp. Bac 03 se destacou dos demais agentes de controle biológico, por apresentar um potencial antagonista no controle *in vitro* de *Thielaviopsis ethacetica* e produção de protease, além de reduzir a severidade da podridão basal e de induzir a atividade das enzimas GLU, QUI e POP na defesa da palma de óleo. O controle biológico de podridão basal pode ser uma ferramenta para o manejo integrado da doença.

**Palavras-chave:** *Trichoderma* spp. *Bacillus* spp., PR's – Proteínas, *Thielaviopsis ethacetica*, *Elaeis* spp.

## ABSTRACT

The basal rot, whose etiologic agent is the fungus *Thielaviopsis ethacetica*, is one of the main diseases that affect the oil palm crop. Our objective with this work was to evaluate the biological control of the basal rot of the oil palm. Isolates from *Bacillus* spp. and *Trichoderma* spp. were evaluated in vitro for antagonism by the pairing test and for protease and chitinase production. In vivo tests, the severity of the disease was evaluated and proteins related to pathogenesis (PR's proteins), Glucanase (GLU), Chitinase (QUI), Peroxidase of Guaiacol (POX) and Polyphenoloxidase (POL) were quantified in seedlings of oil palm preventively inoculated with the biological control agents. In both experiments, in vitro and in vivo, the experimental design was the completely randomized with 12 treatments and five replicates plus the control. All the isolates *Trichoderma* spp. and *Bacillus* spp. reduced the mycelial growth of the pathogen in vitro when compared to the control. The isolates of *Trichoderma* spp. showed up to 52% (T03) of inhibition of the growth of the pathogen, whereas those of *Bacillus* spp. up to 100% (Bac 01, Bac 02 and Bac 03). Only the isolates of *Bacillus* spp. were positive for the protease. None of the isolates presented chitinase production. In the in vivo experiment, all isolates reduced the severity of the disease. There was a significant difference between treatments for glucanase, chitinase and polyphenol oxidase analyzed at the end of the 30 day period. The isolate of *Bacillus* spp. Bac 03 stood out from the other biological control agents because it presented a potential antagonist in the in vitro control of *Thielaviopsis ethacetica* and protease production, besides reducing the severity of basal rot and inducing the activity of GLU, QUI and POP enzymes in the defense of the oil palm. Biological control of basal rot can be a tool for the integrated management of the disease.

**Key words:** Biological control, Induction of resistance. *Elaeis* spp.

### 3.1 INTRODUÇÃO

A palma de óleo ou dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) é uma das culturas oleaginosas mais importantes no mundo, por apresentar amplos usos nas indústrias de alimentos, farmacêutica, química e produção de biodiesel (CORLEY & TINKER, 2003; MURPHY, 2014). A Indonésia e Malásia são os principais produtores, compreendendo 85% de toda produção mundial (MURPHY, 2014; OBIDZINSKI et al., 2012).

O Brasil ocupa a décima posição no ranking de países produtores, com produção estimada em 1.340 toneladas (FAO, 2014). Contudo, o nosso país apresenta o maior potencial mundial para a produção de óleo de palma, com ampla disponibilidade de terras para o cultivo, sobretudo, em áreas da Amazônia Legal (CHIA et al., 2009; HOMMA, 2010). No cenário nacional, o estado do Pará, destaca-se como o maior produtor de óleo de palma, com produção média anual de 770 mil toneladas, o que representa 90% da produção no país (BORGES, 2016).

Muito embora as estimativas produtivas sejam atraentes ao mercado alimentício e de biodiesel, a franca expansão do cultivo da palma de óleo enfrenta limitações, decorrente da incidência de doenças (CARVALHO & SANTOS, 2013). Dentre essas moléstias, a podridão basal do estipe, cujo agente etiológico é o fungo *Thielaviopsis ethacetica*, recentemente redefinido do complexo *Thielaviopsis paradoxa* (de Seynes), anamorfo do ascomiceto *Ceratocystis paradoxa* (de Seynes) (MBENOUN et al., 2014), tem se tornado uma ameaça ao cultivo da palma de óleo. A doença pode causar sérios prejuízos devido a sua severidade, ausência de estudos epidemiológicos aprofundados e carência de ferramentas eficazes para o seu controle.

Nesse contexto, o controle biológico por microrganismos antagonistas pode constituir importante método para o manejo integrado da podridão basal. Rizobactérias do gênero *Bacillus* e fungos do gênero *Trichoderma* são considerados agentes de controle biológico por atuar em controle preventivo de fitopatógenos (BROTMAN et al., 2010) e cujas propriedades antagônicas se baseiam em mecanismos diversos, tais como: antibiose, competição e parasitismo, além de apresentarem possível atuação como indutores de resistência em plantas (WOO et al., 2006; VINALE et al., 2008; MORANDI & BETTIOL, 2009).

A indução de resistência, por sua vez, pode ser mais um mecanismo de controle biológico indireto, onde microrganismos atuam como indutores, na ativação de mecanismos latentes de resistência (ROMEIRO, 2007). Enzimas são ativadas em respostas de defesa, incluindo as fitoalexinas e PR's-proteínas tais como  $\beta$ -1,3-glucanases, quitinases e peroxidase

(VAN LOON et al., 1998; PASCHOLATI et al., 2011). Assim como, a produção de antibióticos e a inativação de enzimas do fungo fitopatogênico (TSENG, 2008).

No entanto, não há informação na literatura científica sobre o controle do agente etiológico da podridão basal ou sobre a indução de resistência por *Bacillus* spp. e *Trichoderma* spp. em palma de óleo. Apesar de que pesquisas têm mostrado *Bacillus* spp. e *Trichoderma* spp. como potencial agente de controle nos mais diversos patossistemas. O isolado de *Bacillus* sp. (DFs1414) reduziu o crescimento micelial de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* e reduziu a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) em tomateiro em casa de vegetação. Eziashi (2006) observou o potencial dos isolados de *Trichoderma viride*, *T. polysporum*, *T. hamatum* e *T. aureoviride* no controle da podridão negra de sementes em palma de óleo. Isolados de *Bacillus* spp. e *Trichoderma* spp. foram eficientes no controle da resinose do coqueiro, quando confrontados com *Thielaviopsis paradoxa in vitro* e aplicados preventivamente *in vivo* (SILVA, 2015). *Trichoderma harzianum* apresentou propriedades antagônicas *in vitro* sobre *Thielaviopsis paradoxa*, agente etiológico da podridão parda em *Phoenix dactylifera* L., e reduziu significativamente a podridão em mudas (ZIEDAN et al, 2015). Isolado de *Trichoderma harzianum* foi eficiente no controle de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, em condições *in vitro* e *in vivo* (SUNDARAMOORTHY & BALABASKAR, 2013).

Dada à importância da cultura da palma de óleo e diante das escassas ferramentas para o manejo da podridão basal, fazem-se necessárias pesquisas que viabilizem estratégias para o seu controle. O estudo teve por objetivo foi avaliar o controle biológico da podridão basal da palma de óleo.

### 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa, Amazônia Oriental.

#### ▪ **Microrganismos**

Os isolados utilizados neste estudo pertencem à coleção de microrganismos do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Amazônia Oriental, Belém/PA, Brasil. Foram utilizados 12 potenciais agentes de controle biológico, sendo oito de *Bacillus* spp. (Bac 01, Bac 02, Bac 03, Bac 04, Bac 57, Bac 61, Bac 77 e Bac 104) e quatro *Trichoderma* spp. (T 03, T 06, T 07 e T 09) provenientes de área de coqueiro do município de Moju - PA. E um isolado de *T. ethacetica*, agente etiológico da podridão basal em palma de óleo.

▪ **Seleção *in vitro* de agentes de controle biológico**

Foram avaliados os antagonismos de *Bacillus* spp. e de *Trichoderma* spp. sobre *T. ethacetica* em testes distintos de confrontação direta.

**- Antagonismo de *Trichoderma* spp. sobre *Thielaviopsis ethacetica***

Disco de micélio de 5 mm de diâmetro do isolado de *C. ethacetica* e outro do antagonista, provenientes de culturas com sete dias de crescimento em meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA) foram repicados para novas placa de Petri de 90 mm, contendo o mesmo meio em extremidades opostas, a 2,0 cm de distância da borda. A testemunha foi constituída de apenas o disco de *T. ethacetica*. As placas foram incubadas em câmara de crescimento tipo “BOD”, com temperatura de  $28 \pm 2$  °C e fotoperíodo de 12 horas durante sete dias. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco repetições e quatro isolados de *Trichoderma* spp. e mais a testemunha. Avaliou-se o diâmetro da colônia do patógeno e do antagonista diariamente, com um paquímetro digital. Os isolados de *Trichoderma* spp. foram classificados quanto ao antagonismo, conforme a escala proposta por Bell et al. (1982) e adaptado por Rodrigues (2010): nota 1 - *Trichoderma* spp. cresce por toda a placa de Petri e sobre o disco do patógeno; nota 2 - *Trichoderma* spp. cresce por toda a placa de Petri, porém não sobre o patógeno; nota 3- *Trichoderma* spp. cresce sobre  $\frac{3}{4}$  da placa de Petri ; nota 4 - *Trichoderma* spp. cresce sobre  $\frac{2}{3}$  da placa de Petri; nota 5- *Trichoderma* spp. e patógeno crescem até a metade da placa de Petri; nota 6 - patógeno cresce sobre  $\frac{2}{3}$  da placa de Petri; nota 7 - patógeno cresce por toda a placa de Petri.

**- Antagonismo de *Bacillus* spp. sobre *Thielaviopsis ethacetica***

O teste de antagonismo direto *in vitro* foi realizado utilizando a metodologia descrita por Elkahoui et al. (2012), com adaptações. Previamente, isolados de *Bacillus* spp. foram cultivados em meio de cultura NA por 48 horas e o isolado de *C. ethacetica* em meio BDA por sete dias. Após este período, repicou-se um disco de 5 mm de diâmetro do patógeno para o centro de placas de Petri com 90 cm de diâmetro contendo o mesmo meio e inoculou-se a bactéria na mesma placa formando um quadrado com 5 cm de lado, no entorno do patógeno. A testemunha foi constituído somente pelo patógeno cultivado em meio BDA. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco repetições e oito isolados de *Bacillus* spp. mais a testemunha, no total de 9 tratamentos. As placas foram incubadas em câmara de crescimento tipo “BOD”, com temperatura de  $28 \pm 2$ °C e fotoperíodo de 12 horas.

Avaliaram-se os tratamentos a cada 24 horas medindo-se o diâmetro da colônia do patógeno em dois sentidos diametralmente opostos, com um paquímetro digital.

Em ambos os ensaios de antagonismos, para *Bacillus* spp. e *Trichoderma* spp., determinou-se o índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) de acordo com equação proposta por Oliveira et al. (1999) e a percentagem de inibição do crescimento micelial por Menten et al. (1976). As análises estatísticas foram realizadas no programa Sisvar® aplicando-se o teste de F a 5% de significância, sendo as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5%.

#### ▪ **Produção de enzimas hidrolíticas pelos antagonistas**

Os isolados de *Bacillus* spp. foram repicados em meio Nutriente-Ágar (NA) por 24 h e isolados de *Trichoderma* spp. em meio BDA por 5 dias para a caracterização enzimática. Os isolados foram cultivados em meios de culturas específicos para produção da protease e quitinase, com 5 repetições. Cada parcela experimental foi representada por uma placa de Petri.

#### - **Protease**

A produção de protease foi avaliada conforme a metodologia de Souza (2015) com adaptações. Os isolados antagonistas foram repicados para placas de Petri contendo ágar, caseína e leite desnatado. As placas foram incubadas a 28 °C em BOD por 48 h e a produção de protease foi observada pela formação de halos ao redor da colônia, indicando a secreção de protease.

#### - **Quitinase**

A produção de quitinase foi avaliada em meio mineral, utilizando-se quitina coloidal, conforme a metodologia de Vasconcelos et al. (2010) com adaptações. Os isolados de *Trichoderma* spp. e *Bacillus* spp. foram repicados para o centro de placas de Petri contendo o meio de cultura MLN, conforme a seguir (g L<sup>-1</sup>): 0,7; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,3 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5 MgSO<sub>4</sub>. 5H<sub>2</sub>O, 0,01 FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,0010 ZnSO<sub>4</sub>, 0,0010 MnCl<sub>2</sub> e 20 de ágar. As placas foram incubadas a 28 °C durante 7 dias. A produção de quitinase foi constatada pela observação de halo transparente ao redor da colônia contrastando com o restante do meio com aspecto leitoso.

- **Seleção *in vivo* de agentes de controle biológico**

Mudas de palma de óleo do HIE manicoré com dois anos de idade foram utilizadas neste ensaio. Os potenciais agentes de controle biológico foram aplicados via pulverização na parte aérea e solo, aos 15, 10 e 5 dias antes da inoculação do patógeno.

- **Preparo e aplicação dos antagonistas**

Os isolados de *Trichoderma* spp. foram cultivados em meio BDA e após 7 dias de incubação, adicionou-se 10 mL de água destilada esterilizada na superfície das placas para remoção dos conídios por raspagem com alça de Drigalski. A quantificação e calibração da suspensão de inóculo foram realizadas em câmara de Neubauer, ajustando-se a concentração para  $1 \times 10^8$  conídios. mL<sup>-1</sup>. Enquanto que os isolados de *Bacillus* spp. foram cultivados em meio NA por 24 horas e mantidas a 28 °C em câmara de crescimento. A suspensão foi ajustada em absorbância a 550 nm (A550) igual a 0,1.

- **Preparo e aplicação do inóculo de *Thielaviopsis ethacetica***

O isolado de *Thielaviopsis ethacetica* foi cultivado em meio de cultura BDA à temperatura de  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 12 horas. Após cinco dias, foram adicionados 10 mL de água destilada e esterilizada e procedeu-se raspagem da superfície do meio de cultura com alça de Drigalski. A suspensão de inóculo do fungo foi ajustada em câmara de Neubauer para a concentração de  $10^6$  conídios. mL<sup>-1</sup>.

Mudas de palma de óleo foram inoculadas por pulverização de suspensão com micélio e conídios do patógeno na ráquis previamente ferido. O experimento foi instalado em delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC), com 12 tratamentos e 4 repetições. Plantas do tratamento controle ou testemunha foram inoculadas somente com patógeno. Foi realizada a avaliação da severidade da doença por mensuração da lesão externa, com um paquímetro digital. Calculou-se a área abaixo da curva de progresso da severidade (AACPS). Os dados obtidos foram submetidos à análise variância o programa Sisvar® aplicando-se o teste de F e o teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade para comparar médias.

- **Análises das características bioquímicas**

- **Coleta de amostras e extração enzimática**

Amostras de folhas foram coletadas para análise bioquímica no final do experimento, ou seja, 30 dias após a aplicação dos agentes de controle biológico. As amostras foram

identificadas, acondicionadas em papel alumínio e colocadas em caixa de isopor com nitrogênio líquido e armazenadas em freezer a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Para o preparo dos extratos, os tecidos foliares foram macerados em nitrogênio líquido e as amostras foram homogeneizadas em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5, na proporção de 1g para 10 mL de tampão. O extrato obtido foi filtrado em gaze, transferido para tubos plásticos de 2 mL e centrifugado a 10.000 g a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , por 15 minutos, o sobrenadante obtido foi armazenado em freezer a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  e considerado como extrato enzimático para a determinação da atividade de peroxidase, quitinase,  $\beta$ -1,3-glucanase.

#### **- Atividade de $\beta$ -1,3 glucanase (E.C. 3.2.1.29)**

A atividade da  $\beta$ -1,3 glucanase foi determinada segundo metodologia descrita por Lever (1972), com adaptações. A reação foi constituída de 500  $\mu\text{L}$  de tampão acetato de sódio 0,1M (pH 5,0), 500  $\mu\text{L}$  da solução do substrato laminarina ( $4\text{ mg mL}^{-1}$ ) e 40  $\mu\text{L}$  do extrato vegetal e incubada a  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos. Após esse período, foram acrescentados ao meio de reação 1000  $\mu\text{L}$  de DNS e, em seguida, essa mistura foi aquecida a  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos. Após o resfriamento em gelo, até a temperatura de  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ , as amostras tiveram suas absorvâncias determinadas em espectrofotômetro a 540 nm e os resultados foram expressos em unidades de absorvância (Abs) por minuto por  $\text{mg}^{-1}$  de proteína.

#### **- Atividade de Quitinase (E. C. 3.2.1.14)**

A atividade da quitinase foi determinada segundo metodologia descrita por Côrtes et al. (2008), com adaptações. A reação foi constituída de 50  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático, 300  $\mu\text{L}$  de quitina (1%), 500  $\mu\text{L}$  tampão acetato de sódio 0,1M (pH 5,0), e incubada a  $50^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos. Após esse período, foram acrescentados ao meio de reação 1000  $\mu\text{L}$  de DNS e, em seguida, essa mistura foi aquecida a  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos. Após o resfriamento em gelo, até a temperatura de  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ , as amostras tiveram suas absorvâncias determinadas em espectrofotômetro a 540 nm e os resultados foram expressos em unidades de absorvância (Abs) por minuto por  $\text{mg}^{-1}$  de proteína.

#### **- Atividade de peroxidase (E.C. 1.11.1.7)**

A atividade de peroxidases foi determinada pela adição de 50  $\mu\text{L}$  do extrato da planta, ajustado para 1 mL de solução contendo 450  $\mu\text{L}$  acetato de sódio 50 mM pH 5,2, 250  $\mu\text{L}$  de guaiacol 20 mM e 250  $\mu\text{L}$  peróxido de hidrogênio 60 mM. Após incubação a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ , por 10 minutos, a absorvância foi medida em espectrofotômetro a 480 nm (URBANEK et al., 1991).

Os resultados foram expressos em unidades de absorvância (Abs) por minuto por  $\text{mg}^{-1}$  de proteína.

**- Atividade de polifenoloxidase (E. C. 1.10.3.1)**

A atividade da polifenoloxidase foi determinada segundo metodologia descrita por Cano et al. (1997), com adaptações. A reação ocorrida em banho-maria, entre 0,3 mL do extrato e 1,85 mL de solução de catecol (pyrocatecol 0,1 M em tampão fosfato 0,05 M, pH 6,0), durante 30 min, a 30°C, foi interrompida após a adição de 0,8 mL de ácido perclórico a 5% ( $\text{HClO}_4$ ). A leitura da absorvância foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 395 nm. Os resultados foram expressos em unidades de absorvância (Abs) por minuto por  $\text{mg}^{-1}$  de proteína.

**- Análise estatística**

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

### 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

▪ **Antagonismo de *Trichoderma* spp. sobre *Thielaviopsis ethacetica***

Houve diferenças significativas entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ). Todos os isolados *Trichoderma* spp. reduziram o crescimento do patógeno quando comparado à testemunha (Tabela 1). A maior redução do crescimento micelial do patógeno foi observada com os isolados T03 e T06 com decréscimos de 52,32 e 48,48%, respectivamente. Os isolados T09 e T07 determinaram valores intermediários de crescimento micelial, com reduções de 37,31 e 34,06% em relação à testemunha, respectivamente (Tabela 1) (Figura 6).

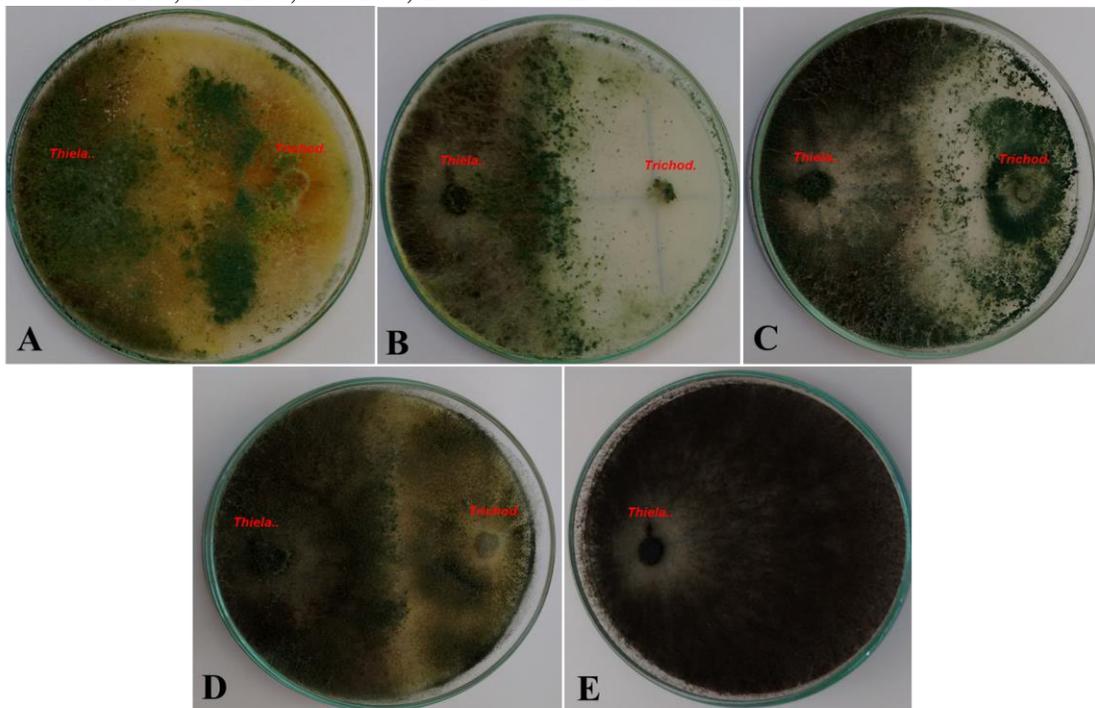
**Tabela 1.** Médias do índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) do fungo *Thielaviopsis ethacetica* no teste de antagonismo direto com isolados de *Trichoderma* spp. (T), e notas segundo a escala de Bell et al. (1982) e adaptado por Rodrigues (2010).

Isolados	IVCM	Porcentagem de controle (%)	Notas
T03	17,68 a	52,32	1,00 a
T06	19,10 a	48,48	1,00 a
T09	23,24 b	37,32	1,00 a
T07	24,45 b	34,06	1,00 a
Testemunha	37,08 c	0,00	7,00 b

\* Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si pelo teste Skott-Knott a 5% de significância

Todos os isolados de *Trichoderma* spp. apresentaram média de notas igual a 1, conforme a escala de Bell et al. (1982) e adaptado por Rodrigues (2010), podendo ser considerado o grupo de maior eficiência na supressão de *T. ethacetica*, pois os antagonistas cresceram por toda a placa de Petri e sobre o disco do patógeno aos sete dias de avaliação (Figura 6).

**Figura 6.** Teste de antagonismo por pareamento entre *Trichoderma* spp. e *Thielaviopsis ethacetica*: A-T03, B - T06, C - T09, D – T-07 e E-Testemunha.



Fonte: O Autor.

Estes resultados evidenciaram a eficiência de *Trichoderma* spp. *in vitro* na redução do crescimento micelial de *T. ethacetica*, demonstrando o parasitismo e a capacidade de competição entre os microrganismos confrontados, não obstante, mais de um mecanismo de ação pode estar sendo expresso. A competição por espaço, nutrientes, água e oxigênio é considerada como principal modo de ação utilizado pelos antagonistas para suprimir a atividade do patógeno (MOTLAGH & SAMIMI, 2013). A habilidade de competir por espaço torna fungos do gênero *Trichoderma* excelentes colonizadores, pois são capazes de crescerem e consumir nutrientes mais rapidamente que fungos fitopatogênicos, prevenindo assim o estabelecimento e a infecção pelo patógeno.

Resultados semelhantes foram observados por Santos et al. (2012), quando avaliaram a ação antagonica de isolados de *Trichoderma* spp. *in vitro* sobre *Thielaviopsis paradoxa*. A mesma observação foi feita por Silva (2015), em que isolados de *Trichoderma* spp. promoveram o estrangulamento de hifas do isolado de *Thielaviopsis paradoxa*, indicando o parasitismo dos antagonistas no controle do agente etiológico da resinose do coqueiro. Isolados de *Trichoderma* spp. foram eficientes *in vitro* em inibir o crescimento micelial em até 53% de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, agente etiológico da murcha tomate (SUNDARAMOORTHY & BALABASKAR, 2013). Wijesinghe et al. (2010) verificaram redução de até 92,7% no crescimento micelial de *Thielaviopsis paradoxa* agente etiológico da podridão negra do abacaxipelo fungo *Trichoderma asperellum* e observaram micoparasitismo através do estrangulamento de hifas no teste de pareamento *in vitro*. O crescimento micelial de *Thielaviopsis paradoxa*, agente etiológico da podridão da *Agave tequilana*, foi totalmente inibido (100%) quando confrontado com *Trichoderma longibrachiarum*, por meio do micoparasitismo e da liberação de metabólitos tóxicos ao patógeno (SANCHEZ et al., 2007). *Trichoderma harzianum* apresentaram propriedades antagonicas sobre *Thielaviopsis paradoxa*, agente etiológico da podridão parda em *Phoenix dactylifera* L. e reduziu em 44% o crescimento micelial patógeno (ZIEDAN et al, 2015).

▪ **Antagonismo de *Bacillus* spp. sobre *Thielaviopsis ethacetica***

Houve diferença significativa entre os tratamentos ( $P < 0,05$ ). Todos os isolados apresentaram efeito inibitório do patógeno quando comparado à testemunha. Os tratamentos Bac 01, Bac 02 e Bac 03 inibiram totalmente o crescimento micelial *C. ethacetica* quando comparado à testemunha. Observaram-se reduções de 23,87%, 22,13% e 22,10% para Bac 57, Bac 04 e Bac 61, respectivamente. Os isolados Bac 77 a Bac 104 apresentaram inibição de

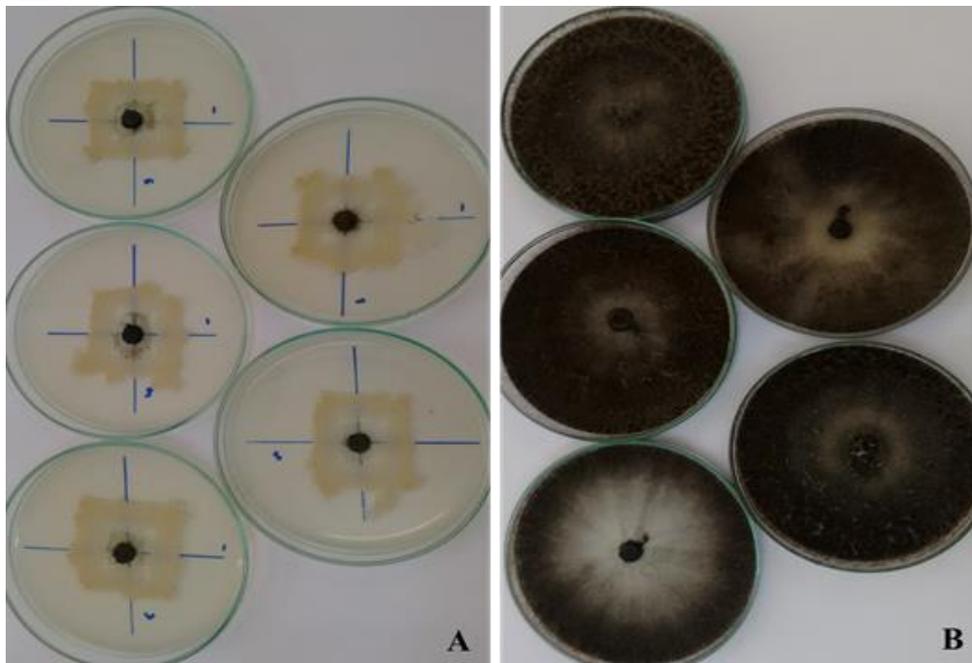
18,08 e 13,57% no crescimento micelial do patógeno, respectivamente, superior estatisticamente ao crescimento mensurado na testemunha (Tabela 2)

**Tabela 2.** Médias do índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) do fungo *Thielaviopsis ethacetica* no teste de antagonismo direto com isolados de *Bacillus* spp. (Bac).

Isolados	IVCM	Porcentagem de controle (%)
Bac 01	0,00 a	100
Bac 02	0,00 a	100
Bac 03	0,00 a	100
Bac 57	52,63 b	23,87
Bac 04	53,85 b	22,10
Bac 61	53,85 b	22,10
Bac 77	56,63 c	18,08
Bac 104	59,75 c	13,57
Testemunha	69,13 d	0,00

\*Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si pelo teste Skott-Knott a 5% de significância.

**Figura 7.** Teste de pareamento entre *Bacillus* sp. e *Thielaviopsis ethacetica*: A – Bac 03 e B – Testemunha.



Fonte: O Autor.

A inibição do crescimento micelial de *T. ethacetica* pelos isolados de *Bacillus* spp. pode ser devida aos diferentes mecanismos exibidos pelos antagonistas. Diferentes tipos de

compostos antimicrobianos podem ser produzidos por isolados de *Bacillus* spp. (ARGUELLES-ARIAS et al., 2009; KUMAR et al., 2012; HAN et al., 2015; SILVA, 2015). A atividade antifúngica também pode ser devida a produção de protease, enzimas produzidas pela espécie se *Bacillus* que inativam a capacidade enzimática do fitopatógeno (SILVA, 2015; HAN et al., 2015), além do controle proporcionado através da competição entre espaço e nutrientes. O presente estudo sugere que mais de um mecanismo de ação pode estar envolvido na supressão patógeno pelos isolados de *Bacillus* spp.

Em pesquisas realizadas por George et al. (2011), isolados de *Bacillus* spp. foram antagonistas para *Thielaviopsis paradoxa*, agente etiológico da resinose do coqueiro, com inibição do crescimento micelial variando de 42 a 93%. Silva (2015), avaliando 109 isolados de *Bacillus* spp., constatou que 24 isolados foram capazes de inibir o crescimento micelial de *Thielaviopsis paradoxa*, agente etiológico da resinose do coqueiro. Torres et al. (2016) observaram inibição superior a 50% no crescimento micelial de três linhagens de *Macrophomina phaseolina*, agente etiológico da podridão de carvão em soja e feijão, por isolados de *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* PGPMori7 e *Bacillus amyloliquefaciens* PGPBacCA. Isolados de *Bacillus amyloliquefaciens* e *Bacillus pumilus*, apresentaram atividade antagônica *in vitro* inibindo o crescimento micelial em mais de 50% dos fungos *Colletotrichum acutatum* e *C. gloeosporioides*, agentes etiológicos da antracnose da *Capsicum annuum* (HAN et al., 2015).

#### ▪ **Produção de enzimas hidrolíticas pelos antagonistas**

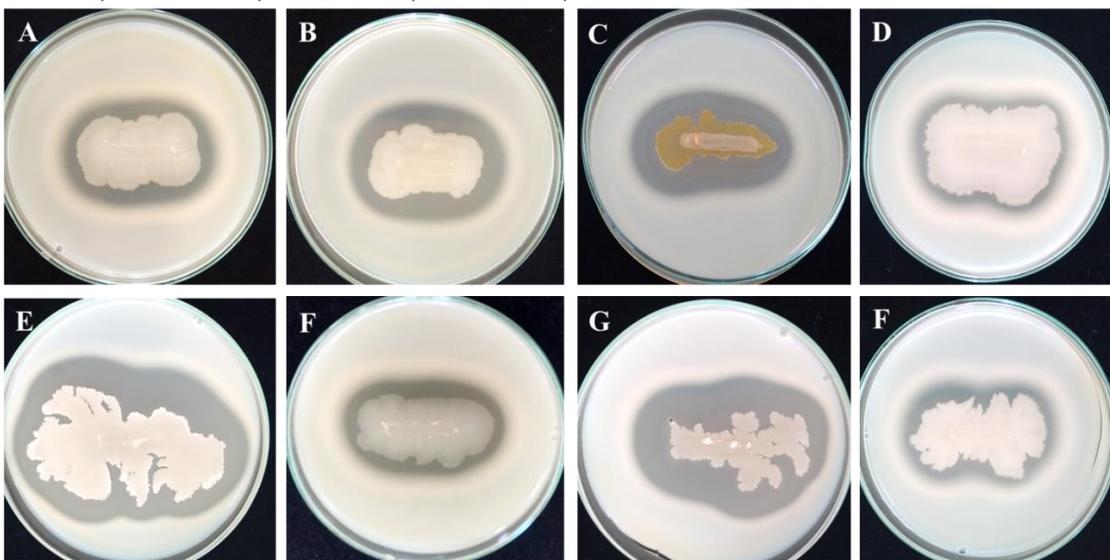
Nenhum dos isolados de *Trichoderma* spp. produziu quitinase ou protease segundo a metodologia empregada nestes estudos. Todos os isolados de *Bacillus* spp. avaliados apresentaram resultados positivos apenas para a produção de protease, (Tabela 3).

**Tabela 3.** Produção de enzimas hidrolíticas dos isolados de *Bacillus* spp. (Bac) e *Trichoderma* spp. (T), produtores de protease e quitinase.

Isolados	Protease	Quitinase
Bac 01	+	-
Bac 02	+	-
Bac 03	+	-
Bac 04	+	-
Bac 57	+	-
Bac 61	+	-
Bac 77	+	-
Bac 104	+	-
T 03	-	-
T 06	-	-
T 07	-	-
T 09	-	-

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

**Figura 8.** Produção de protease dos isolados de *Bacillus* spp. (Bac): A - Bac 01; B - Bac 02; C - Bac 03; D - Bac 04; E - Bac 57; F - Bac 61; G - Bac 77 e H - Bac 104.



Fonte: O Autor.

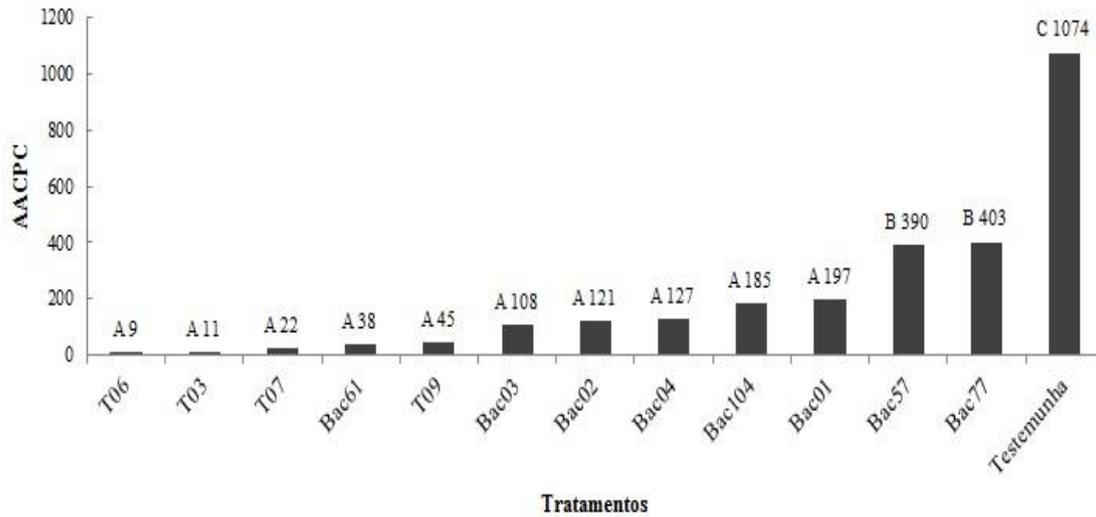
As proteases são classificadas como hidrolases (E.C 3), enzimas que catalisam a degradação de peptídeos em substratos protéicos, de fungos patogênicos à partir dos domínios catalíticos N(amino)-terminal e C (carboxi)-terminal) liberando na reação um aminoácido dipeptídeo (dipeptidil peptidases) ou tripeptídeos (tripeptidil peptidases) (RAO et al., 1998). Desse modo, essas hidrolases produzidas pelos microrganismos antagonistas, tornam mais

fácil a penetração do tecido fúngico por degradação das proteínas da camada externa do patógeno e, ainda, auxiliam na inativação de enzimas produzidas por fitopatógenos durante o processo de infecção (HOWELL, 2003). Estudos têm demonstrado que enzimas hidrolíticas e antibiótico são importantes para o controle biológico de fitopatógenos, podendo essas substâncias agir isoladamente ou em sinergia na degradação da parede celular dos patógenos (LORITO et al., 1996). O trabalho conduzido por Han et al. (2015) ilustra este fato, à medida que as três estirpes de *Bacillus atropheus* e duas estirpes de *B. amyloliquefacien* avaliadas produziram enzimas de quitinase e protease, sendo eficazes na supressão da antracnose em frutos de pimenta, cujos agentes etiológicos são *Colletotrichum acutatum* e *C. gloeosporioides*.

▪ **Teste *in vivo* para o controle da podridão basal**

Todos os isolados avaliados diferiram significativamente ( $p < 0,05$ ) da testemunha proporcionando redução da área abaixo da curva de progresso da severidade (AACPS) da podridão basal em palma de óleo (Figura 9). O período de incubação da doença foi de cinco dias na testemunha não tratada com os agentes de controle biológico. Plantas tratadas com os isolados T06, T03, T07, Bac 61, T09, Bac 03, Bac 02, Bac 04, Bac 104 e Bac 01 reduziram a porcentagem da área do tecido lesionado e apresentaram menor progresso da doença. Plantas tratadas com os isolados Bac 57 e Bac 77 apresentaram resultados intermediários, diferindo dos demais isolados e do tratamento testemunha, com 64% e 63% de redução da doença, respectivamente.

**Figura 9.** Área Abaixo da Curva de Progresso da Severidade (AACPS) da podridão basal mensurada pelo comprimento de lesão em mudas de palma de óleo do HIE Manicoré com 2 anos de idade tratadas com isolados de *Bacillus* spp. e *Trichoderma* spp. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.



**Figura 10.** Severidade da podridão basal em mudas de palma de óleo tratadas com *Bacillus* spp. e *Trichoderma* spp.: A- T03, B – Bac 57 e C – Testemunha



Fonte: O Autor.

Foi verificada a eficiência dos agentes de controle biológico *Trichoderma* spp. e *Bacillus* spp. quando aplicados de forma preventiva, que resultou na redução significativa na severidade da podridão basal em palma de óleo. A eficiência dos antagonistas pode estar relacionada com as habilidades competitivas sobre os mecanismos de defesa do patógeno e interferir na sua infecção, através da inibição na germinação de conídios (SILVA &

BETTIOL, 2009). Segundo Benítez et al. (2004), muitos fungos fitopatogênicos são sensíveis à falta de alguns nutrientes, sendo a competição um mecanismo importante pelos antagonistas, pois estes possuem a capacidade superior em mobilizar e absorver os nutrientes do solo comparativamente a outros organismos. Da mesma forma, porém em patossistema diferentes, Belete et al. (2015) constataram a redução de 64,4 a 74,6% na severidade da podridão negra (*Fusarium solani*) em feijoeiro em decorrência da aplicação prévia de *Trichoderma* spp. Em estudo da severidade da murcha de fusário do tomateiro (*F. oxysporum*), em casa de vegetação, o isolado de *Bacillus* sp. (DFs1414) reduziu em 37,2% a área abaixo da curva de progresso da doença (ROCHA & MOURA, 2013). Gupta e Vakhlu (2015) observaram redução de 40% na incidência e na severidade de *F. oxysporum* em *Crocus sativus* com o *Bacillus amyloliquefaciens* (W2).

#### ▪ Atividade de $\beta$ -1,3-glucanase e quitinase

Houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos com os agentes de controle biológico para a atividade das enzimas  $\beta$ -1,3-glucanase e quitinase ao final do período experimental (30 dias). Para a produção da enzima  $\beta$ -1,3-glucanase, as plantas tratadas com T06, Bac02, Bac01, T07, Bac77, Bac57, Bac104, T09, Bac03 e Bac04 apresentaram atividade enzimática 33% superior quando comparadas às plantas da testemunha (Figura 11). Não houve diferenças significativas entre os tratamentos T 03 e Bac 61 e o controle sendo a atividade da  $\beta$ -1,3-glucanase mantida em  $0,02 \text{ UA mg min}^{-1}$ . Para a produção da enzima quitinase, as plantas tratadas com T07, Bac04, T09, T06, Bac01, Bac02, Bac03, Bac57 e Bac104 apresentaram atividade enzimática no mínimo de 35% superior à testemunha. Não houve diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre os tratamentos com isolados T 03 e Bac 61, Bac 77 e a testemunha (Figura 12).

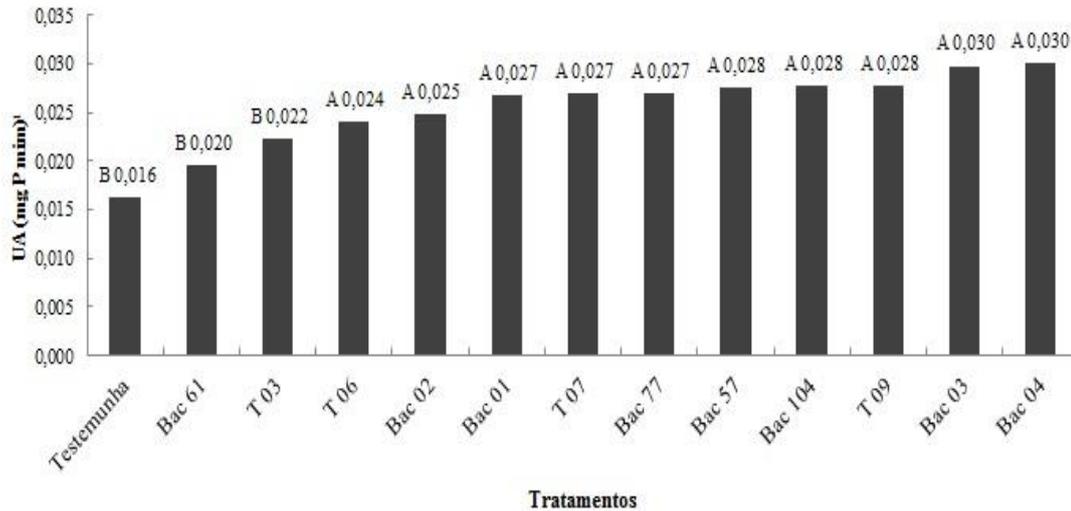
Os resultados evidenciaram que os tratamentos com agentes de controle biológico foram efetivos na ativação de processos enzimáticos de indução do metabolismo de defesa das plantas em resposta à *Thielaviopsis ethacetica*, o que pode ter sido determinante para a sua eficiência no controle da podridão basal da palma de óleo. Agentes de controle biológico além de atuarem diretamente sobre o patógeno, produzindo compostos antimicrobianos, são capazes de sensibilizar as plantas para ativar seus mecanismos de defesa em resposta à presença de um patógeno.

As enzimas  $\beta$ -1,3-glucanases e quitinase são classificadas como proteínas relacionadas à patogênese (PR - proteínas) e possuem funções hidrolíticas, rompendo polímeros tais como  $\beta$ -1,3-glucanas e quitina que estão presentes na parede celular de patógenos. Além de atuarem

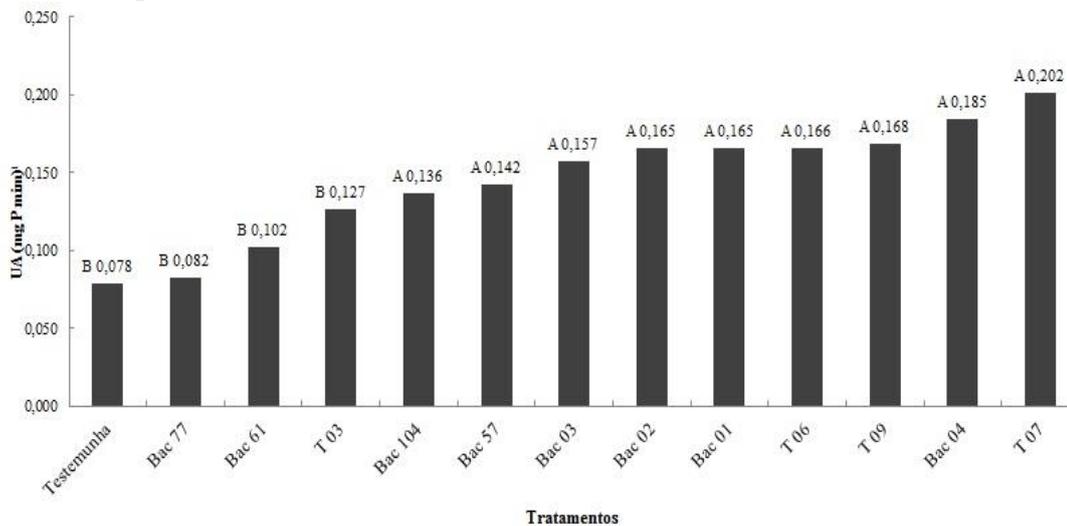
na síntese de lignina e outros fenóis que contribuem para o desencadeamento de barreiras de defesa, reforçando as estruturas das células das plantas (PASCHOLATI, 2011). Desse modo, infere-se que algo semelhante tenha ocorrido nesse experimento, com base nos resultados de atividades das enzimas. O tratamento preventivo com agente de controle biológico potencializou a expressão das atividades das enzimas  $\beta$ -1,3-glucanases e quitinase o que, provavelmente, induziu alterações morfofisiológicas e bioquímicas nas plantas pelo aumento de enzimas hidrolíticas que, possivelmente, atuaram na degradação da parede celular do patógeno reduzindo com isso a severidade da doença.

São raros os trabalhos com a cultura da palma de óleo no tocante à indução de resistência e não há na literatura estudos que avaliaram a atividade destas enzimas em plantas desafiadas por *T. ethacetica*. No entanto, em outros patossistemas, há relatos de ativação de defesas em plantas tratadas com potenciais agentes de controle biológico. Saksirirat et al. (2009) observaram que *T. harzianum* e *T. asperellum* induziram aumento das atividades das enzimas glucanase e quitinase no intervalo de 14 dias após a inoculação, em tomateiro, contra *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* e apresentou redução máxima de 69,32% na severidade da mancha bacteriana. Karthikeyan et al. (2006) estudaram o efeito de *Pseudomonas fluorescens*, *Trichoderma viride* e *T. harzianum* em combinação com quitina sobre a indução de resistência em coqueiro, contra *Ganoderma lucidum*, observaram a máxima atividade de  $\beta$ -1,3-glucanases aos 09 dias após a aplicação dos tratamentos, apresentando redução aos 21 dias. Filippi et al. (2011) testaram rizobactérias *B. pyrrocinia* e *P. fluorescens* em arroz e observaram aumento das atividades  $\beta$ -1,3-glucanases e quitinase 72 horas após inoculação com *M. oryzae*, sendo associadas à baixa severidade da doença.

**Figura 11.** Atividade da  $\beta$ -1,3-glucanase em mudas de palma de óleo do HIE manicoré de 2 anos tratadas com isolados de *Bacillus* spp. e de *Trichoderma* spp. no intervalo de 30 dias de avaliação. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.



**Figura 12.** Atividade da quitinase em mudas de palma de óleo do HIE manicoré de 2 anos tratadas com isolados de *Bacillus* spp. e de *Trichoderma* spp. no intervalo de 30 dias de avaliação. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade..

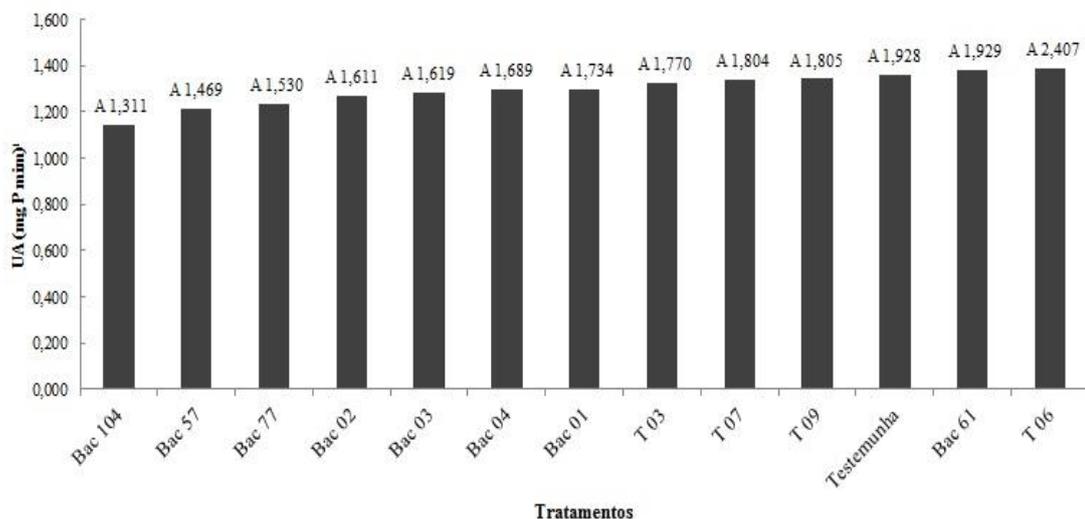


#### ▪ Atividade de peroxidase de guaiacol

Não foi observada alteração na atividade da enzima peroxidase após 30 dias da aplicação dos tratamentos, ou seja, não houve diferença significativa entre as plantas inoculadas com agentes de controle biológico e aquelas não inoculadas (Figura 13). Possivelmente, este resultado está relacionado ao tempo decorrido desde a aplicação dos agentes de controle biológico, ou ao tempo da inoculação do patógeno, ou mesmo do comportamento fisiológico da cultura. Em pesquisas realizadas por Macagnan et al. (2008),

com dois agentes de controle biológico da vassora de bruxa do cacauero, houve redução de 25% na atividade da peroxidase, quando comparou-se o 4º dia após a inoculação do antagonista com o 12º dia. Estes autores concluíram que maior atividade desta enzima foi nas primeiras horas após as pulverizações com os agentes de biocontrole e houve decréscimo da atividade enzimática no decorrer do tempo. Segundo Pascholati & Leite (1995), a resistência induzida é influenciada pelas mudanças específicas que ocorre no metabolismo da planta, sendo assim a atividade da enzima em resposta a defesa do vegetal vai depender do intervalo de tempo entre o tratamento inicial com os indutores bióticos ou abióticos e a subsequente inoculação do patógeno. As peroxidases são enzimas que atuam no metabolismo inicial de defesa das plantas à ação dos agentes de controle biológico, mediante a fortificação da parede celular da planta hospedeira, na oxidação de fenóis, assim como, na lignificação da planta contra ataque de patógenos (RODRIGUES & DATNOFF, 2005).

**Figura 13.** Atividade da peroxidase em mudas de palma de óleo do HIE manicoré de 2 anos tratadas com isolados de *Bacillus* spp. e de *Trichoderma* spp. no intervalo de 30 dias de avaliação. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.



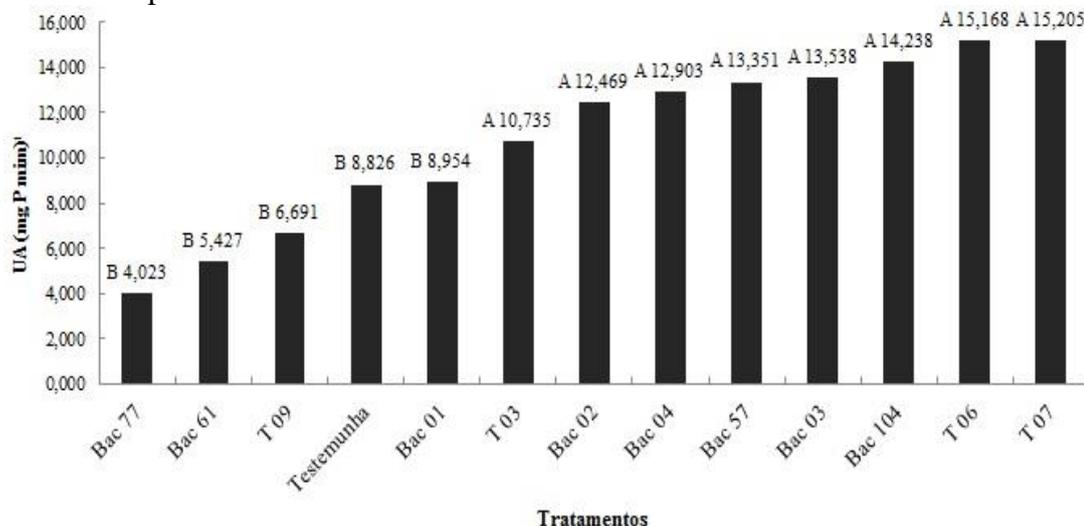
Corroborando com a afirmação de Tuzun (2001) de que as peroxidases estão envolvidas nas respostas iniciais de defesa de plantas. Infere-se que algo semelhante tenha ocorrido nesse experimento, em que nas primeiras horas após iniciado os tratamentos com patógenos e agentes de controle biológico tenham ocorrido um aumento da peroxidase, tendo em vista que, ao final do período experimental, não ocorreu a expressão da enzima, muito embora a severidade da doença tenha sido reduzida. Salla et al. (2016), ao testar a rizobactéria *Streptomyces* em respostas a atividade enzimática morfo cizento (*Botrytis cinerea*) em

*Eucalyptus grandis* observaram variação na atividade da peroxidase, apresentando redução aos 15 dias. Assim sendo, se faz necessária a realização de novos ensaios enzimáticos, quantificando a atividade dessa enzima em diferentes intervalos de tempo entre os tratamentos com os agentes de controle biológico e a inoculação do patógeno sobre a severidade da podridão basal.

#### ▪ Atividade de polifenoloxidase

Houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos com os agentes de controle biológico para a atividade da enzima polifenol oxidase ao final do período experimental (30 dias). Plantas tratadas com T07, T06, Bac104, Bac03, Bac57, Bac04, Bac02 e T03 apresentaram atividade enzimática 57,9% superior quando comparadas às testemunhas. Não houve diferenças significativas para a atividade dessa proteína entre os tratamentos com isolados Bac01, T09, Bac61 e Bac77 e a testemunha (Figura 14).

**Figura 14.** Atividade da polifenoloxidase em mudas de palma de óleo do HIE manicoré de 2 anos tratadas com isolados de *Bacillus* spp. e de *Trichoderma* spp. no intervalo de 30 dias de avaliação. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.



De modo similar ao que foi observado nesse experimento, Karthikeyan, et al. (2006) observaram incrementos significativos na atividade da enzima polifenol oxidase em coqueiros tratados com *Trichoderma*, quando comparados à testemunha, resultando em maior acúmulo de compostos fenólicos. As polifenol oxidases são enzimas envolvidas na síntese de compostos fenólicos, produção de fitoalexinas e na síntese de lignina, o que aumenta a barreira de defesa do hospedeiro (KAVINO et al., 2008; RADJACOMMARE et al., 2010).

Resultados deste trabalho comprovaram que *Bacillus* spp. e *Trichoderma* spp., quando aplicados em plantas de forma preventiva, promoveram aumento na atividade das enzimas  $\beta$ -1,3-glucanases, quitinase e polifenoloxidase na medida em que houve redução da severidade da doença.

Vale ressaltar, no entanto, que ainda se faz necessária a realização de novos ensaios enzimáticos, quantificando PR's-proteínas em intervalo de tempo menor e iniciado horas após a aplicação dos agentes de controle biológico e/ou do patógeno desafiante. Outro passo a ser explorado, em estudos posteriores é a aplicação dos agentes antagonistas em condições de campo, avaliando sua inserção no manejo integrado da podridão basal (*T. ethacetica*) da palma de óleo.

### 3.4 CONCLUSÃO

O controle biológico da podridão basal da palma de óleo (*Thielaviopsis ethacetica*) mostrou-se potencialmente promissor tanto pelo antagonismo *in vitro* quanto pela redução da severidade da doença em mudas e pela ativação de proteínas relacionadas à patogênese. O isolado Bac 03 se destacou dos demais agentes de controle biológico pelo potencial antagonista *in vitro* a *Thielaviopsis ethacetica* e pela produção de protease, além de reduzir a severidade da podridão basal em mudas e induzir a atividade das enzimas GLU, QUI e POL em da palma de óleo.

## REFERÊNCIAS

- ARGUELLES-ARIAS, A., ONGENA, A., HALIMI, A., LARA, Y., BRANS, A., JORIS, B. AND FICKERS, P. *Bacillus amyloliquefaciens* GA1 as a source of potent antibiotics and other secondary metabolites for biocontrol of plant pathogens. **Microbial Cell Factories** v.8, p.1-12, 2009.
- BELETE E, AYALEW A, AHMED S Evaluation of local isolates of *Trichoderma* spp. against black root rot (*Fusarium solani*) on faba bean. **Journal of Plant Pathology Microbiology**. v.6, n.6, 279, 2015.
- BELL, D. K. et al. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. **Phytopathology**, v.72, p.379-382, 1982.
- BENÍTEZ, T.; RINCÓN, A. M.; LIMÓN, M. C. E ;CONDÓN, A. C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**, v.7, n.4, p.249-260, 2004.
- BORGES, A. J.; COLLICCHIO, E.; CAMPOS, G.A. A cultura da palma de óleo (*Elaeis guineenses* Jacq.) no Brasil e no mundo: aspectos agronômicos e tecnológicos - uma revisão. **Revista Liberato**, Novo Hamburgo, v. 17, n. 27, p. 01-118, 2016.
- BORGES, A., COLLICCHIO, E., & CAMPOS, G. A. A cultura da palma de óleo (*Elaeis guineenses* Jacq.) no Brasil e no mundo: aspectos agronômicos e tecnológicos-uma revisão. **Revista Liberato**, v.17, p.27, 2016.
- BROTMAN, Y.; GUPTA, K.; VITERBO, A. Quick guide – *Trichoderma*. Magazine **Current Biology**, v.9, n.20, p.1-2. 2010.
- CANO, M.P.; ANCOS, B.; MANTALLANA, M.C.; CÁMARA, M.; REGLERO, G. TABEA, J.. Differences among Spanish and Latin-American banana cultivars: morphological, chemical and sensory characteristics. **Food Chemistry**, v.59, n.3, p.411-419, 1997.
- CARVALHO, E. A.; SANTOS, T.P.F. **Doenças da palma de óleo no contexto da expansão do cultivo no Estado do Pará**. Documentos/Embrapa Amazônia Oriental. Doc 389, p.19, 2013.
- CHIA, G. S.; LOPES, R.; CUNHA, R. N. V. da; ROCHA, R. N. C. da; LOPES, M. T. G. Repetibilidade da produção de cachos de híbridos interespecíficos entre caiaué e dendezeiro. **Acta Amazonica**, v.39, n.2, p.249 - 254, 2009.
- CHOWDAPPA, S. P. et al. Growth stimulation and induction of systemic resistance in tomato against early and late blight by *Bacillus subtilis* OTPB1 or *Trichoderma harzianum* OTPB3. **Biological Control**, v.65, p.109–117, 2013.
- CORLEY, R. H. V.; TINKER, P. B. **The Oil Palm**. 4. ed. Oxford: Blackwell Publishing,. E-books. 2003.
- ELKAHOU, S.; DJÉBALI, N.; TABBENE, O.; HADJBRAHIM, A.; MNASRI, B.; MHAMDI, R. SHAABAN, M.; LIMAM. F. Evaluation of antifungal activity from *Bacillus* strains against *Rhizoctonia solani*. **African Journal of Biotechnology**,v.11, n.18, p. 4196-4201, 2012.

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

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Estatísticas da produção mundial 2014. Disponível em: < [http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/browse/Q/\\*S](http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/browse/Q/*S)>. Acesso em: 11 de fevereiro de 2017.

FILIPPI, M. C. C., SILVA, G. B., SILVA-LOBO, V. L., CORTES, M. V. C. B., MORAES, A. J. G., PRABHU, A. S. Leaf blast (*Magnaporthe oryzae*) suppression and growth promotion by rhizobacteria on aerobic rice in Brazil. **Biological Control**, v.58,p.160–166. 2011.

FUNDAÇÃO AMAZÔNIA DE AMPARO A ESTUDOS E PESQUISAS DO PARÁ. FAPESPA. Boletim Agropecuário do Estado do Pará 2015. 1 ed. Belém: Fapespa, 38 f, 2015.

GEORGE, P.; GUPTA, A.; GOPAL, R. M.; MOHANAN, C.; THOMAS, L.; GEORGE V. T. Antagonistic activity of coconut rhizospheric and endophytic *Bacillus* spp. against *Ganoderma applanatum* and *Thielaviopsis paradoxa*. **Journal of Plantation Crops**, v.39, n.2, p.278-284, 2011.

GUPTA, R.; VAKHLU, J. Native *Bacillus amyloliquefaciens* W2 as a potential biocontrol for *Fusarium oxysporum* R1 causing corm rot of *Crocus sativus*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 143, n. 1, p. 123-131, Sep. 2015.

HAN JH, SHIM H, SHIN JH AND KIM KS. Antagonistic activities of *Bacillus* spp. strains isolated from tidal flat sediment towards anthracnose pathogens *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* in South Korea. **Plant Pathology**, v.31, p.165-175, 2015.

HOMMA, A. Agroenergia: a entrada de um novo ciclo na Amazônia. In: GOMES JUNIOR, R. A. (Ed.). Bases técnicas para a cultura da palma de óleo integrado na unidade produtiva da agricultura familiar. **Embrapa Amazônia Oriental**, v.3, p.5, 2010.

HOWELL, C.R. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. **Plant Disease**. v.1, p.87, 2003.

KARTHIKEYAN, M., RADHIKA, K., MATHIYAZHAGAN, S., BHASKARAN, R., SAMIYAPPAN, R., & VELAZHAHAN, R. Induction of phenolics and defense-related enzymes in coconut (*Cocos nucifera* L.) roots treated with biocontrol agents. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.18, n.3, p.367-377, 2006.

KAVINO, M., S. HARISH, N. KUMAR, D. SARAVANAKUMAR, AND R. SAMIYAPPAN. Induction of systemic resistance in banana (*Musa* spp.) against Banana bunchy top virus (BBTV) by combining chitin with rootcolonizing *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0. **European Journal of Plant Pathology**, v.120, p.353–362, 2008.

KUMAR P, DUBEY RC, MAHESHWARI DK) *Bacillus* strains isolated from rhizosphere showed plant growth promoting and antagonistic activity against phytopathogens. **Microbiological Research**. v.167, p.493–499, 2012.

LEVER M. A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates. **Analytical Biochemistry** v.47, p.73-279, 1972.

LORITO M, WOO SL, D'AMBROSIO M, HARMAN GE, HAYES CK, KUBICEK CP, SCALA F. Synergistic interaction between cell wall degrading enzymes and membrane affecting compounds. **Molecular Plant–Microbe Interactions**. v.9, p.206–213, 1996.

MACAGNAN, D., DA SILVA ROMEIRO, R., BARACAT-PEREIRA, M. C., LANNA-FILHO, R., BATISTA, G. S., & POMELLA, A. W. V. Atividade de enzimas associadas ao estado de indução em mudas de cacauero expostas a dois actinomicetos residentes de filoplano. **Summa Phytopathologica**, v.34,n.1, p.34-37, 2008.

MBENOUN, M., DE BEER, Z. W., WINGFIELD, M. J., WINGFIELD, B. D., & ROUX, J. Reconsidering species boundaries in the *Ceratocystis paradoxa* complex, including a new species from oil palm and cacao in Cameroon. **Mycologia**, v.106, n.4, p.757-784, 2014.

MENTEN, J. O. M. et al. Efeito de alguns fungicidas no crescimento micelial de *Macrophomina phaseolina*(Tass) Goid *in vitro*. **Fitopatologia Brasileira**, v.1, p.57-66, 1976.

MORANDI, M.A.B. E BETTIOL, W. Controle biológico de doenças de plantas no Brasil. In: BETTIOL, W. & MORANDI, M.A.B. (Eds). Controle biológico de doenças de plantas: uso e perspectivas. P.07-14, 2009.

MOTLAGH, M. R. S.; SAMIMI, Z. Evaluation of *Trichoderma* spp., as biological agents in some of plant pathogens. **Annals of Biological Research**, v.4, n.3, p. 173-179, 2013.

MURPHY, D.J. The future of oil palm as a major global crop: Opportunities and challenges. **Journal of Oil Palm Research** . v.26, n.1, p.1- 24, 2014.

OBIDZINSKI, K., R. ANDRIANI, H. KOMARUDIN, AND A. ANDRIANTO. Environmental and social impacts of oil palm plantations and their implications for biofuel production in Indonesia. **Ecology and Society**. V.17, n.1, p.25: 2012.

OLIVEIRA, J. A. Efeito do tratamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativas* L.) e pimentão (*Capsicum annanum* L.). 111 f. **Dissertação (Mestrado em Fitossanidade)** – Escola Superior de Agricultura de Lavras, 1999.

PASCHOLATI, S. F. Fisiologia do parasitismo: como as plantas se defendem dos patógenos. PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A. et al. (Ed.). **Manual de Fitopatologia** - Princípios e conceitos. **Agronômica Ceres**, p.417-454, 1995.

PASCHOLATI, S.F. Fisiologia do parasitismo: como as plantas se defendem dos patógenos . In: AMORIM, L.; REZENDE. J.A.M; BERGAMIN FILHO, A.(Ed.). **Manual de Fitopatologia** : princípios e conceitos. São Paulo: Agronômica Ceres, v.35, p.593-636, 2011.

RADJACOMMARE, R., S. VENKATESAN AND R. SAMIYAPPAN. Biological control of phytopathogenic fungi of vanilla through lytic action of *Trichoderma* species and *Pseudomonas fluorescens*. Arch. **Phytopathol and Plant. Protection.**, v.43, p.1–17, 2010.

- RAO, M. B. Tanksale, A. M.; Ghatge., M. S.; Deshpande V. V. . Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews.** v. 62, n.3, p.597-635, 1998.
- RINA SRIWATI R.; MELNICK, R.L; MUARIF, R.; STREM, SAMUELS G.J.; BRYAN A. BAILEY, B.A. *Trichoderma* from Aceh Sumatra reduce *Phytophthora* lesions on pods and cacao seedlings. **Biological Control**, v.89, p.33–41, 2015.
- ROCHA, D., E MOURA, A. Controle biológico da murcha de tomateiro causada por *Ralstonia solanacearum* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *licopersici* por rizobactérias. **Tropical Plant Pathology**, v.38, n.5, 423-430, 2013.
- RODRIGUES, A. F.; RESENDE, R. S. Silício na potencialização da resistência de plantas a patógenos. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA A PATÓGENOS, 5. Lavras. **Anais.**, p.171-180, 2010.
- RODRIGUES, F.A., JURICK, W.M., DATNOFF, L.E., JONES, J.B., ROLLINS, J.A., Silicon influences cytological and molecular events in compatible and incompatible rice-*Magnaporthe grisea* interactions, **Physiological and Molecular Plant Pathology**, p.144-159, 2005.
- ROMERO, T. Em busca de novos princípios ativos. **Boletim da Agência.** 62: 2007.
- SAKSIRIRAT, W.; CHAREERAK, P.; BUNYATRACHATA, W. Induced systemic resistance of biocontrol fungus, *Trichoderma* spp. against bacterial and gray leaf spot in tomatoes. **Asian Journal of Food and Agro-Industry.** Special Issue, 2009.
- SALLA1,T. D.; ASTARITA, L. V.; SANTARÉM, E R Defense responses in plants of Eucalyptus elicited by *Streptomyces* and challenged with *Botrytis cinérea*. **Planta** v.243, p.1055–1070, 2016.
- SANCHEZ, V.; REBOLLEDO, O.; PICASO, R. M.; CARDENAS, E.; CORDOVA, J. GONZALES, O.; SAMUELS, G. J. *In vitro* antagonism of *Thielaviopsis paradoxa* by *Trichoderma longibrachiatum*. **Mycopathologia**, v.163, p.49-58, 2007.
- SANTOS, C.C.; DE OLIVEIRA, F.A.; DOS SANTOS, M.S.; TALAMINI, V.; FERREIRA, J.M.S.; SANTOS, F.J. Influência de *Trichoderma* spp. sobre o crescimento micelial de *Thielaviopsis paradoxa*. **Scientia plena.** v8, n.4, p.047309, 2012.
- SHORESH, M.; HARMAN, G. E.; MASTOURI, F. Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. **Annual Review Phytopathology.** v.48: p.21-43, 2010.
- SILVA, H.S.A.; BETTIOL, W. Microrganismos endofíticos como agentes de biocontrole da ferrugem do cafeeiro e de promoção de crescimento. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. Biocontrole de doenças de Plantas: uso e perspectivas. Jaguariúna, Embrapa-Meio Ambiente., p. 277-287, 2009.
- SILVA, J. C. Controle biológico da resinose do coqueiro. **Tese (Doutorado em Agronomia)** Universidade Federal de Alagoas. Centro de Ciências Agrárias, 2015.

SOUZA, P. M. **Produção de proteases por fungos filamentosos isolados do cerrado do centro-oeste brasileiro.** 2015. 133 f. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

SUNDARAMOORTHY, S.; BALABASKAR, P. Biocontrol efficacy of *Trichoderma* spp. against wilt of tomato caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **Journal of Applied Biology & Biotechnology**, v.3, n.1, p.36-40, 2013.

TORRES, M.J.; PÉREZ BRANDAN C.; PETROSELLI, G.; ERRA-BALSELLS R., AUDISIO, M.C., Antagonistic effects of *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* and *B.amyloliquefaciens* against *Macrophomina phaseolina*: SEM study of fungal changes and UV-MALDI-TOF MS analysis of their bioactive compounds **Microbiological Research**. v.182, p.31–39, 2016.

TOVAR, J. Y L. NIETO. Caracterización de las principales pudriciones de estípites de la palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq), en la Zona Norte de Colombia. **Palmas**, v.19, n.2, p.45-52, 1998.

TSENG SC, LIU SY, YANG HH, LO CT, PENG KC. Proteomic study of biocontrol mechanisms of *Trichoderma harzianum* ETS 323 in response to *Rhizoctonia solani*. **J The Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, p.6914–6922, 2008.

TUZUN, S. The relationship between pathogen-induced systemic resistance (ISR) and multigenic (horizontal) resistance in plants. **European Journal of Plant Pathology**, v.107, n.1, p.85-93, 2001.

URBANEK H, KUZNIAK-GEBAROWSKA E, HERKA K. Elicitation of defense responses in bean leaves by *Botrytis cinerea* polygalacturonase. **Acta Physiologiae Plantarum**. v.13, p.43-50, 1991.

VAN LOON, L. C.; Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. **European Journal of Plant Pathology**. v.103, p.753-765, 1997.

VAN LOON, L. C.; PIERPOINT, W. S.; BOLLER, T.; CONEJERO, V. Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. **Plant molecular biology reporter**. v.12, n.3, p. 245-264, 1994.

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

VAN LOON, L.C.; VAN STRIEN, E. A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiology Molecular Plant Pathology**. v.55, p.85-97, 1999.

VINALE, F., SIVASITHAMPARAM, K., GHISALBERTI, E.L., MARRA, R., WOO, S.L. AND LORITO, M. *Trichoderma* plant pathogen interactions. **Soil Biology & Biochemistry**, v.40, p.1-10, 2008.

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

WOO, S.L., SCALA, F., RUOCCO, M. AND LORITO, M.. The molecular biology of the interactions between *Trichoderma* spp., phytopathogenic. fungi, and plants. **Phytopathology**. v.96, p.181-185, 2006.

ZIEDAN, E H. E.. FARRAG, E. F.; SAHAB, A.F. Effect of *Trichoderma harzianum* against *Thielaviopsis paradoxa* and their pathological potential on date palm seedlings. **Journal of Agricultural Technology**. v.11, n.4, p. 913-923, 2015.

#### 4. INDUTORES DE RESISTÊNCIA E NUTRIÇÃO MINERAL DA PALMA DE ÓLEO

##### RESUMO

Objetivou-se com este trabalho avaliar a eficiência de potenciais indutores de resistência e da fertilização foliar no crescimento e na nutrição mineral da palma de óleo com a capacidade de fornecer nutrientes-chave relacionados à resistência a doenças. Mudanças de palma de óleo foram cultivadas em casa de vegetação, no período entre outubro de 2014 a outubro de 2015. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com 15 tratamentos e três repetições. A unidade experimental consistiu de um vaso plástico contendo uma planta. Os tratamentos foram: Bion<sup>®</sup>, Fulland<sup>®</sup>, Reforce<sup>®</sup>, Yantra<sup>®</sup>, Vitakelp<sup>®</sup> + Stayflex<sup>®</sup>, Dephensor<sup>®</sup>, silicato de cálcio, silicato de sódio, quatro tipos de fertilização foliar (A, B, C e D) e três tratamentos controle. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Os tratamentos que proporcionaram maior matéria seca de parte aérea em palma de óleo foram Fulland<sup>®</sup>, fertilização foliar D (6% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> e 15% K<sub>2</sub>O), silicato de cálcio e silicato de sódio. A correção da acidez do solo com corretivo contendo alto teor de magnésio melhorou a nutrição da palma de óleo em cálcio e magnésio. Os indutores de resistência, principalmente os que são fontes de nutrientes, e a fertilização foliar apresentam o potencial de melhorar o crescimento e a nutrição mineral da palma de óleo em nutrientes-chave ligados à resistência de plantas a doenças.

**Palavras-chave:** Indução de resistência, Controle cultural, *Elaeis* spp., Adubação.

## ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the efficiency of potential inducers of resistance and mineral nutrition in the growth in the capacity to provide key nutrients related to resistance to diseases. Oil palm seedlings were grown in a greenhouse between October 2014 and October 2015. The experimental design was a completely randomized design with 15 treatments and three replicates. The experimental unit consisted of a plastic vessel containing a plant. The treatments were: Bion®, Fulland®, Reforce®, Yantra®, Vitakelp® + Stayflex®, Dephensor®, calcium silicate, sodium silicate, four types of foliar fertilization (A, B, C and D) and three treatments control. Data were submitted to analysis of variance and means were compared by the Scott-Knott test at 5% probability. The treatments that provided the highest dry matter of the oil palm were Fulland®, foliar fertilization D (6% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> and 15% K<sub>2</sub>O), calcium silicate and sodium silicate. Correction of soil acidity with a high magnesium content corrector improved the oil palm nutrition in calcium and magnesium. Resistance inducers, especially nutrient sources, and foliar fertilization have the potential to enhance the growth and mineral nutrition of oil palm in key nutrients linked to plant resistance to disease.

**Key words:** Induction of resistance, Nutrient, *Elaeis* spp.

## 4.1 INTRODUÇÃO

A palma de óleo ou dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) é uma das culturas oleaginosas mais importantes no mundo, por apresentar amplos usos nas indústrias de alimentos, farmacêutica, química e produção de biodiesel (CORLEY & TINKER, 2003; MURPHY, 2014). A Indonésia e a Malásia são os principais produtores, compreendendo 85% de toda produção mundial (MURPHY, 2014; OBIDZINSKI et al., 2012). A produção mundial estimada em aproximadamente 275 milhões de toneladas, distribuída entre os continentes Asiático (87,44%), Africano (5,84%), Americano (5,84%) e Oceania (0,87%) (FAO, 2014).

O Brasil é o décimo maior produtor do mundo, com produção estimada em 1.393.873 de toneladas (FAO, 2014), sendo o estado do Pará o maior produtor nacional de óleo de palma, com produção média anual de 770 mil toneladas por ano e uma área plantada de aproximadamente 180 mil hectares, respondendo por 83% da safra nacional (IBGE, 2015).

No entanto, a franca expansão do cultivo da palma de óleo pode propiciar ambiente favorável à incidência de doenças. Diversas doenças de etiologia fúngica têm sido relatadas em plantios: manchas foliares, causadas por fungos do gênero *Pestalotiopsis*, *Colletotrichum* e *Lasiodioplotia*; podridões causadas por fungos do gênero *Thielaviopsis* e murchas pelo gênero *Fusarium*, *Cercospora*. (CARVALHO et al., 2011; CARVALHO & SANTOS, 2013). As doenças têm se tornado uma ameaça ao cultivo da palma de óleo devido à severidade, ausência de estudos epidemiológicos aprofundados e carência de ferramentas eficazes para o manejo, seja para o controle químico, controle biológico, ou mesmo controle cultural.

Assim sendo, o controle de doenças torna-se difícil, devido a inúmeros fatores, entre os quais se destacam condições ambientais favoráveis a rápida multiplicação e disseminação de patógenos a inexistência de produtos fitossanitários registrado no MAPA (AGROFIT, 2017). Desta forma, para obter produção sustentável da palma de óleo, são necessárias medidas como o controle cultural com a correção do solo e o suprimento nutricional, pelo princípio da modificação do ambiente, o que possibilitaria condições favoráveis ao desenvolvimento da planta hospedeira e conseqüentemente redução de danos. Neste mesmo sentido, disto, a indução de resistência inserida no manejo integrado, pode ativar mecanismos de defesa na palma de óleo e reduzir potencialmente os prejuízos decorrentes de doenças.

A planta possui ampla gama de estratégias de defesa que servem para prevenir a infecção por patógenos. A resistência contra patógenos é realizada por sistemas de defesa que incluem barreiras pré-existentes (constitutivos) e induzidos (PASCHOLATTI & LEITE, 1995). As respostas de defesa induzidas são ativadas após o reconhecimento de indutores de resistência que podem ter origem abiótica ou abiótica (DURRANT & DONG, 2004; VAN

LOON et al., 2006). Indutores abióticos de origens químicas são capazes de ativar mecanismos latentes de defesa das plantas, desencadeando respostas bioquímicas responsáveis pela proteção contra patógenos (BOLLER & FELIX, 2009). O acibenzolar-S-metil (ASM), análogo funcional do ácido salicílico, é o único produto registrado no Brasil, na classe no ativador de plantas, é o Bion® (Syngenta Proteção de Cultivos S,A), liberado para uso comercial nas culturas do algodão, batata, cacau, feijão, citros, melão e tomate (AGROFIT, 2017). O ASM pode atuar nas plantas ativando genes de defesa que codificam proteínas PR e enzimas relacionadas com a produção de fitoalexinas e lignina (COLE, 1999; RESENDE et al., 2000). Dentre os novos produtos, considerados como potenciais indutores de resistência, muitos também fornecem nutrientes para as plantas como os fosfitos e o silício presente nos silicatos. O silício, elemento benéfico, é estudado quanto à capacidade de induzir resistência às plantas. Além dos efeitos de nutrição e nos processos fisiológicos das plantas, o silício pode ter papel ativo na resistência das plantas contra patógenos, devido à produção de compostos secundários, como polifenóis, e fitoalexinas, que podem agir como substâncias inibidoras do patógeno (CHÉRIF et al., 1992) e formação de barreiras físicas, impedindo a penetração de fungos pela deposição da lignina (CHÉRIF et al., 1992; CHÉRIF et al., 1994). O fosfito, outro elemento importante na resistência às plantas contra patógenos, quando aplicado nas plantas, estas apresentam melhor assimilação na presença de fósforo e potássio, tornando-a capaz de ativar mecanismos de defesa e produzir fitoalexinas, substâncias naturais de autodefesa que conferem resistência contra fitopatógenos (DALIO et al., 2012; NOJOSA et al., 2005).

A resistência das plantas também pode se induzida por nutrição mineral. De modo geral, a importância dos nutrientes se deve às alterações no padrão de crescimento, morfologia e anatomia ou composição química das plantas, que podem aumentar ou diminuir a resistência ou tolerância das plantas a patógenos (HUBER et al., 2012). O fornecimento de nutrientes altera a resistência das plantas a patógenos, em função de alteração no crescimento e da composição do tecido vegetal, como, por exemplo, de compostos solúveis ou de defesa (MARSCHNER, 1995; HUBER et al., 2012). A resistência pode ser conferida devido a modificações anatômicas, como espessamento das células da epiderme, lignificação, e ainda atuar nas propriedades fisiológicas e bioquímicas, pela produção de compostos secundários, fitoalexinas (ZAMBOLIM & VENTURA, 1993; HUBER et al., 2012; ZAMBOLIM et al., 2012). Dessa forma, a nutrição equilibrada é um fator importante na resistência de plantas, tornando-se as plantas mais tolerantes às doenças, enquanto que plantas em condições de estresse nutricional são mais suscetíveis (ZAMBOLIM et al., 2012). Vários trabalhos

mostraram a influência dos nutrientes no manejo de doenças das plantas (CATARINO et al., 2016; DOWNER et al., 2013; FREITAS, et al., 2016; MOHAMED et al., 2014).

Embora sejam escassas as pesquisas acerca de indutores de resistência e da nutrição mineral relacionadas com a resistência de doenças da palma de óleo, existe um vasto potencial de melhorar o estado fitossanitário desta cultura por meio de manejo nutricional equilibrado, pois, geralmente, a palma de óleo é cultivada em solos de baixa fertilidade (MUNÉVAR, 2004). Neste sentido, realizou-se o presente trabalho visando avaliar a eficiência de indutores de resistência e da nutrição mineral no crescimento e na capacidade de fornecer nutrientes-chave relacionados à resistência a doenças.

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

### ▪ Local do estudo e características do solo

O experimento foi conduzido em casa de vegetação da Embrapa Amazônia Oriental, Belém, Pará. A temperatura média da casa de vegetação de 28 °C e a umidade relativa do ar média de 95%. Mudas de palma de óleo foram cultivadas, no período entre outubro de 2014 a outubro de 2015, em vasos plásticos preenchidos com 6 dm<sup>3</sup> de amostras da camada superficial (0 a 0,2 m) de um Argissolo Amarelo distrófico (Embrapa, 2013) proveniente do município de Belém, PA.

Antes da instalação do experimento o solo apresentou as seguintes características: pH H<sub>2</sub>O = 4,7; MO = 25 g dm<sup>-3</sup>; P Mehlich-1 = 6 mg dm<sup>-3</sup>; P-remanescente = 29 mg L<sup>-1</sup>; K = 0,05 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; Ca = 0,3 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; Mg = 0,1 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; Al = 1,2 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; H + Al = 7,0 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; CTC = 7,5 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; SB = 0,45 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; m = 72%, V = 6%; argila = 140 g kg<sup>-1</sup>; silte = 30 g kg<sup>-1</sup> e areia = 830 g kg<sup>-1</sup>.

### ▪ Delineamento experimental e tratamentos

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado (DIC), com 15 tratamentos (Tabela 4) e três repetições. A unidade experimental consistiu de um vaso plástico contendo uma planta. Um tratamento sem calagem e sem adubação foi avaliado como controle absoluto. No tratamento controle A, realizou-se somente a aplicação de P antes do transplante das mudas, prática esta comumente adotada pelos produtores de palma de óleo. O controle B consistiu da calagem e adubação fosfatada em pré-plantio e foi utilizado em todos os demais tratamentos com a aplicação dos indutores de resistência.

**Tabela 4.** Tratamentos avaliados no experimento.

Tratamentos	Teores de nutrientes e Si	Local de aplicação
Controle absoluto	---	---
Controle A (fósforo)	---	Solo
Controle B (calcário + fósforo)	---	Solo
Controle B + Bion <sup>®</sup>	---	Foliar
Controle B + Fulland <sup>®</sup>	20% P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> , 1,75% S e 3,5% Cu	Foliar
Controle B + fertilização foliar A	20% P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> , 1,75% S e 3,5% Cu	Foliar
Controle B + Reforce <sup>®</sup>	26% de P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> e 19% de K <sub>2</sub> O	Foliar
Controle B + Yantra <sup>®</sup>	33,6% de P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> e 29% de K <sub>2</sub> O	Foliar
Controle B + fertilização foliar B	33,6% de P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> e 29% de K <sub>2</sub> O	Foliar
Controle B + Vitakelp <sup>®</sup> + Stayflex <sup>®</sup>	15% de N, 1% K <sub>2</sub> O e 1% B	Foliar
Controle B + fertilização foliar C	15% de N, 1% K <sub>2</sub> O e 1% B	Foliar
Controle B + Dephensor <sup>®</sup>	6% P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> , 15% K <sub>2</sub> O e 5% Si	Foliar
Controle B + fertilização foliar D	6% P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> e 15% K <sub>2</sub> O	Foliar
Controle B + Silicato de cálcio	24% Si	Solo
Controle B + Silicato de sódio	23% Si	Solo

Fonte: O Autor

Os silicatos de cálcio e sódio foram aplicados e misturados ao solo no mesmo período da calagem, na dose de 750 mg dm<sup>-3</sup> de Si (equivalente a 250 kg ha<sup>-1</sup> de Si).

#### ▪ Fertilização do solo

A acidez do solo foi corrigida pela aplicação de uma mistura de carbonatos de cálcio (60%) e de magnésio (40%), em dose suficiente para aumentar a saturação por bases do solo a 50%. Após a calagem, as amostras de solo foram incubadas durante 30 dias, mantendo-se umidade em aproximadamente 70% da máxima capacidade de retenção de água. Após esse período de incubação, aplicou-se o fosfato monocálcico na dose de 100 mg dm<sup>-3</sup> de P. Posteriormente, as mudas foram transplantadas para os vasos e realizou-se a seguinte adubação em todos os tratamentos, exceto no controle absoluto: 50 mg dm<sup>-3</sup> de N como sulfato de amônio, 50 mg dm<sup>-3</sup> de K como cloreto de potássio, 0,5 mg dm<sup>-3</sup> de B como bórax, 1,5 mg dm<sup>-3</sup> de Cu como sulfato de cobre, 2 mg dm<sup>-3</sup> de Mn como sulfato de manganês e 3 mg dm<sup>-3</sup> de Zn como sulfato de zinco. Durante o período de condução do experimento, as plantas foram irrigadas diariamente com água destilada.

- **Fertilização foliar dos tratamentos**

A aplicação dos tratamentos iniciou-se 30 dias após o transplântio das mudas, sendo realizadas quatro aplicações de cada tratamento, em intervalos de 14 dias. As aplicações foram realizadas via foliar, até o ponto de escoamento da solução, utilizando-se um mini-pulverizador manual. As pulverizações de todos os tratamentos foram realizadas utilizando como solvente água destilada. Nos tratamentos controle, foi utilizada apenas água destilada nas pulverizações das plantas.

- **Avaliações de desenvolvimento das plantas e do estado nutricional**

Os parâmetros de desenvolvimento vegetativo das mudas de palma de óleo avaliados foram: altura da planta, diâmetro do coleto e número de folhas por planta. A parte aérea das mudas foi cortada rente ao solo e posteriormente as raízes foram separadas do solo. As amostras foram lavadas, inicialmente com água de torneira, seguida por solução de detergente neutro (0,1%), solução de HCl (3%) e finalmente com água destilada. Posteriormente, as amostras de plantas foram secas em estufa a 65 °C com circulação de ar até obtenção de massa constante, pesadas para determinação da massa de matéria seca da parte aérea (MSPA), de raiz (MSR) e total (MST = MSPA + MSR). As amostras da parte aérea foram moídas em moinho tipo Willey e analisadas em laboratório para a determinação dos teores de N, P, K, Ca, Mg e S, conforme metodologias descritas em EMBRAPA (2009).

**Figura 15.** Tratamentos em casa de vegetação.



Fonte: O Autor

#### ▪ **Análises estatísticas**

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância. As médias dos parâmetros de desenvolvimento vegetativo e do estado nutricional das plantas foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade no programa Sisvar®.

### **4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### ▪ **Desenvolvimento vegetativo da palma de óleo**

Houve diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos para a matéria seca de parte aérea (MSPA) de mudas de palma de óleo (Tabela 5). Os tratamentos que proporcionaram maior MSPA foram Fulland®, fertilização foliar D, silicato de cálcio e silicato de sódio. O tratamento controle absoluto, em que não houve aplicação de corretivos de acidez do solo ( $\text{CaCO}_3$  e  $\text{MgCO}_3$ ) e nutrientes, apresentou a menor produção de MSPA, evidenciando a baixa disponibilidade de nutrientes no solo utilizado no experimento.

O incremento na MSPA, induzido pelo tratamento com fertilização foliar D e Fulland<sup>®</sup>, apresenta correlação com a disponibilidade do fósforo (P) e potássio (K), presente na composição química desses produtos, respectivamente. Inúmeros processos energéticos nas plantas como a translocação de açúcares de tecidos fonte para os drenos, crescimento, bem como a absorção de nutrientes minerais, são altamente dependentes de adenosina trifosfato - ATP (TAIZ & ZEIGER, 2013). Sendo o fósforo, um componente dessa molécula, acredita-se, em partes, ter contribuído para o crescimento da parte aérea de plantas de palma de óleo, determinando incrementos positivos na MSPA.

Processos osmóticos nas plantas são altamente dependentes de potássio, o qual está envolvido na regulação estomática, bem como na ativação de enzimas fundamentais ao processo fotossintético, como a Ribulose 1,5 bifosfato carboxilase oxigenase, requerida para a assimilação de CO<sub>2</sub> via ciclo de Calvin, determinando a maior produção de carboidratos. Além disso, o K induz a translocação de fotossintetatos recém-produzidos e participa na mobilização do material estocado. Desse modo, sugere-se, a partir dos resultados encontrados nessa pesquisa, que esse nutriente tenha provido a regulação desses processos condizentes com a necessidade metabólica das plantas de palma de óleo correlacionadas ao crescimento.

Estudos realizados com outras culturas mostram resultados semelhantes. Schumacher et al. (2004) verificaram influência positiva da utilização do fósforo no crescimento das mudas de *Parapiptadenia rigida*. Do mesmo modo, a produção de matéria seca da parte aérea das plantas de milho aumentou com o incremento das doses de fósforo, independentemente da fonte de P considerada (HARGER et al., 2007).

De modo similar, os tratamentos silicato de cálcio e silicato de sódio induziram aumentos na MSPA. O silício aparece como um elemento benéfico às plantas e se mostra envolvido em respostas osmóticas havendo inúmeras evidências de que esse elemento influencia o acúmulo de solutos orgânicos o que parece ter correlação positiva com o aumento da MSPA, na cultura em estudo.

Não houve diferenças significativas entre os tratamentos para a matéria seca do sistema radicular (MSR), a altura da planta e o número de folhas das mudas de palma de óleo (Tabela 5). Pesquisas têm demonstrado que plantas de abacaxizeiro e de bananeiras tratadas com fontes silicatadas de cálcio e de sódio não apresentaram diferença significativa na matéria seca total (parte aérea + raiz) e no diâmetro do coleto, diferindo apenas do tratamento controle absoluto, o que corrobora com os resultados observados nesse trabalho (BREGONCI et al., 2008; ASMAR, et al., 2011). Considera-se que, possivelmente, houve uma maior absorção de (Ca<sup>2+</sup> e Na<sup>+</sup>) pelas raízes, e posterior translocação para a parte aérea, o que pode

ter contribuído para as baixas concentrações de silício nas raízes, justificando desse modo o menor incremento na MSR, em plantas de palma de óleo. Portanto, a MSPA foi a variável que mais discriminou o efeito dos tratamentos avaliados.

**Tabela 5.** Matéria seca de parte aérea (MSPA), de raiz (MSR) e total (MST) e parâmetros de desenvolvimento vegetativo de mudas de palma de óleo.

Tratamentos	MSPA	MSR	MST	Altura da planta	Diâmetro do coleto	Número de folhas por planta
	g/planta			cm		
Controle absoluto	21,7 c	16,2 a	37,9 b	51,4 b	27,6 b	10,3 a
Controle A (fósforo)	47,9 b	28,8 a	80,5 a	77,3 a	41,7 a	13,3 a
Controle B (calcário + fósforo)	50,8 b	32,6 a	79,6 a	77,3 a	42,2 a	13,0 a
Controle B + Bion <sup>®</sup>	44,3 b	28,5 a	72,8 a	75,7 a	42,5 a	11,7 a
Controle B + Fulland <sup>®</sup>	58,6 a	39,8 a	98,4 a	78,0 a	45,4 a	13,0 a
Controle B + fertilização foliar A	51,1 b	32,3 a	83,4 a	73,3 a	40,6 a	12,7 a
Controle B + Reforce <sup>®</sup>	46,8 b	30,4 a	77,1 a	74,7 a	42,5 a	12,3 a
Controle B + Yantra <sup>®</sup>	50,7 b	41,1 a	91,8 a	76,7 a	42,4 a	12,0 a
Controle B + fertilização foliar B	50,3 b	33,0 a	83,3 a	77,3 a	42,1 a	12,3 a
Controle B + Vitakelp <sup>®</sup> + Stayflex <sup>®</sup>	46,2 b	36,7 a	82,9 a	78,0 a	41,8 a	12,7 a
Controle B + fertilização foliar C	52,4 b	32,8 a	85,2 a	78,5 a	41,4 a	12,3 a
Controle B + Dephensor <sup>®</sup>	50,1 b	36,2 a	86,3 a	73,1 a	42,1 a	12,3 a
Controle B + fertilização foliar D	59,4 a	30,9 a	90,3 a	80,7 a	43,8 a	13,3 a
Controle B + Silicato de cálcio	60,6 a	35,9 a	96,5 a	82,7 a	43,3 a	14,0 a
Controle B + Silicato de sódio	56,4 a	30,0 a	86,4 a	75,5 a	43,0 a	13,3 a
CV (%)	12,8	17,5	11,2	7,2	7,1	6,7
Significância	*	Ns	*	*	*	ns

Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si pelo teste Skott-Knott a 5% de significância.

Fertilização foliar A: solução contendo 20% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 1,75% S e 3,5% Cu em água destilada. Fertilização foliar B: solução contendo 33,6% de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> e 29% de K<sub>2</sub>O em água destilada. Fertilização foliar C: solução contendo 15% de N, 1% K<sub>2</sub>O e 1% B em água destilada. Fertilização foliar D: solução contendo 6% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> e 15% K<sub>2</sub>O em água destilada.

#### ▪ Estado nutricional da palma de óleo

Não houve diferença significativa no teor de N na parte aérea das plantas (Tabela 6). O acúmulo de N na parte aérea não diferiu estatisticamente entre os tratamentos, com exceção do controle absoluto (Tabela 7). Possivelmente, a dose de N fornecida via adubação nitrogenada no solo foi suficiente para atender a demanda deste nutriente da planta.

O N é o nutriente mineral exigido em maiores quantidades pelas plantas (aproximadamente 1 a 5% da massa seca) e é constituinte de proteínas, aminoácidos, ácidos nucleicos, nucleotídeos, clorofila, coenzimas, fitohormônios e metabólitos secundários (HAWKESFORD et al., 2012). De modo geral, a adubação nitrogenada pode influenciar a severidade de doenças fúngicas causadas por patógenos biotróficos, como ferrugens e míldios pulverulentos, e outras causadas por bactérias que atacam as folhas e hastes de plantas herbáceas, pois pode influenciar a germinação, a sobrevivência, a reprodução, o crescimento e a virulência do patógeno (ZAMBOLIM & VENTURA, 2012). Por outro lado, Malavolta (2006), considera tanto as formas como esse nutriente é disponibilizado, quanto a sua concentração como determinantes para a severidade de doenças ou a suscetibilidade do hospedeiro à microorganismos patogênicos. Para esse autor, o excesso de nitrogênio, sobre tudo quando disponibilizado na forma N-amoniacal, e não na forma nítrica, aumenta o teor de substâncias solúveis, principalmente, aminoácidos livres, nos vacúolos celulares. Esses compostos, dificultam a síntese protéica e tornam as plantas mais sensíveis à patógenos e à insetos praga (ZAMBOLIM & VENTURA, 2012).

**Tabela 6.** Teor de macronutrientes na parte aérea de mudas de palma de óleo.

Tratamentos	N	P	K	Ca	Mg	S
	g kg <sup>-1</sup>					
C	11,1 a	1,4 b	3,0 b	4,0 c	1,6 a	1,1 a
Controle A (fósforo)	9,3 a	1,3 b	4,4 b	5,0 b	0,9 b	0,9 b
Controle B (calcário + fósforo)	9,0 a	1,2 b	4,5 b	6,3 a	1,7 a	0,8 b
Controle B + Bion <sup>®</sup>	9,5 a	1,3 b	3,8 b	6,9 a	1,8 a	1,1 a
Controle B + Fulland <sup>®</sup>	9,5 a	1,7 a	3,4 b	7,0 a	1,8 a	1,2 a
Controle B + fertilização foliar A	8,6 a	1,7 a	4,0 b	7,1 a	2,0 a	1,1 a
Controle B + Reforce <sup>®</sup>	9,5 a	1,5 b	6,4 a	7,0 a	1,9 a	1,1 a
Controle B + Yantra <sup>®</sup>	8,0 a	1,4 b	6,2 a	6,1 a	1,7 a	0,8 b
Controle B + fertilização foliar B	8,9 a	1,7 a	5,7 a	7,3 a	1,9 a	0,9 b
Controle B + Vitakelp <sup>®</sup> + Stayflex <sup>®</sup>	9,5 a	1,4 b	4,3 b	6,7 a	1,7 a	1,0 b
Controle B + fertilização foliar C	8,9 a	1,3 b	4,0 b	6,3 a	1,8 a	0,9 b
Controle B + Dephensor <sup>®</sup>	8,8 a	1,4 b	6,5 a	6,5 a	1,8 a	1,1 a
Controle B + fertilização foliar D	8,9 a	1,2 b	5,5 a	6,5 a	1,7 a	0,9 b
Controle B + Silicato de cálcio	8,8 a	1,2 b	3,7 b	6,1 a	1,8 a	1,0 b
Controle B + Silicato de sódio	9,3 a	1,3 b	5,0 a	5,6 b	1,7 a	1,1 a
CV (%)	12,7	13,5	18,2	9,6	9,5	11,2
Significância	Ns	*	*	*	*	*

Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si pelo teste Skott-Knott a 5% de significância.

Fertilização foliar A: solução contendo 20% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 1,75% S e 3,5% Cu em água destilada. Fertilização foliar B: solução contendo 33,6% de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> e 29% de K<sub>2</sub>O em água destilada. Fertilização foliar C: solução contendo 15% de N, 1% K<sub>2</sub>O e 1% B em água destilada. Fertilização foliar D: solução contendo 6% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> e 15% K<sub>2</sub>O em água destilada.

Os maiores teores de P na MSPA foram observados nas plantas que receberam os fertilizantes foliares Fulland<sup>®</sup>, fertilização foliar A e fertilização foliar B, todos esses tratamentos apresentavam P em sua composição (Tabela 6).. A aplicação de Fulland<sup>®</sup> resultou em maior acúmulo de P na MSPA (Tabela 7). Este fertilizante foliar foi capaz de fornecer P as plantas em quantidade superior à dos demais tratamentos. Por outro lado, o menor acúmulo de P na planta foi observado no tratamento Controle Absoluto, em que não se realizou a calagem e adubação, evidenciando o baixo teor disponível deste nutriente no solo utilizado no experimento.

O P é componente de moléculas como DNA, RNA e fosfolipídeos das membranas e atua na transferência de energia (ATP) nas plantas, participa de reações redox celulares e, na ativação enzimática (HAWKESFORD et al., 2012; TAIZ & ZEIGER, 2013).

Diversos trabalhos têm demonstrado que, de modo geral, a nutrição adequada em P favorece a resistência das plantas às doenças por aumentar o balanço interno de nutrientes ou por acelerar a maturação da cultura, auxiliando a planta a escapar da infecção por patógenos, que tem preferência por tecidos jovens (ZAMBOLIM & VENTURA, 2012).

**Tabela 7.** Acúmulo de macronutrientes na parte aérea de mudas de palma de óleo.

Tratamentos	N	P	K	Ca	Mg	S
	mg/planta					
Controle absoluto	222,8 b	31,7 d	52,1 c	97,6 c	33,9 c	22,6 d
Controle A (fósforo)	442,5 a	64,3 c	212,6 b	240,8 b	44,0 c	42,0 c
Controle B (calcário + fósforo)	452,7 a	58,7 c	224,4 b	317,4 b	86,5 b	42,6 c
Controle B + Bion <sup>®</sup>	420,2 a	58,3 c	164,8 b	306,6 b	78,7 b	48,1 c
Controle B + Fulland <sup>®</sup>	551,5 a	102,0 a	198,1 b	405,0 a	105,4 a	70,9 a
Controle B + fertilização foliar A	435,6 a	85,3 b	197,9 b	358,8 a	98,9 a	55,7 b
Controle B + Reforce <sup>®</sup>	439,1 a	69,0 c	298,8 a	324,7 b	90,8 b	51,4 b
Controle B + Yantra <sup>®</sup>	407,5 a	70,5 c	312,0 a	307,4 b	86,9 b	43,4 c
Controle B + fertilização foliar B	450,4 a	84,7 b	287,2 a	366,6 a	95,2 a	46,1 c
Controle B + Vitakelp <sup>®</sup> + Stayflex <sup>®</sup>	443,1 a	63,5 c	199,0 b	311,9 b	77,8 b	44,0 c
Controle B + fertilização foliar C	463,1 a	64,9 c	202,9 b	331,3 b	90,5 b	49,6 c
Controle B + Dephensor <sup>®</sup>	442,7 a	68,2 c	324,1 a	323,7 b	90,9 b	54,3 b
Controle B + fertilização foliar D	533,3 a	73,1 b	326,1 a	385,4 a	101,8 a	54,0 b
Controle B + Silicato de cálcio	529,7 a	74,9 b	226,1 b	367,2 a	111,0 a	60,0 b
Controle B + Silicato de sódio	520,4 a	76,5 b	279,6 a	312,2 b	95,2 a	59,8 b
CV (%)	15,6	15,4	13,5	13,8	11,2	13,5
Significância	*	*	*	*	*	*

Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si pelo teste Skott-Knott a 5% de significância.

Fertilização foliar A: solução contendo 20% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 1,75% S e 3,5% Cu em água destilada. Fertilização foliar B: solução contendo 33,6% de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> e 29% de K<sub>2</sub>O em água destilada. Fertilização foliar C: solução contendo 15% de N, 1% K<sub>2</sub>O e 1% B em água destilada. Fertilização foliar D: solução contendo 6% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> e 15% K<sub>2</sub>O em água destilada.

A aplicação foliar de Reforce<sup>®</sup>, Yantra<sup>®</sup>, fertilização foliar B, Dephensor<sup>®</sup> e fertilização foliar D, que são fontes de K para as plantas, e de silicato de Na no solo, aumentou o teor de K na MSPA (Tabela 6). O maior acúmulo de K nas plantas foi verificado após a aplicação foliar dos tratamentos Reforce<sup>®</sup>, Yantra<sup>®</sup>, fertilização foliar B, Dephensor<sup>®</sup> e fertilização foliar D (Tabela 7). Todos esses fertilizantes foliares apresentavam K em sua composição, sendo, portanto, fonte deste nutriente para a palma de óleo.

A aplicação de silicato de Na no solo elevou o acúmulo de K na MSPA. O K, embora seja o cátion mais abundante nas plantas, não é constituinte de qualquer molécula orgânica. Este nutriente é ativador de mais de 60 sistemas enzimáticos, e participa da translocação e do armazenamento de fotoassimilados e da manutenção do potencial osmótico da planta (EPSTEIN & BLOOM, 2006; HAWKESFORD et al., 2012). Embora a resistência de plantas a doença seja uma característica controlada geneticamente, a nutrição equilibrada pode induzir os mecanismos de resistência (ZAMBOLIM & VENTURA, 2012). Esses mesmos autores relataram que o K é o nutriente, comumente, mais associado com a redução de severidade de doenças de planta, possivelmente por promover o espessamento da parede celular, o que reduz a suscetibilidade dos tecidos vegetais a maceração e penetração do patógeno.

A suscetibilidade às doenças de plantas deficientes de potássio está relacionada com a menor síntese de compostos de alto peso molecular (proteínas, amido e celulose), favorecendo o acúmulo de açúcares solúveis, ácidos orgânicos, aminoácidos e nitrato, propiciando dessa forma, o desenvolvimento de doenças (ADEBITAN, 1998; MARSCHNER, 2012). A deficiência de potássio tem sido associada à ocorrência de diversas doenças da palma de óleo, como a murcha-vascular, mancha foliar de cercospora e Podridão basal por *Ganoderma* (RANKINE & FAIRHURST, 1999). O desequilíbrio nutricional aumenta a severidade da seca da folha (*Pestalotiopsis*) em palma de óleo, principalmente quando há teores altos de N no tecido foliar e deficiência de K (MOTTA et al., 2004).

Outras relações entre nutrição e doenças da palma de óleo foram reportadas. A incidência de murcha vascular (*Fusarium oxysporum* f. sp. *elaeidis*) foi associada à nutrição potássica (RENARD & RAVISÉ, 1986; RENARD & DE FRANQUEVILLE, 1989; NTSOMBOH et al., 2012). A incidência de manchas foliares (*Pestalotiopsis*) podem estar relacionadas com a deficiência de Mg (MUNÉVAR, 2004).

Não houve diferença significativa nos teores de Ca e Mg na MSPA entre o Controle B e os indutores de resistência aplicados via adubação foliar (Tabela 6). A aplicação de corretivos de acidez do solo ( $\text{CaCO}_3$  e  $\text{MgCO}_3$ ), no tratamento Controle B, aumentou os teores de Ca e Mg na planta em comparação ao tratamento Controle A. Este resultado ressalta a importância da calagem, principalmente com calcário com alto teor de Mg, na nutrição da palma de óleo. As aplicações foliares dos tratamentos Fulland<sup>®</sup>, fertilização foliar A, fertilização foliar B e fertilização foliar D, e de silicato de Ca no solo aumentaram o teor de Ca nas plantas (Tabela 7).

Os valores de máximo acúmulo de Mg na parte aérea das mudas de palma de óleo foram observados após a aplicação foliar de Fulland<sup>®</sup>, fertilização foliar A, fertilização foliar B e fertilização foliar D, e de silicato de Ca e de Na no solo (Tabela 7). Estudos comprovaram a menor incidência de doenças em virtude de adequada nutrição mineral da planta em outros patossistemas. A incidência de Cercosporiose (*Cercospora coffeicola*) em plantas de café (GARCIA JUNIOR et al., 2003) e a severidade de ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*) da soja (BALARDIN et al., 2006) foram reduzidas com doses crescentes de K e Ca..

O Ca é componente da parede celular e é essencial para a manutenção da integridade da membrana plasmática das células vegetais (EPSTEIN & BLOOM, 2006; HAWKESFORD et al., 2012). Existem vários mecanismos de defesa das plantas que envolvem a ação do Ca, tais como: formação de pectato de Ca na parede celular, inibição da atividade da poligalacturonase e de toxinas fúngicas, neutralização do ácido oxálico secretado pelo patógeno e atuação como mensageiro secundário na regulação da síntese de fitoalexinas (ZAMBOLIM & VENTURA, 2012).

O conteúdo ( $\text{Ca}^{2+}$ ) nos tecidos das plantas afeta a incidência de doenças parasíticas de duas formas: na primeira, quando os níveis de cálcio são baixos, o efluxo de compostos de baixo peso molecular (açúcares) do citoplasma para o apoplasto é aumentado; e, na segunda forma, quando poligalacturonatos e cálcio são requeridos na lamela média, para que haja estabilidade da parede celular. Muitos agentes fitopatogênicos alcançam o tecido da planta pela produção de enzimas pectolíticas extracelulares, como a galacturonase, que dissolvem a lamela média (MCGUIRE & KELMAN, 1986). A atividade da enzima a galacturonase é drasticamente inibida pela presença do cálcio (MARSCHNER, 1995).

Em comparação ao tratamento Controle B, o teor de S na MSPA foi maior após a aplicação de Bion<sup>®</sup>, Fulland<sup>®</sup>, fertilização foliar A, Reforce<sup>®</sup> e Dephensor<sup>®</sup> (Tabela 6).

Semelhante ao observado com P, a aplicação de Fulland<sup>®</sup> proporcionou o maior acúmulo de S na parte aérea das plantas. Este fertilizante foliar foi o único que apresentava S em sua composição. O S na planta é constituinte dos aminoácidos cisteína e metionina (EPSTEIN & BLOOM, 2006; HAWKESFORD et al., 2012). O efeito do S no controle de doenças de plantas está relacionado à inibição da respiração celular na mitocôndria, por meio de seus produtos de reação, como sulfito de hidrogênio, e pelo bloqueio da formação de ATP na cadeia de transporte de elétrons e à interferência na síntese de proteínas e formação de quelatos com metais pesados na célula do fungo (ZAMBOLIM & VENTURA, 2012).

O principal fator a ser levado em consideração, entretanto, é a ação conjunta de todos os nutrientes, impossibilitando o desenvolvimento do patógeno. Pesquisas adicionais devem esclarecer se os indutores de resistência e os tratamentos com a fertilização foliar estudados neste trabalho poderá alterar as atividades das enzimas envolvidas no metabolismo defesa da palma de óleo e o respectivo efeito na severidade ou incidência da podridão basal (*Thielaviopsis ethacetica*).

**Tabela 8.** Teor e acúmulo de silício na parte aérea de mudas de palma de óleo.

Tratamentos	Si	
	mg kg <sup>-1</sup>	mg/planta
Controle absoluto	97,1	2,6
Controle A (fósforo)	179,3	8,6
Controle B (calcário + fósforo)	179,3	9,1
Controle B + Silicato de cálcio	104,8	6,3
Controle B + Silicato de sódio	138,2	8,0
CV (%)	47,2	52,5
Significância	ns	ns

Já é bem recorrente na literatura os efeitos benéficos do silício na redução de estresses bióticos, atuando na resistência ao ataque de agentes patogênicos às plantas como nematóides, bactérias e fungos (MA; YAMAJI, 2008; GUNTZER et al., 2012; THILAGAM, 2014). Em pesquisa realizada com a cultura do feijão (*Phaseolus vulgaris*), Polanco et al. (2014) comprovaram que a aplicação foliar de silicato de potássio, reduziu em 34,5% a área abaixo da curva de progresso (AACPD) da antracnose, e concluíram que o tratamento resultou,

possivelmente, na formação de uma barreira física, como resultado da deposição de sílica no tecido foliar.

Os nutrientes podem influenciar, sobretudo, os seguintes mecanismos de resistência primária das plantas às doenças: (i) formação de barreiras mecânicas, por exemplo, a espessura da parede celular; (ii) síntese de compostos de defesa, como antioxidantes, flavonóides, fitoalexinas e compostos secundários (ZAMBOLIM e VENTURA, 2012).

#### **4.4 CONCLUSÃO**

Os indutores de resistência, principalmente os que são fontes de nutrientes, e a fertilização foliar apresentam o potencial de melhorar o crescimento e a nutrição mineral da palma de óleo em nutrientes-chave ligados à resistência de plantas a doenças.

## REFERÊNCIAS

- ADEBITAN SA Evaluation of potassium fertilizer and tillage depth for the control of web blight of cowpea. **International Journal of Tropical Plant Diseases**, v.16, p.173- 182. 1998.
- AGRIOS GN. **Plant pathology**. 5 ed. Elsevier Academic Press Burlington, 2005.
- AGROFIT. **Desenvolvido pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Apresenta informações sobre produtos fitossanitários. 2017. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/agrofit>. Acesso em: 15 Jan. de 2017.
- ASMAR, S. A.; PASQUAL, M.; RODRIGUES, F. A.; ARAUJO, A. G. D.; PIO, L. A. S.; SILVA, S. D. O. Fontes de silício no desenvolvimento de plântulas de bananeira ‘Maçã’ micropropagadas. **Ciência Rural**, v.41, p.7, 2011.
- BALARDIN RS, DALLAGNOL LJDHT E NAVARINI L Influência do Fósforo e do Potássio na Severidade da Ferrugem da Soja *Phakopsora pachyrhizi*. **Fitopatologia Brasileira**, v.31, p.462-467, 2006.
- BOLLER T., FELIX G. A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. **Annual Review of Plant Biology**. v.60, p.379-406, 2009.
- BREGONCI, I.S; SCHMILDT, E, R; COELHO, R. I; REIS, E. F, BRUM; V. J; SANTOS, J. G. Foliar fertilization with macro and micronutrients in the growth of plantlets micropropagated of pineapple cv. ‘Gold’ [*Ananas comosus* (L.) Merrill] in different containers. **Ciência e Agrotecnologia** v.32, p.705-711, 2008.
- CARVALHO, E. A.; COELHO, I. L.; TREMACOLDI, C. R.; GOMES JÚNIOR, R. A. Fungos associados ao híbrido interespecífico da palma de óleo no Estado do Pará. **Tropical Plant Pathology**, v.36: 908, (Suplemento), 2011.
- CARVALHO, E. A.; SANTOS, T.P.F. Doenças da palma de óleo no contexto da expansão do cultivo no Estado do Pará. Documentos/Embrapa Amazônia Oriental. Doc v.389, p.19, 2013.
- CATARINO, A. M.; POZZA, E. A.; POZZA, A.A.A.; SANTOS, L.S.S.; VASCO, G. B.; PAULO SOUZA, P.E.S. Calcium and potassium contents in nutrient solution on Phoma leaf spot intensity in coffee seedlings. **Revista Ceres**, v.63, p.486-491, 2016.
- CHÉRIF, M., ASSELIN, A. & BÉLANGER, R.R. Defense responses induced by soluble silicon in cucumber roots infected by *Pythium* spp. **Phytopathology**, v.84, p.236-242, 1994.
- CHÉRIF, M., BENHAMOU, N., MENZIES, J.G; BÉLANGER, R.R. Silicon induced resistance in cucumber plants against *Pythium ultimum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.41, p.411-425. 1992.

COLE, D.L. The efficacy of acibenzolar-S-methyl, an inducer of systemic acquired resistance, against bacterial and fungal disease of tobacco. **Crop Protection**, v.18, p.267-273. 1999.

CORLEY, R. H. V; TINKER, P. B. H. **The oil palm**. Blackwell Science. Ltd. 4ª ed. Oxford. 2003.

DALIO, R. J. D. et al. O triplo modo de ação dos fosfitos em plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.20, p.206-243, 2012.

DOWNER AJ, HODEL DR, MATTHEWS DM, PITTENGER DR. Effect of fertilizer nitrogen source on susceptibility of five species of field grown palms to *Fusarium oxysporum f. sp. canariensis*. **Palms**, v.57, p.89-92, 2013.

DURRANT, W. E.; DONG, X. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**,v.42, p.185-209, 2004.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. 2º.ed, 627, .2009.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 3º.ed, 353, 2013.

EPSTEIN, E.; BLOOM, A.J. **Nutrição mineral de plantas: princípios e perspectivas**. Londrina: Editora Planta, 403, 2006.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Estatísticas da produção mundial. 2016. Disponível em: < [http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/browse/Q/\\*S](http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/browse/Q/*S)>. Acesso em: 11 de junho de 2016.

FREITAS, A.; POZZA, E.A.; ALVES, M.; COELHO, G.; ROCHA, H.; POZZA A.A.A. Spatial distribution of Yellow Sigatoka Leaf Spot correlated with soil fertility and plant nutrition. **Precision Agriculture** v.17, p.93-107, 2016.

GARCIA JUNIOR D, POZZA EA, POZZA AAA, SOUZA PE, CARVALHO JG E BALIEIRO AC. Incidência e severidade da Cercosporiose do cafeeiro em função do suprimento de potássio e cálcio em solução nutritiva. **Fitopatologia Brasileira**, v.28: p.286-291. 2003.

GUNTZER, F., KELLER, C, MEUNIER, J.-D. Benefits of plant silicon for crops: A review. **Agronomy for Sustainable Development**. v.32, n.1, p.201-213, 2012.

HARGER, N., BRITO, O. R., RALISCH, R., ORTIZ, F. R., & WATANABE, T. S. Avaliação de fontes e doses de fósforo no crescimento inicial do milho. **Semina: Ciências Agrárias**, v.28, n.1, p.39-44, 2007.

HAWKESFORD, M.; HORST, W.; KICHEY, T. M. R.; SCHJØRRING, J. K.; MOLLER, I. S.; WHITE, P. **Functions of macronutrients. Marschers's Mineral Nutrition of Higher Plants**, Elsevier Science, 2012.

HUBER, D.; RÖMHELD, V.; WEINMANN, M. Relationship between nutrition, plant diseases and pests. In: Marschner P (Eds.). Marschner's mineral nutrition of higher plants. Third edition. New York: Academic Press (Elsevier), 2012.

**Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Censo Agropecuário. Pesquisa Agrícola. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria>. Acesso em 12 Jan 2017.

MA J.F; YAMAJI N. Function and transport of silicon in plants. **Cell Mol Life Sci** v.65, p.304 9–3057, 2008.

MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas**. Agronômica Ceres, p. p.638, 2006.

MARSCHNER H. **Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants**, 3rd ed. London: Academic Press, 2012.

MARSCHNER, H. **Mineral Nutrition of Higher Plants**. 2nd Edition. London: Academic Press, 1995.

MCGUIRE, R. G.; KELMAN, A. by *Erwinia carotovora* pv. *atroseptica*. **Phytopathology**. v.76, p.401-406, 1986.

MOHAMED MH, GADO EAM, EL-DEEB SH E MOSTAFA MH. Effect of nitrate levels as a fertilizer or as a fungal nutrition on the aggressiveness of *Rhizoctonia solani* on faba bean. **European Journal of Advanced Research in Biological and Life Sciences**, v.2:p.1-13, 2014.

MOTTA, D., ARIAS, N., MUNÉVAR, F., ALDANA, J., RAIRÁN, N., CÓRDOBA, H., ESTEBAN, L., CALVACHE, H. Relación entre la nutrición del cultivo y la incidencia de la *Pestalotiopsis* de la palma de aceite en las zonas Norte y Central de Colombia. **Palmas**, v.25, p.179-185, 2004.

MUNÉVAR, F. Relación entre la nutrición y las enfermedades de las plantas. **Palmas**, v.25, p.171-178, 2004.

MURPHY, D.J. The future of oil palm as a major global crop: Opportunities and challenges. **Journal of Oil Palm Research** . v.26 , n.1, p.1- 24, 2014.

NTSOMBOH-NTSEFONG G., NGANDO-EBONGUE G. F., KOONA P., BELL J. M., YOUNBI E., NGALLE H. B., BILONG E. G., MADI G., E ANABA B., Control approaches against vascular wilt disease of *Elaeis guineensis* Jacq. caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *elaeidis*". **Journal of Biology and Life Science**, v.3, p.160-173, 2012.

OBIDZINSKI, K. ANDRIANI, R.; KOMARUDIN, H., ANDRIANTO, A. Environmental and social impacts of oil palm plantations and their implications for biofuel production in Indonesia. **Ecology and Society**, v.17, n.1, p.25, 2012.

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A. et al. (Ed.). - Princípios e conceitos. São Paulo: Ed. **Agronômica Ceres**, 417-454, 1995.

POLANCO, L. R., RODRIGUES, F. A., MOREIRA, E. N., DUARTE, H. S. S., CACIQUE, I. S., VALENTE, L. A.; VALE, F. X. R. Management of anthracnose in common bean by foliar sprays of potassium silicate, sodium molybdate, and fungicide. **Plant Disease**, v.98, n.1, p.84-89, 2014.

RANKINE, I., FAIRHURST, T.H., Management of phosphorus, potassium and magnesium in mature oil palm., **Better Crops**, v.13, p.11, 1999.

RENARD, J. L., DE FRANQUEVILLE, H. Oil palm vascular wilt. *Oléagineux*, v.44: p.341-349, 1989.

RENARD, J. L., E RAVISÉ, A. La fusariose du palmier à huile. **Phytoma**, v.374, p.44-46, 1986.

SCHUMACHER, M. V.; CECONI, D. E.; SANTANA, C. A. Influência de diferentes doses de fósforo no crescimento de mudas de angico-vermelho (*Parapiptadenia rigida* (Benth) Brenan). **Revista Árvore**, v.28, p.149-155, 2004.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 819p. 2013.

THILAGAM, V. K., MOHANTY, S., SHAHID, M.,TRIPATHI,R., NAYAK, A. K., KUMAR, A. Role of Siliconas Beneficial Nutrient for Rice **Crop. Popular Kheti**. V.2, n.1, p.105-107, 2014.

VAN LOON, L. C.; REP, M.; PIETERSE, C. M. J. Significance of inducible defence-related proteins in infected plants. **Annual Review of Phytopathology**, v.44, p.135-162, 2006.

ZAMBOLIM, L., VENTURA, J. A. Resistência a doenças induzida pela nutrição mineral. **Revista Anual Patologia Plantas**, Passo Fundo, v.1, p.275-318, 1993.

ZAMBOLIM, L.; VENTURA, J.A.; JÚNIOR, L.A.Z. **Efeito da nutrição mineral no controle de doenças de plantas**. Viçosa - MG: Suprema Gráfica e Editora, p.321, 2012

ZAMBOLIM,L.; VENTURA, J.A. **Resistência a doenças induzidas pela nutrição das plantas**. Piracicaba: POTAFOS (Encarte Técnico. Informações Agronômicas, v.75, p.16, 1996.

## CONCLUSÕES GERAIS

O fungo *Thielaviopsis ethacetica* é o agente etiológico da podridão basal da palma de óleo.

Os microrganismos dos gêneros *Bacillus* e *Trichoderma* apresentam potencial para o biocontrole do *Thielaviopsis ethacetica*, agente etiológico da podridão basal da palma de óleo.

Os indutores de resistência, principalmente os que são fontes de nutrientes, e a fertilização foliar apresentam o potencial de melhorar o crescimento e a nutrição mineral da palma de óleo em nutrientes-chave ligados à resistência de plantas a doenças.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados apresentam-se promissores, na medida em que forneceram conhecimentos relevantes sobre o agente etiológico da podridão basal da palma de óleo no Brasil e para o biocontrole do *Thielaviopsis ethacetica*.

Contudo, faz-se necessária a comprovação dos resultados deste trabalho em campo, ou seja, avaliar o antagonismo dos bioagentes, os potenciais indutores de resistência e fontes de nutrientes em plantio de palma de óleo. Além disto, trabalhos futuros deverão avaliara atividade de PR's-proteínas, em intervalos menores, iniciando as coletas horas após a inoculação do patógeno desafiante.