

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

**EFICIÊNCIA DE *Bacillus* spp. E *Trichoderma harzianum* NO
CONTROLE DE *Fusarium* spp.**

**JOÃO AUGUABERTO DE LIMA
JÚNIOR**

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA
JULHO - 2017**

EFICIÊNCIA DE *Bacillus* spp. E *Trichoderma harzianum* NO CONTROLE DE *Fusarium* spp.

JOÃO AUGUABERTO DE LIMA JUNIOR

Agroecólogo

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2015

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

Orientadora: Prof. Dr. CARLOS A. DÓREA BRAGANÇA

Coorientador: Dr. FERNANDO HADDAD

Coorientador: Dr. LEANDRO DE SOUZA ROCHA

CRUZ DAS ALMAS - BAHIA

JULHO - 2017

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	
ABSTRAT	
ARTIGO 1	
POTENCIAL ANTAGÔNICO DE <i>Bacillus</i> spp. E <i>Trichoderma harzianum</i> SOBRE DIFERENTES ESPÉCIES DE <i>Fusarium</i> spp.	29
ARTIGO 2	
EFICIÊNCIA DE <i>Bacillus</i> spp. E <i>Trichoderma harzianum</i> NA REDUÇÃO DA INCIDÊNCIA DE MURCHA DE FUSARIUM EM BANANEIRAS CULTIVADAS SOB AMBIENTE PROTEGIDO	56
CONSIDERAÇÕES FINAIS	85

Autor: João Auguaberto de Lima Júnior
Orientador: Dr. Carlos Augusto Dorea Bragança

RESUMO: A murcha de Fusarium da bananeira é uma doença vascular que tem como agente causal o fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc), e é considerada a doença mais destrutiva da cultura. Quando o solo está infestado pelo fungo, nenhum método de controle é eficiente, por ser praticamente impossível erradicá-lo. Neste contexto, a proposta do presente estudo foi avaliar o potencial de isolados de *Bacillus* spp. e *Trichoderma harzianum* como agentes antagonistas ao Foc. Para tanto, dois estudos foram realizados: Avaliação *in vitro* do potencial antagônico dos isolados Bac 1, Bac 2, Bac 3, Bac 4 e Bac 5 de *Bacillus* spp. e *T. harzianum* a espécies de *Fusarium* spp., investigando a possibilidade da utilização dos dois agentes antagonistas juntos. E avaliação dos isolados de *Bacillus* spp. e *Trichoderma harzianum* em conjunto, aplicados em diferentes períodos, sobre Foc *in vivo*, na cultivar Prata Anã, em casa de vegetação. As avaliações *in vitro* demonstram que os isolados de *Bacillus* spp. e *T. harzianum* foram antagonistas as espécies de *Fusarium* spp. testada apresentou antagonismo às espécies de *Fusarium* spp. Em teste de compatibilidade os isolados de *Bacillus* spp. apresentaram antagonismo significativo a *T. harzianum*. Nos experimentos em casa de vegetação, foi observado que a utilização de *Bacillus* spp. Bac 1 em solo infestado por Fusarium 30 dias antes da aplicação de *T. harzianum* reduziu o índice do mal-do-Panamá na cultivar Prata-Anã em 94%. Também foi observado que *T. harzianum* promoveu significativamente o crescimento de mudas de bananeiras da cultivar Prata-Anã. Os resultados apontam que a intensidade da murcha de Fusarium pode ser reduzida significativamente por meio da utilização de *Bacillus* spp. e *T. harzianum* em conjunto.

Palavras-chave: Mal-do-Panamá; Murcha de fusarium; *Musa* spp.; Biocontrole.

Author: João Aguaberto de Lima Júnior
Adviser: Dr. Carlos Augusto Dorea Bragança

ABSTRACT: The Fusarium wilt of banana is a vascular disease that has as causal agent the fungus *Fusarium oxysporum* f. Sp. *cubense* (Foc), and is considered the most destructive of culture. When the soil is infected with the fungus, no method of control is efficient, because it is virtually impossible to eradicate it. In this context, the purpose of this study was to evaluate the potential of isolates of *Bacillus* spp. and *Trichoderma harzianum* as agents to antagonists Foc. To this end, two studies were conducted: *in vitro* evaluation of the antagonist potential of isolates Bac 1, Bac 2, Bac 3, Bac 4 and Bac 5 of *Bacillus* spp. and *T. Harzianum* to species of *Fusarium* spp., investigating the possibility of using two agents antagonists together. And the evaluation of isolates of *Bacillus* spp. and *Trichoderma harzianum* in conjunction, applied in different periods, on Foc *in vivo*, in cultivar Prata Anã, in a greenhouse. Evaluations *in vitro* have demonstrated that the isolates of *Bacillus* spp. and *T. Harzianum* were antagonistic to the species of *Fusarium* spp. tested showed antagonism to the species of *Fusarium* spp. In compatibility testing, the isolates of *Bacillus* spp. Presented significant antagonism to *T. Harzianum*. In greenhouse experiments, it was observed that the utilization of *Bacillus* spp. Bac 1 in soil infested with Fusarium 30 days prior to the application of *t. Harzianum* reduced the contents of the Panama in the cultivar Prata Anã in 94%. It was also observed that *T. Harzianum* promoted significantly the growth of seedlings of banana plants of the cultivar Prata-Anã. The results demonstrated that the intensity of Fusarium can be reduced significantly through the use of *Bacillus* spp. and *T. Harzianum* together.

Key-words: Panama disease; Fusarium wilt; *Musa* spp.; Biocontrol.

REFERENCIAL TEÓRICO

Importância da cultura da banana (*Musa spp.*) no Brasil.

A banana é uma das frutas mais cultivadas no mundo, se estabelecendo em mais de 120 países, principalmente em países tropicais (Silva & Ramos, 2009). De acordo com a classificação botânica, a bananeira é uma monocotiledônea pertencente à classe *Liliopsida*, ordem *Scitaminea*, família *Musaceae*, sub-família *Musoideae* e gênero *Musa*. Este gênero apresenta grande importância por constituir-se de espécies com ampla distribuição geográfica e abranger inúmeras espécies comestíveis (Dantas & Filho, 2000). A banana é um alimento importante na dieta básica de 400 milhões de pessoas, sendo uma importante fonte de renda para países em desenvolvimento na África, Ásia, América Latina e Caribe, (Aurore et al., 2009). A área total cultivada no mundo corresponde a 5,1 milhões de hectares, alcançando uma produtividade de 107 milhões de toneladas (FAO, 2013). Cerca de 87% das bananas que são produzidas no mundo são consumidas pelos produtores ou vendidas em mercados locais ou regionais. O restante, cerca de 13%, são exportados pelos países produtores movimentando US\$ 8,9 bilhões (FAO, 2013).

Em 2013, quando a FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) divulgou o último relatório sobre a produção de bananas no mundo, a Índia apareceu na primeira colocação com uma produção de 27 milhões de toneladas, sendo responsável por 25,1% da produção mundial. A China, com 12,3 milhões (11,4%) vem em segundo, seguida pelas Filipinas, com 8,6 milhões (8%); Brasil, com 6,8 milhões (6,3%); Equador, com 5,9 milhões (5,4%) e Indonésia, com 5,3 milhões (4,9%) (FAO, 2013).

Nos últimos anos o Brasil sempre figurou entre os cinco maiores produtores mundiais de banana. Em 2016 a área plantada foi de 474 mil hectares, com produção de 6,9 milhões de toneladas, obtendo um rendimento médio de 14,6 toneladas hectare (IBGE, 2016). As principais regiões produtoras são o Sudeste, responsável por 33% da produção nacional, seguido pelo Nordeste com 32% da produção. Entre os estados, São Paulo e Bahia aparecem empatados em primeiro lugar com uma produção de 1,1 milhões de toneladas, seguidos por Minas Gerais com 772 mil toneladas (IBGE, 2016). A bananicultura apresenta importante papel social no Brasil, uma vez que é fonte de renda, principalmente, de pequenos

produtores rurais, o que permite a fixação de mão-de-obra no campo (Mascarenhas, 1997). As variedades mais cultivadas de banana são: Maçã, Pacovan, Prata Anã, Terra ou plátano (mercado interno) e Nanica, Nanicão e Grande Naine (exportação) (Silva et al., 2004).

A bananeira é afetada por diversos problemas fitossanitários causados por fungos, bactérias, vírus, nematóides e insetos (Cordeiro, 2004). Porém, os fungos destacam-se, pois são causadores de diversas enfermidades como a doença vascular conhecida como mal-do-Panamá (*Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense*), ou manchas foliares, que são representadas principalmente pela Sigatoka-negra (*Mycosphaerella fijiensis*) e Sigatoka-amarela, (*Mycosphaerella musicola*) (Ploetz, 2006).

Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense

Fusarium oxysporum é um complexo de espécies de fungos filamentosos morfologicamente semelhantes composto por diferentes *formae speciales* (f. sp.) e que infecta mais de 100 diferentes hospedeiros (O'donnell & Cigelnik, 1999; Michielse & Rep, 2009). Os estudos com a espécie *F. oxysporum* são tão importantes que foi considerado como o quinto fitopatógeno dentre os dez mais com maior relevância científica e econômica no mundo (Dean et al., 2012). São descritos mais de 150 *formae speciales*, que são caracterizados por propriedades fisiológicas que concedem a especificação patogênica a determinadas espécies, gêneros ou grupos de plantas (Baayen et al, 2000). Como exemplo, pode-se citar a doença conhecida como mal-do-Panamá da bananeira que é causada pelo fungo *F. oxysporum* f. sp. *Cubense* (Foc).

O fungo mitospórico *F. oxysporum* f. sp. *cubense* pertence ao filo Ascomycota, classe Sordariomycetes, ordem Hypocreales e a família Nectriaceae, cuja forma perfeita não é conhecida (Maharachchikumbura et al., 2015). É um fungo habitante do solo, caracterizado por produzir três tipos de esporos assexuados; microconídios, macroconídios e clamidósporos. Microconídios é constituído apenas por uma célula, possui formato oval a reniforme, hialino, enquanto os macroconídios são ligeiramente curvados, fusiformes, multicelulares. (Nelson, 1981; Leslie & Summerell 2006). Clamidósporos se apresentam normalmente em uma forma globosa, apresentam paredes espessas, duplas e rugosas de forma individual ou em

pares (Davis, 2005). Microconídios e macroconídios são estruturas de reprodução produzidas em condições favoráveis, enquanto, os clamidósporos são produzidos em condições desfavoráveis sendo estruturas de resistência podendo ser formadas por micélios ou macroconídios (Agris, 2004). As colônias crescem 4 a 7 mm por dia sobre Agar batata dextrose a 24 °C, com farto micélio aéreo, com coloração que varia do branco ao violeta (Ploetz, 2006).

O mal-do-Panamá é uma doença vascular considerada a mais destrutiva do cultivo da banana. A doença provavelmente teve origem no Sudeste da Ásia, mas foi relatada pela primeira vez na Austrália em 1876 (Ploetz & Pegg, 2000; Ploetz, 2006). Porém, destacou-se quando na primeira metade do século XX dizimou os plantios de 'Gros Michel' na América Central, até então a principal variedade de banana para exportação (Cordeiro & Matos, 2003) provocando o desaparecimento de mais de 80.000 ha de bananais nas Américas do Sul e Central (Stover, 1962; Ploetz, 1994; Pocasangre & Pérez, 2009). No Brasil, o mal-do-Panamá foi inicialmente relatado em 1930 no município de Piracicaba – SP (Nogueira, 2002). Nos dias atuais, é encontrada em quase todas as regiões do mundo produtoras de banana (Jones, 2002; Ploetz, 2015).

O termo raça é utilizado para classificar diferentes tipos de isolados de Foc desde meados dos anos 1900 (Waite, 1954). Embora seja uma forma considerada imperfeita para a classificação da diversidade do patógeno, essa prática fornece informações úteis. As raças de Foc são definidas de acordo com a patogenicidade para cultivares de bananeira. Tradicionalmente, as seguintes cultivares tem sido utilizadas como parâmetro para a divisão das raças: "Gros Michel" Raça 1; "Bluggoe" Raça 2; e "Cavendish" Raça 4 (Ploetz, 2006; Ploetz, 2015). No Brasil não existe relatos da ocorrência da raça tropical 4, mantendo assim as variedades do subgrupo Cavendish como variedades resistentes (Cordeiro et al., 2005). Costa et al., (2015), em estudos recentes, relataram a ocorrência de murcha de Fusarium em cultivares Cavendish, Porém após análise molecular, foi constatado que os isolados de Foc não eram raça tropical 4, e sim, variantes da raça 1. A raça 1 é endêmica no país, ela provoca elevadas perdas infectando as cultivares Maçã com maior severidade por ser altamente suscetível, e de uma forma um pouco menos severa na Prata Comum e Prata Anã, que são classificadas como suscetíveis (Alves et al., 2004). A penetração do Foc na bananeira ocorre pelas raízes, seguindo pelo xilema. O que leva a obstrução do movimento da água e de nutrientes no sistema vascular da

planta. Os esporos germinam e continuam sua expansão pelo xilema (Jones, 2000). A obstrução dos vasos do xilema ocorre em decorrência do acúmulo de micélios, gomas, tiloses e esporos (Bedendo, 1995). O Patógeno infecta raízes de cultivares suscetíveis e resistentes, mas a infecção geralmente progride em porções vascularizadas do rizoma somente em genótipos suscetíveis (Beckman & Ploetz, 1990). Mecanismos de defesa como tiloses, são induzidos no xilema em resposta a infecção, mas em cultivares que apresentam resistência são induzidos no hospedeiro muito mais rapidamente do que em cultivares suscetíveis. A Infecção no pseudocaule é bloqueada por estes acontecimentos em cultivares resistentes, considerando que o patógeno coloniza cultivares suscetíveis antes do surgimento das respostas do hospedeiro (Ploetz, 2015).

Plantas infectadas exibem sintomas característicos que auxiliam na identificação da doença no campo. Os mais comuns são: amarelecimento progressivo das folhas mais velhas para as mais novas, começando pelos bordos do limbo foliar e evoluindo no sentido da nervura principal, levando as folhas a murcharem, posteriormente, elas secam e quebram junto ao pseudocaule as deixando pendentes, o que leva a uma aparência de guarda-chuva fechado (Cordeiro et al., 2005; Ploetz, 2006). Por meio de corte transversal ou longitudinal do pseudocaule ou rizoma, os sintomas internos, podem ser observados, como pontuações marrom-avermelhadas e descoloração vascular (Cordeiro et al., 2005). As principais formas de disseminação de Foc são: O contato dos sistemas radiculares de plantas saudáveis com esporos liberados por partes de plantas doentes e, em muitas áreas, o uso de material de plantio contaminado. O fungo também é disseminado por água de irrigação, de drenagem e de inundação, assim como pelo homem, por animais, pela movimentação de solo por implementos agrícolas e por ferramentas (Cordeiro et al., 2004). No Brasil, uma das principais formas de disseminação se dá por meio da utilização de mudas infectadas, uma vez que as mudas utilizadas em novos plantios são do tipo convencional, sem os devidos cuidados na seleção do bananal fornecedor, levando assim mudas contaminadas que servem como fontes de inóculo do fitopatógeno. O crescimento no uso de mudas micropropagadas pode reduzir essa via de disseminação (Cordeiro et al., 2005).

Quando o solo está infestado pelo fungo, nenhum método de controle é eficiente, pois, é praticamente impossível erradicá-lo, além disso, o Foc produz

clamidósporos, que são esporos de resistência de paredes espessas e resistentes, permitindo sua permanência e viabilidade no solo por até 30 anos dificultando assim o replantio de variedades suscetíveis de banana no local (Stover, 1962; Ploetz, 2015). Pesquisadores têm investigado métodos para controlar o mal-do-Panamá. Métodos fisiológicos, químicos e biológicos são investigados para diminuir a gravidade da doença. (Fortunato et al., 2012). O único controle efetivo dessa doença se apresenta somente por meio do plantio de variedades resistentes (Cordeiro & Kimati, 1997). Esses fatores demonstram a necessidade de pesquisas para desenvolvimento de tecnologias alternativas de controle da doença como, o emprego de extratos vegetais, caldas orgânicas ou utilização de microrganismos como agentes biocontroladores.

Controle biológico de doenças de plantas.

O controle químico do Foc é normalmente inviável, seja pelos custos elevados ou pela profundidade que a aplicação do fungicida deve atingir (Matos, 2012). Outro fator que dificulta o controle do Foc é a produção dos clamidósporos, que são unidades de resistência produzidas pelo fungo, que proporcionam ao mesmo, persistir no solo por mais de 30 (Stover, 1962; Ploetz, 2015). O único controle efetivo dessa doença se apresenta somente por meio do plantio de variedades resistentes, como as cultivares do subgrupo *Cavendish* (Nanica, Nanicão, Grande Naine), que vem sendo utilizadas em áreas com infestação de Foc. Porém, Costa et al., 2015, demonstraram que quando a quantidade do inoculo de Foc é grande ou quando ocorre a presença de um isolado mais agressivo, a resistência pode ser suplantada pelo patógeno, impossibilitando o cultivo.

Nesse cenário, é imprescindível o desenvolvimento e ampliação de tecnologias alternativas de eficientes no manejo dessa doença, que minimizem os prejuízos, viabilizando a produção. A utilização do controle biológico, empregando espécies de microrganismos com comprovada eficiência no controle de doenças causadas por patógenos radiculares, pode ser uma alternativa de controle ecologicamente correta e economicamente viável. Essa estratégia pode viabilizar o plantio das cultivares mais suscetíveis à doença como a Maçã e a Prata em áreas com a presença de Foc, além de dificultar a suplantação da resistência por baixar os níveis de inoculo de Foc no solo.

Controle biológico pode ser definido como a redução da soma de inóculo ou das atividades determinantes da doença provocada por um patógeno, realizada por meio de um ou mais organismos que não o homem (Cook & Baker, 1983). Enfatiza-se o controle biológico por meio de antagonistas, que são microrganismos não-patogênicos, que interferem na sobrevivência ou em atividades determinantes para ocorrer doenças (Cook & Baker, 1983).

Atualmente, a utilização de agentes biocontroladores é uma realidade e cada vez mais tem um importante papel no cenário agrícola mundial, em vários casos, sendo utilizados como complemento ou até mesmo substituindo produtos químicos (Templeton & Heiny, 1989; Whipps et al., 2001). Os agentes microbianos com potencial para biocontrole de doenças são organismos que estão presentes no ambiente e que, geralmente, são muito mais seletivos e específicos que os pesticidas químicos (Menezes, 2010). Grande parte das formulações para controle biológico comercializadas no Brasil tem como ingrediente ativo as bactérias. A maior facilidade de produção massal, aspectos referentes ao modo de ação e a estabilidade de formulações bacterianas, são alguns pontos que despertaram tal interesse a partir da década de 1950, principalmente com relação a bactérias entomopatogênicas. (Schnepf et al., 1998; Glare & O'callaghan, 2000). Morandi & Bettioli (2009) relatam que dentre os microrganismos com potencial para o desenvolvimento de bioprodutos, utilizando-se sistemas de produção em meios de cultura no mundo, para doenças de plantas, a bactéria *Bacillus subtilis* e espécies do fungo *Trichoderma* são os mais difundidos e utilizados. Como as bactérias crescem rapidamente, utilizam diversas fontes de nutrientes e sobrevivem em ampla faixa de temperatura, espera-se que sejam bons agentes de biocontrole em nível de campo (Cook & Baker, 1983). Lumsden & Locke (1989) mencionam que o primeiro passo para alcançar o biocontrole eficaz é encontrar os potenciais agentes de biocontrole e para isso é necessário uma série de estudos.

Bactérias antagonistas são bactérias que afetam negativamente o crescimento de outros microrganismos, incluindo patógenos vegetais, elas desempenham um papel importante na supressão de doenças de plantas no solo (Cook et al., 1995; Gupta et al., 2000; Whipps, 2001; Weller et al., 2002). A supressão de patógenos por bactérias pode ocorrer devido à produção de sideróforos, enzimas, antibióticos, competição por nichos ecológicos ou por espaço e nutrientes, parasitismo e indução de resistência (Lugtenber & Kamilova, 2009).

Bactérias antagônicas agem na maioria dos casos por antibiose e, eventualmente, por parasitismo e competição (Santos et al., 2006). Microrganismos com ação por antibiose, geralmente apresentam amplo espectro de ação, de forma que na inibição dos fungos a produção de substâncias fungitóxicas é mais efetiva se comparado a qualquer outro mecanismo de ação envolvido (Kupper et al., 2003).

Agentes de controle biológico a base de fungos ganharam ampla aceitação junto às bactérias, devido, sobretudo ao seu amplo espectro em termos de controle de doenças e de favorecimento na produção (Copping & Menn, 2000). Entre os principais fungos utilizados como agente de biocontrole se destacam *Trichoderma* spp., *Gliocladium roseum*, *Gliocladium virens*, *Talaromyces flavus* e *Sporidesmium sclerotivorum* (Melo, 1998). Entretanto, os mais importantes são espécies do gênero *Trichoderma* por serem antagonistas eficazes de uma extensa gama de fungos fitopatogênicos, como, por exemplo, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotinia sclerotiorum*, e *Fusarium* spp. (Melo, 1998). Por apresentar antagonismo a uma grande faixa de fungos fitopatogênicos, diferentes isolados de *Trichoderma* spp. representam cerca de 90% dos fungos utilizados para controle biológico de doenças de plantas, sendo mais comumente encontradas em trabalhos stirpes de *Trichoderma* das espécies *T. virens*, *T. viride* e, a mais relatada, *T. harzianum* (Grondona, et al., 1997). Além disso, isolados de *Trichoderma* spp. compreendem praticamente 50% dos fungos destinados ao controle biológico de doenças de plantas no mercado, principalmente para patógenos de solo, isso os tornam interessantes candidatos para investigação contra fungos com essas características (Whipps, 2001).

***Bacillus* spp. no controle biológico de doenças de plantas**

Diversas espécies de bactérias possuem habilidades para parasitar e degradar esporos e hifas de fungos patogênicos (Whipps, 2001). De modo geral, fungos filamentosos apresentam parede celular composta especialmente de quitina, agregada a proteínas e outros carboidratos (Cohen-Kupiec & Chet, 1998). Essas bactérias produzem quitinases, que são importantes na digestão da quitina, para utilizá-la como fonte de carbono e energia (Wang & Chang, 1997). Esse parasitismo induz a inibição do crescimento do fungo e pode compreender desde a simples aderência de células às hifas, podendo até proporcionar uma completa quebra e

degradação estrutural dos fungos (Whipps, 2001).

Existem inúmeros trabalhos na literatura utilizando bactérias no biocontrole de doenças de plantas, incluindo o mal-do-Panamá da bananeira. Ho et al. (2015), em experimentos utilizando bactérias endofíticas na tentativa do biocontrole do Foc TR4 em bananeiras do tipo Cavendish, obtiveram resultados expressivos com a bactéria *Burkholderia cenocepacia*. Após as avaliações, foi observado que houve a diminuição da incidência da doença de 24,5 % em plantas não inoculadas, para 3,4 %, em plantas tratadas com a bactéria. Sivamani & Gnanamanickam (1988), Relataram antibiose *in vitro* entre isolados de *Pseudomonas fluorescens* a Foc raça TR4 e raça 1. No mesmo experimento, eles observaram que as mudas tratadas com os isolados bacterianos apresentaram um maior crescimento tanto do sistema radicular quanto da parte aérea.

Espécies de bactérias do gênero *Bacillus* spp. se destacam como agentes de biocontrole de doenças de plantas, por produzirem uma série de antibióticos e várias outras substâncias antimicrobianas (Edwards & Seddon 2001). Isolados de *Bacillus* podem produzir variados metabólitos antifúngicos, dentre eles, podem ser encontrados lipopeptídeos da família das surfactinas, iturina e fengicina. (Maget-Dana et al., 1992; Ongena et al., 2005). Apesar de estruturalmente parecidas, surfactinas, iturinas e fengicinas apresentam diferenças em determinados características biológicas em relação à sua atividade. Iturinas e fengicinas exibem uma grande atividade antifúngica e são inibitórias do crescimento micelial de uma vasta gama de fitopatógenos fúngicos. Com relação à surfactinas, as mesmas não são por si só fungitóxicas, mas exercem algum efeito sinérgico antifúngico, quando em companhia da iturina A (Maget-Dana et al., 1992). Estudos revelam que *B. subtilis* além de produzir surfactinas, iturina e fengicina, são capazes de produzir substâncias voláteis com atividade antifúngica. No entanto, muitas dessas substâncias voláteis produzidas por este microrganismo são ainda desconhecidas (Kai et al. 2007).

Bacillus spp. destaca-se em relação a outros potenciais agentes de biocontrole, devido a sua capacidade de formar esporos, os quais apresentam tolerância tanto a temperaturas mais elevadas, quanto a temperaturas mais baixas, bem como às condições extremas de pH, à pesticidas e ao tempo de estocagem. Essas vantagens permitem a utilização deste microrganismo na formulação de produtos mais estáveis e viáveis (Backman et al., 1997). Espécies do gênero

Bacillus se destacam também pelo seu rápido crescimento em meio líquido e à ausência de patogenicidade da maioria das espécies a mamíferos (Shoda, 2000). No mercado já é possível encontrar diversas linhagens comerciais de *Bacillus* para o biocontrole de fitopatógenos. Essas bactérias biocontroladoras podem ser aplicadas como produtos secos (granulados ou pó), suspensão de células (com ou sem microencapsulamento) ou tratamento de sementes. Como exemplo de produtos comercializados a base de espécies de *Bacillus* é possível citar: Kodiak® (*Bacillus subtilis*), YieldShield® (*Bacillus pumilus*), Subtilex® (*Bacillus subtilis* MBI 600) e Serenade® (*Bacillus subtilis* QST 713) (Schisler et al., 2004).

Espécies de *Bacillus* já foram usadas como agentes biocontroladores de diversos patógenos como *Hemileia vastatrix* (Haddad et al., 2009), *Uromyces appendiculatus* (Baker et al., 1983; Mizubuti et al., 1995), *Puccinia pelargonii-zonales* (Rytter et al., 1989), *Cercospora sojina* (Tonelli et al., 2014) *Gloeosporium gloeosporioides* (Cho et al., 2003), *Rhizoctonia solani* (Yu et al., 2002), *Fusarium verticillioides* (Martínez-Álvarez et al., 2016), *Fusarium oxysporum* (Sotoyama et al., 2016). Em experimentos realizados por Haddad et al., (2013) foi avaliado a utilização de extratos de metabólitos produzidos em meio de cultura e o caldo fermentado de *Bacillus thuringiensis* que reduziram a severidade da ferrugem do cafeeiro em praticamente 100%.

Trichoderma spp.

O gênero *Trichoderma* (Teleomorfo Hypocrea) pertence ao Reino Fungi, Filo Ascomycota, Classe Ascomycetes, Ordem Hypocreales, Família Hypocreaceae (Index Fungorum, 2017). São fungos de vida livre, em que a maioria de suas estirpes não apresentam fase sexual conhecida. Sendo classificados como fungos imperfeitos Harman et al. (2004), são facilmente reconhecidos por meio de suas características macroscópicas, as quais incluem crescimento rápido em meio de cultura, apresentando micélio aéreo, hialino, volumoso e ramificado, produz conídios em tons esverdeados. Microscopicamente apresentam conidióforos com ramos emparelhados em forma de pirâmide, produzem conídios com tamanho de 5 µm de diâmetro, os quais podem apresentar forma globosa, subglobosa, elipsoidal ou oblonga (Samuels, 1996; Carreras-Villaseñor et al., 2012). Espécies de *Trichoderma* conseguem sobreviver em distintas zonas climáticas, apresentando ainda grande

capacidade de adaptar-se a diferentes condições de umidade e salinidade, garantindo assim sua alta dispersão geográfica por todo o planeta. Esses fungos são largamente distribuídos na natureza, sendo encontrados em diferentes tipos de solo, isso se deve à sua grande capacidade metabólica e a sua natureza agressivamente competitiva. (Omann & Zeilinger, 2010; Druzhinina et al., 2011).

Fungos do gênero *Trichoderma* apresentam grande capacidade para agir como agentes de biocontrole de patógenos vegetais, essa capacidade é conhecida desde meados dos anos 20. Até recentemente, os principais mecanismos de controle utilizados por espécies de *Trichoderma* relatados, eram, principalmente, aqueles que agem diretamente sobre os patógenos, como micoparasitismo, antibiose e competição por recursos e espaço (Harman, 2006). Estudos posteriores demonstraram que além dos efeitos diretos sobre os patógenos, *Trichoderma* também pode induzir resistência sistêmica ou localizada (Harman, 2006). A determinação desses efeitos depende de muitas interações que ocorrem no solo entre *Trichoderma* spp., raízes da planta e outros microrganismos (ASKEW & Laing, 1993, Porras et al., 2007). Esses vários mecanismos podem ser usados simultaneamente pelo antagonista para potencializar o combate contra determinado patógeno durante o biocontrole (Druzhinina et al. 2011; Benítez et al. 2004). Além disso, foi demonstrado que cada espécie de *Trichoderma* possui o seu próprio modo de ação para interagir com fitopatógenos (Atanasova et al. 2013).

O micoparasitismo é a capacidade que algumas espécies de *Trichoderma* têm de parasitar e/ou matar outros fungos, sendo que muitos pesquisadores despertam interesse nesse gênero de fungos por causa dessa característica (Mukherjee et al., 2012). Druzhinina et al., (2011) ampliaram o conceito de micoparasitismo para outra relação nutricional entre fungos e micotrofismo. Essa ampliação foi pensada com o intuito de incluir a capacidade de *Trichoderma* alimentar-se de fungos mortos. A ação de expressão sequencial de enzimas degradadoras de parede celular, sendo as mais comuns quitinases, glucanases e proteases, são fundamentais para o sucesso do micoparasitismo de *Trichoderma* spp. a patógenos (Harman et al., 2004). O padrão de indução ao micoparasitismo é diferente de acordo com o isolado de *Trichoderma* (Benítez et al., 2004). Mas, acredita-se que de forma geral, primeiramente o *Trichoderma* identifique sinais da presença do fungo hospedeiro, cresça em direção à hifa hospedeira, enrola-se e forma estruturas denominadas apressórios, que penetram na parede celular do hospedeiro, favorecendo a entrada

e posterior crescimento da hifa do hospedeiro (Benhamou, 1993). Constituinto assim um processo sequencial, que envolve reconhecimento, contato, adesão, competição por nutrientes, expressão de genes específicos e secreção de metabólitos antifúngicos (BENÍTEZ et al., 2004).

O micoparasitismo é considerado uma das principais características presentes no gênero *Trichoderma*, porém, algumas espécies como *T. harzianum*, *T. virens*, *T. atroviride* e *T. asperellum* são as mais estudadas para este fim (Atanasova et al., 2013). Dentre essas espécies, *T. harzianum* vem se destacando como uma das mais estudadas como agente de biocontrole, explorando sua grande capacidade de micoparasitar fungos fitopatogênicos. Lucon et al., (2009), reduziram a incidência de tombamentos em plântulas de pepino provocado por *Rhizoctonia solani* em 85%, utilizando *T. harzianum*. Carvalho et al., (2009), em ensaios de campo, observaram que com a utilização de *Trichoderma harzianum* 1306, no plantio das sementes de feijão, houve redução da incidência de *Fusarium solani* em 67% e de *Rhizoctonia solani* em 85%.

Algumas linhagens de *Trichoderma* promovem o crescimento e desenvolvimento de plantas. Estudos mostram que isolados de *Trichoderma* podem colonizar raízes formando associações simbióticas, atuando na solubilização de nutrientes no solo, aumentando a absorção de nutrientes e proporcionando maior desenvolvimento radicular (Verma et al., 2007). Contreras-Cornejo et al., (2009) e Chowdappa et al., (2013). Relatam que grande parte da promoção de crescimento realizada por linhagens de *Trichoderma* se deve, a produção de fatores reguladores de crescimento pelo fungo, tais como compostos semelhantes a auxinas. Além disso, estudos recentes têm sugerido uma forma indireta de alteração no equilíbrio dos hormônios auxina e citocininas ocasionadas por cepas de *Trichoderma*, por meio da síntese induzida desses hormônios. (Sofa et al., 2012).

O sucesso de uma cepa de *Trichoderma* depende de certo número de propriedades, tais como, atividade micoparasita, rápida taxa de crescimento, capacidade de utilizar diferentes substratos e produção de antibióticos e enzimas hidrolíticas extracelulares. Além disso, a capacidade de aumentar as defesas da planta e a capacidade para melhorar os fatores de crescimento e produtividade são características importantes para a seleção de um isolado de microrganismo para uso agrícola. Para aperfeiçoar a exploração de novos isolados benéficos e reforçar a sua aplicação prática é imprescindível aumentar os conhecimentos sobre os

mecanismos envolvidos na interação entre *Trichoderma*, planta hospedeira, fitopatógenos e outros microrganismos benéficos (Martínez et al., 2014).

Essa revisão evidencia o potencial biocontrolador de espécies de *Bacillus* e do fungo *Trichoderma harzianum*, que podem ser utilizados em conjunto como um mix de agentes de controle biológico, na tentativa de controlar o fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, causador da doença conhecida como mal-do-Panamá da bananeira.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIOS, G. N. Losses caused by plant diseases. **Plant Pathology**. Elsevier, Oxford, p. 29-45, 2004.

AHMAD, J. S.; BAKER, R. Competitive saprophytic ability and cellulolytic activity of rhizosphere-competent mutants of *Trichoderma harzianum*. **Phytopathology**, v. 77, n. 2, p. 358-362, 1987.

ALVES, E. J.; LIMA, M. B.; SANTOS-SEREJO, J. A.; TRINDADE, A. V. Propagação. **O cultivo da bananeira**. (Eds. A. L. BORGES E L. S. SOUZA). Embrapa Mandioca e Fruticultura, p. 279, 2004. AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 5th Edition. Academic Press, London, p.635, 2004.

ATANASOVA, L. L. E.; CROM, S.; GRUBER, S.; COULPIER, F.; SEIDL-SEIBOTH, V.; KUBICEK, C. P. Comparative transcriptomics reveals different strategies of *Trichoderma* mycoparasitism. **BMC Genomics**. Jan;14(1):121, 2013.

AUORE, G.; PARFAIT, B.; FAHRASMANE, L. Bananas, raw materials for making processed food products. **Trends in Food Science & Technology**, v. 20, n. 2, p. 78-91, 2009.

BAAYEN, R. P.; O'DONNELL, K.; BONANTS, P. J.; CIGELNIK, E., KROON, L. P.; ROEBROECK, E. J.; WAALWIJK, C. Gene genealogies and AFLP analyses in the *Fusarium oxysporum* complex identify monophyletic and nonmonophyletic *formae*

speciales causing wilt and rot disease. **Phytopathology**, v. 90, n. 8, p. 891-900, 2000.

BACKMAN, P. A.; WILSON, M.; MURPHY, J. F. **Bacteria for biological control of plant diseases**. In-*Environmentally Safe Approaches to Crop Disease Control*, Boca Rota : CRC Press. p. 95-109, 1997.

BAKER, C. J.; STAVELY, J. R.; THOMAS, C. A.; SASSER, M.; MACFALL, J. S. E. Inhibitory effect of *Bacillus subtilis* on *Uromyces phaseoli* and on development of rust pustules on bean-leaves. **Phytopathology**, p. 1148-1152, 1983.

BECKMAN, C. H.; PLOETZ, R. C. Host responses to the pathogen. In: **Fusarium wilt of banana**. APS Press,. p. 93-105, 1990.

BEDENDO, I. Ambiente e Doença. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. Manual de Fitopatologia. 3. ed. São Paulo, SP: **Agronômica Ceres**,. v. 1, p. 331-341. 1995.

BENHAMOU, N; CHET, I. Hyphal interactions between *Trichoderma harzianum* and *Rhizoctonia solani*: ultrastructure and gold cytochemistry of the mycoparasitic process. **PHYTOPATHOLOGY-NEW YORK AND BALTIMORE THEN ST PAUL-**, v. 83, p. 1062-1062, 1993.

BENÍTEZ, T.; RINCÓN, A.M.; LIMÓN, M.C.; CÓDON, A.C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**, v.7, p.249-260, 2004.

BETTIOL, W.; SAITO, M. L.; BRANDÃO, M. S. B. Control of coffee leaf rust with products based on *Bacillus subtilis*. **Summa Phytopathologica**, p.119-122, 1994.

CARRERAS-VILLASEÑOR, N.; SÁNCHEZ-ARREGUÍN, J. A.; HERRERA-ESTRELLA, A. H. *Trichoderma*: sensing the environment for survival and dispersal. **Microbiology**, v. 158, n. 1, p. 3-16, 2012.

CARVALHO, D .D. C.; MARTINS, I.; LOBO JÚNIOR, M.; MELLO, S. C. M. Isolados

de *Trichoderma* sp. promotores de crescimento do feijoeiro. **Tropical Plant Pathology**. Suplemento, Brasilia: Brazilian Phytopathological, v.34, 2009.

CHO, S. J.; LEE, S. K.; CHA, B. J.; KIM, Y. H.; SHIN., K. S. Detection and characterization of the *Gloeosporium gloeosporioides* growth inhibitory compound iturin a from *Bacillus subtilis* strain KS03. **FEMS Microbiology Letters**, p. 47-51, 2003.

CHOWDAPPA, P.; KUMAR, S. M.; LAKSHMI, M. J.; UPRETI, K. K. Growth stimulation and induction of systemic resistance in tomato against early and late blight by *Bacillus subtilis* OTPB1 or *Trichoderma harzianum* OTPB3. **Biological Control**, v. 65, n. 1, p. 109-117, 2013.

COHEN-KUPIEC, R.; CHET, I. The molecular biology of chitin digestion. **Current opinion in biotechnology**, v. 9, n. 3, p. 270-277, 1998.

CONTRERAS-CORNEJO, H. A.; MACÍAS-RODRÍGUEZ, L.; CORTÉS-PENAGOS, C.; LÓPEZ-BUCIO, J. *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 149, n. 3, p. 1579-1592, 2009.

COOK, R. J.; BAKER, K. F. **The nature and practice of biological control of plant pathogens**. American Phytopathological Society, p.120-170, 1983.

COOK, R. J.; THOMASHOW, L. S.; WELLER, D. M.; FUJIMOTO, D.; MAZZOLA, M.; BANGERA, G.; KIM, D. S. Molecular mechanisms of defense by rhizobacteria against root disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, n. 10, p. 4197-4201, 1995.

COPPING, L. G.; MENN, J. J. Biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. **Pest Management Science**, v. 56, n. 8, p. 651-676, 2000.

CORDEIRO Z. J. M.; KIMATI, H. Doenças da bananeira (*Musa* sp.) In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIM FILHO, A; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M.;

(eds.). **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Ceres, p.112-136,1997.

CORDEIRO, Z. J. M.; MATOS, A. D.; MEISSNER FILHO, P. E. Doenças e métodos de controle. **O cultivo da bananeira**, v. 1, p. 146-182, 2004.

CORDEIRO, Z. J. M.; MATOS, A. P. **Doenças da bananeira**. In: FREIRE, F. C.; CARDOSO, J. E.; VIANA, F. M. P. (Eds). Doenças de fruteiras tropicais de interesse agroindustrial. Brasília, DF. Embrapa informação tecnológica, p. 323-390, 2003.

CORDEIRO, Z. J. M.; MATOS, A. P.; KIMATI, H. Doenças da bananeira (*Musa spp.*) In: Doenças Da Bananeira. In: Kimati, H.; Amorim, L.; Rezende, J.A.M.; Bergamin Filho, A.; Camargo, L.E.A. Manual de Fitopatologia. Agronômica **Ceres**, v.2, p.99-117, 2005.

DANTAS, J. L. L.; SOARES FILHO, W. S. S. Classificação botânica, origem e evolução. **CORDEIRO, ZJM Banana produção: aspectos técnicos. Brasília: EMBRAPA**, p. 12-16, 2000.

DAVIS, R. *Fusarium* wilt (Panama disease) of banana. Plant Protection Service Secretariat of the Pacific Community. **Pest Advisory Leaflet** n. 42. P. 4, 2005.

DEAN, R.; VAN KAN, J. A.; PRETORIUS, Z. A.; HAMMOND-KOSACK, K. E.; DI PIETRO, A.; SPANU, P. D.; The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. **Mol Plant Pathol** 13: 414–430, 2012.

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

EDWARDS, S. G.; SEDDON, B. Mode of antagonism of *Brevibacillus brevis* against *Botrytis cinerea* in vitro. **J. Appl. Microbiolol.** 91:652-659. 2001.

FAO. **Agricultural Database**. Disponível em: <<http://www.fao.org>.> Acesso em: 15 agosto. 2016.

FORTUNATO, A. A.; RODRIGUES, F. Á.; NASCIMENTO, K. J. T. Physiological and biochemical aspects of the resistance of banana plants to *Fusarium* wilt potentiated by silicon. **Phytopathology**, v. 102, n. 10, p. 957-966, 2012.

GLARE, T. R.; O'CALLAGHAN, M. *Bacillus thuringiensis*. **Biology, Ecology and Safety**, p. 423, 2000.

GRONDONA, I.; HERMOSA, R.; TEJADA, M.; GOMIS, M. D.; MATEOS, P. F.; BRIDGE, P. D.; GARCIA-ACHA, I. Physiological and biochemical characterization of *Trichoderma harzianum*, a biological control agent against soilborne fungal plant pathogens. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 8, p. 3189-3198, 1997.

GRUBER S.; SEIDL-SEIBOTH V. Self versus non-self: fungal cell wall degradation in *Trichoderma*. *Microbiology*. Jan;158(Pt 1):26–34, 2012.

GUPTA, A.; GOPAL, M.; TILAK, K. V. B. R. Mechanism of plant growth promotion by rhizobacteria. **Indian journal of experimental biology**, v. 38, n. 9, p. 856-862, 2000.

HADDAD, F.; MAFFIA, L. A.; MIZUBUTI, E. S.; TEIXEIRA, H. Biological control of coffee rust by antagonistic bacteria under field conditions in Brazil. **Biological Control**, v. 49, n. 2, p. 114-119, 2009.

HADDAD, F.; SARAIVA, R. M.; MIZUBUTI, E. S.; ROMEIRO, R. S.; MAFFIA, L. A. Antifungal compounds as a mechanism to control *Hemileia vastatrix* by antagonistic bacteria. **Tropical Plant Pathology**, v. 38, n. 5, p. 398-405, 2013.

HARMAN, G. E. Overview of Mechanisms and Uses of *Trichoderma* spp. **Phytopathology**, v. 96, n. 2, p. 190-194, 2006.

HARMAN, G. E. Myths and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. **Plant Disease**, v. 84, n. 4, p. 376–393, 2000.

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

HO, Y. N.; CHIANG, H. M.; CHAO, C. P.; SU, C. C.; HSU, H. F.; GUO, C. T.; HUANG, C. C. In planta biocontrol of soilborne *Fusarium* wilt of banana through a plant endophytic bacterium, *Burkholderia cenocepacia* 869T2. **Plant and Soil**, v. 387, n. 1-2, p. 295-306, 2015.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE, SIDRA. <<http://www.ibge.org.br>> . Acesso dia 10 Maio de 2017.

Index Fungorum, 2016. Disponível em: <<http://www.indexfungorum.org/names/Names.asp>> Acesso em 20 de maio de 2017.

JONES, D. R. Introduction to banana, abacá and enset. **Diseases of Banana, Abaca and Enset. CAB International, Wallingford, UK**, p. 1-36, 2000.

JONES, D. R. Risk of spread of banana diseases in international trade and germplasm exchange. **Acorbat. Memorias XV reunión, Cartagena de Indias**, v. 27, 2002.

KAI, M.; EFFMERT, U.; BERG, G.; PIECHULLA, B. Volatiles of bacterial antagonists inhibit mycelial growth of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*. **Archives of Microbiology**, v.187, p.351–360, 2007.

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

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. The *Fusarium* Laboratory Manual. USA. **Blackwell Publishing**. p. 388, 2006.

LUCON, C. M. M.; KOIKE, C. M.; ISHIKAWA, A. I.; PATRÍCIO, F. R. A.; HARAKAVA, R. Bioprospecção de isolados de *Trichoderma* spp. para o controle de *Rhizoctonia solani* na produção de mudas de pepino. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 44(3), 225-232, 2009.

LUGTENBERG, B.; KAMILOVA, F. Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. **Annual Review of Microbiology**. v.63, p.541-556, 2009.

MAGET-DANA, R.; THIMON, L.; PEYPOUX, F.; PTAK, M. Surfactin/Iturin A interactions may explain the synergistic effect of surfactin on the biological properties of iturin A. **Biochimie**, v.74, p.1047–1051, 1992.

MAHARACHCHIKUMBURA, S. S.N.; HYDE, K. D.; JONES, E. B. G.; MCKENZIE, E. H. C.; HUANG, S. K.; ABDEL-WAHAB, M. A.; DARANAGAMA, D. A. DAYARATHNE, M.;D, M.J.; GOONASEKARA, I. D.; HONGSANAN, S.; JAYAWARDENA, R.S.; KIRK, P. M.; KONTA, S.; LIU, J.; LIU, Z.; NORPHANPHOUN, C.; PANG, K.; PERERA, R. H.; SENANAYAKE, I. C.; SHANG, Q.; SHENOY, B. D.; XIAO, Y.; BAHKALI, A. H.; KANG, J.; SOMROTHIPOP, S.; SUETRONG, S.; WEN, T.; XU, J. Towards a natural classification and backbone tree for *Sordariomycetes*. **Fungal Diversity**, v. 72, p, 199-301, 2015.

MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, J. C.; CASTRO-MARTÍNEZ, C.; SÁNCHEZ-PEÑA, P.; GUTIÉRREZ-DORADO, R.; MALDONADO-MENDOZA, I. E. Development of a powder formulation based on *Bacillus cereus* sensu lato strain B25 spores for biological control of *Fusarium verticillioides* in maize plants. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 5, p. 1-10, 2016.

MARTÍNEZ-MEDINA, A.; ALGUACIL, M. D. M.; PASCUAL, J. A.; VAN WEES, S. C. Phytohormone profiles induced by *Trichoderma* isolates correspond with their biocontrol and plant growth-promoting activity on melon plants. **Journal of chemical ecology**, v. 40, n. 7, p. 804-815, 2014.

MASCARENHAS, G. **Análise do mercado brasileiro de banana**. Preços Agrícolas, v. 134, p. 4-12, 1997.

MELO, I. S. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L (Ed.). Controle Biológico. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente. v.1, p. 17-67, 1998.

MENEZES, J. P.; JUNGES, E.; BLUME, E.; PEREIRA, M. E. Toxicologia do biopreparado a base de *Trichoderma* sp. (isolado UFSM T17) administrado em mamífero. **Revista da FZVA**, v. 17, n. 1, 2010.

MICHIELSE, C. B.; REP, M. Martijn. Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. **Molecular plant pathology**, v. 10, n. 3, p. 311-324, 2009.

MIZUBUTI, E. S. G.; MAFFIA, L. A.; MUCHOVEJ, J. J.; ROMEIRO, R. S.; BATISTA, U. G. Selection of isolates of *Bacillus subtilis* with potential for the control of dry bean rust. *Fitopatologia Brasileira*, p. 540-544, 1995.

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

MUKHERJEE M, MUKHERJEE PK, HORWITZ B A., ZACHOW C, BERG G, ZEILINGER S. *Trichoderma*-plant-pathogen interactions: advances in genetics of biological control. *Indian J Microbiol.* Dec;52(4):522–9, 2012.

NELSON, P. E. Life cycle and epidemiology of *Fusarium oxysporum*. Vascular wilt, host plants, soils, nematode interactions. 1981.

NOGUEIRA, E. M. C. Principais doenças da bananeira. **ANAIS VI Reunião Itinerante de Fitossanidade do instituto Biológico**, p. 9-20, 2002. Disponível em: <www.biologico.sp.gov.br>. Acesso em: 05. Fev. 2015.

O'DONNELL, K.; CIGELNIK, E. A DNA sequence-based phylogenetic structure for the *Fusarium oxysporum* species complex. **Phytoparasitica**, v. 27, p. 69, 1999.

OMANN, M; ZEILINGER, S. How a Mycoparasite Employs G-Protein Signaling: Using the Example of *Trichoderma*. **Journal of Signal Transduction**, v. 2, n. 10, p. 135, 2010.

ONGENA, M.; JACQUES, P.; TOURÉ, Y.; DESTAIN, J.; JABRANE, A.; THONART, P. Involvement of fengycin-type lipopeptides in the multifaceted biocontrol potential of *Bacillus subtilis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 69, n. 1, p. 29-38, 2005.

PLOETZ, R. C. Fusarium wilt and IMTP Phase II. **The Improvement and Testing of Musa: a Global Partnership.**(DR Jones, ed.). INIBAP, Montpellier, France, p. 57-69, 1994.

PLOETZ, R. C. Fusarium wilt of banana is caused by several pathogens referred to as *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. **Phytopathology**, v. 96, n. 6, p. 653-656, 2006.

PLOETZ, R. C. Management of Fusarium wilt of banana: A review with special reference to tropical race 4. **Crop Protection**, v. 73, p. 7-15, 2015.

PLOETZ, R. C.; PEGG, K. G. *Fusarium* wilt. in: Diseases of Banana, Abacá and Enset. D. R. Jones, ed. CABI Publishing, **Wallingford**, UK. P. 143-159, 2000.

POCASANGRE, L.; PÉREZ, L. Impacto potencial de la entrada de la raza tropical 4 del mal de Panamá (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*) en la industria bananera y platanera de América Latina y el Caribe. **REUNIÓN DE GRUPO DE INTERÉS SOBRE LOS RIESGOS DE LA RAZA TROPICAL**, v. 4, 2009.

PORRAS, M.; BARRAU, C.; ARROYO, F.T.; SANTOS, B.; BLANCO, C.; ROMERO, F. Reduction of *Phytophthora cactorum* in strawberry fields by *Trichoderma* spp. and soil solarization. *Plant Disease*, n. 91, St. Paul, p. 142-146, 2007.

ROVERATTI, D. S.; TEIXEIRA, A. R. R.; MORAES, W. B. C. *Bacillus thurigiensis* a new perspective for an induced protection to coffee leaf rust. **Journal of**

Phytopathology, p.149-159, 1989.

RYTTER, J. L.; LUKEZIC, F. L.; CRAIG, R.; MOOMAN, G. W. Biological control of geranium rust by *Bacillus subtilis*. **Phytopathology**, p. 367-370, 1989.

SAMUELS, G. J. *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. **Mycological research**, v. 100, n. 8, p. 923-935, 1996.

SANTOS, E. R.; GOUVEIA, E. R.; MARIANO, R. L. R.; SOUTO-MAIOR, A. M. Controle biológico da mancha aquosa do melão por compostos bioativos produzidos por *Bacillus* spp. **Summa Phytopathologica**, v. 32, p. 376-378, 2006.

SCHISLER, D. A.; SLININGER, P. J.; BEHLE, R. W.; JACKSON, M. A. Formulation of *Bacillus* spp. for biological control of plant diseases. **Phytopathology**, v. 94, n. 11, p. 1267-1271, 2004.

SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; EIGLER, D. R.; DEAN, D. H. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, p.775-806. 1998.

SHODA, M. Bacterial control of plant diseases. **J Biosci Bioeng**, n. 89, p. 515-521, 2000.

SILVA, M. B. L.; RAMOS, A. M. Composição química, textura e aceitação sensorial de doces em massa elaborados com polpa de banana e banana integral. **Ceres**, Viçosa, v. 56, n.5, p. 551-554, 2009.

SILVA, S. O.; SANTOS-SEREJO, J. A.; CORDEIRO, Z. J. M. **Variedades**. In: O cultivo da bananeira. (Eds. A. L. Borges e L. S. Souza). Embrapa Mandioca e Fruticultura, p. 279, 2004.

SIVAMANI, E.; GNANAMANICKAM, S. S. Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* in banana by inoculation with *Pseudomonas fluorescens*. **Plant and soil**, v. 107, n. 1, p. 3-9, 1988.

SOTOYAMA, K.; AKUTSU, K.; NAKAJIMA, M. Biological control of *Fusarium* wilt by *Bacillus amyloliquefaciens* IUMC7 isolated from mushroom compost. **Journal of General Plant Pathology**, v. 82, n. 2, p. 105-109, 2016.

STOVER, R.H. Fusarial wilt (Panama Disease) of bananas and other *Musa* species. **Fusarial wilt (Panama disease) of bananas and other *Musa* species.**, strains. *Int Microbiol.*:249–60, 1962.

TEMPLETON, G. E.; HEINY, D. K. Improvement of fungi to enhance mycoherbicide potential. **Biotechnology of fungi for improving plant growth**, p. 127-151, 1989.

TONELLI, M. L.; FABRA, A. The biocontrol agent *Bacillus* sp. CHEP5 primes the defense response against *Cercospora sojina*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 9, p. 2503-2509, 2014.

VERMA, M.; BRAR, S. K.; TYAGI, R. D.; SURAMPALLI, R. Y.; VALERO, J. R. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: panoply of biological control. **Biochemical Engineering Journal**, v. 37, n. 1, p. 1-20, 2007.

WAITE, B. H. Vascular disease of abaca or Manila hemp in Central America. **Plant Dis. Repr**, v. 38, p. 575-578, 1954.

WANG, S.; CHANG, W. Purification and characterization of two bifunctional chitinases/lysozymes extracellularly produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 in a shrimp and crab shell powder medium. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 2, p. 380-386, 1997.

WELLER, D. M.; RAAIJMAKERS, J. M.; GARDENER, B. B. M.; THOMASHOW, L. S. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens 1. **Annual review of phytopathology**, v. 40, n. 1, p. 309-348, 2002.

WHIPPS, J. M. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. **Journal of**

experimental Botany, v. 52, n. suppl 1, p. 487-511, 2001.

WHIPPS, J. M.; LUMSDEN, R. D. Commercial use of fungi as plant disease biological control agents: status and prospects. **Fungal biocontrol agents: progress, problems and potential**, p. 9-22, 2001.

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

ARTIGO 1

POTENCIAL ANTAGÔNICO DE *Bacillus* spp. E *Trichoderma harzianum* SOBRE DIFERENTES ESPÉCIES DE *Fusarium* spp.

¹Artigo a ser ajustado para posterior submissão ao Comitê Editorial do periódico científico Biological Control, em versão na língua inglesa.

POTENCIAL ANTAGÔNICO DE *Bacillus* spp. E *Trichoderma harzianum* SOBRE DIFERENTES ESPÉCIES DE *Fusarium* spp.

RESUMO: O controle biológico se caracteriza como uma prática sustentável, economicamente viável e de fácil aplicação pelo produtor, sendo amplamente empregado dentro de um manejo ecológico de doenças de plantas. Dentre os microrganismos com potencial para controle biológico de doenças, as bactérias são as mais utilizadas e estudadas juntamente com o fungo *Trichoderma* spp.. O presente trabalho avaliou o potencial antagônico de *Bacillus* spp. e de *Trichoderma harzianum* sobre espécies de *Fusarium* spp.. Além disso, investigou a possibilidade da utilização dos dois agentes de controle biológico em conjunto. Para tanto, foram realizadas ensaios *in vitro* de confrontação direta, compostos voláteis e compostos não-voláteis, para avaliar o antagonismo dos isolados Bac 1, Bac 2, Bac 3, Bac 4 e Bac 5 de *Bacillus* spp. as espécies de *Fusarium* spp. e a compatibilidade com *T. harzianum*. E teste de confrontação direta entre *T. harzianum* e espécies de *Fusarium* spp.. Nos resultados foi verificado que os isolados de *Bacillus* spp. Bac 1, Bac 2, Bac 3, Bac 4 e Bac 5 produzem metabólitos que interferem no crescimento de diferentes espécies de *Fusarium* spp., tornando-os antagonistas promissores. *T. harzianum* apresenta antagonismo às espécies de *Fusarium* spp., e os isolados de *Bacillus* spp. Bac 1, Bac 2, Bac 3, Bac 4 e Bac 5, apresentam antagonismo significativo a *T. harzianum*., inviabilizando o uso em conjunto dos agentes de controle biológico testados ao mesmo tempo.

Palavras chaves: Controle biológico, antagonismo, controle alternativo, micoparasitismo.

ABSTRACT: Biological control is characterized as a sustainable practice, economically viable and easy to apply by the producer, being widely used within an ecological management of plant diseases. Among the microorganisms with potential for biological control of diseases, bacteria are the most commonly used and studied together with the fungus *Trichoderma* spp.. The present study evaluated the antagonist potential of *Bacillus* spp. and *Trichoderma harzianum* on species of *Fusarium* spp.. Furthermore, we investigated the possibility of using two agents of biological control in assembly. For both, were performed *in vitro* assays of direct confrontation, volatile and non-volatile, to assess the antagonism of the isolated Bac 1, Bac 2, Bac 3, Bac 4 and Bac 5 of *Bacillus* spp. The species of *Fusarium* spp. and the compatibility with *T. Harzianum*. And test of direct confrontation between *T. Growth* and species of *Fusarium* spp.. The results showed that the isolates of *Bacillus* spp. Bac 1, Bac 2, Bac 3, Bac 4 and Bac 5 produce metabolites that interfere with the growth of different species of *Fusarium* spp., making them promising antagonists. *T. Harzianum* presents antagonism to the species of *Fusarium* spp., and the isolates of *Bacillus* spp. Bac 1, Bac 2, Bac 3, Bac 4 and Bac 5 have significant antagonism to *T. Harzianum*., making the use in conjunction of the agents of biological control tested at the same time.

Keywords: Biological control, antagonism, alternative control, mycoparasitism.

INTRODUÇÃO

O uso intensivo de agrotóxicos para o controle de doenças de plantas tem reconhecidamente ocasionado diversos problemas ambientais, como a contaminação dos alimentos, do solo, da água e dos animais, a intoxicação de agricultores, além de ocasionar em diversos casos a resistência de patógenos aos fungicidas (Morandi & Bettiol, 2009). O controle biológico se caracteriza como uma prática sustentável, economicamente viável e de fácil aplicação pelo produtor, sendo amplamente empregado dentro de um manejo ecológico de doenças de plantas (Soglio, 2004). Assim, o controle biológico se constitui em uma alternativa para a substituição ou a diminuição da utilização de pesticidas (Menezes, 2002) e controle de doenças que não há métodos eficientes. Dentre os microrganismos com potencial para controle biológico de doenças, as bactérias são as mais utilizadas e estudadas juntamente com o fungo *Trichoderma* spp. (Cook & Baker, 1983).

O sucesso de cepas de *Trichoderma* como agentes de controle biológico (ACBs) são devido a sua alta capacidade reprodutiva, capacidade de sobreviver em condições desfavoráveis, à sua eficiência na utilização dos nutrientes, capacidade de modificar a rizosfera, forte agressividade contra fungos fitopatogênicos, eficiência na promoção de crescimento da planta e eliciação de mecanismos de defesa. Porém, o micoparasitismo é descrito como um dos mecanismos mais eficientes utilizados por cepas de *Trichoderma*. Estas propriedades fazem de *Trichoderma* um gênero presente em qualquer habitat e em altas densidades populacionais (Chet, 1997). *Trichoderma* age principalmente em fungos residentes do solo, mas também em patógenos de parte aérea (Monte, 2001).

Bactérias antagonistas são bactérias que afetam negativamente o crescimento de outros microrganismos, incluindo patógenos vegetais, elas desempenham um papel importante na supressão de doenças de plantas (Cook et al., 1995; Gupta et al., 2000; Whipps, 2001; Weller et al., 2002, Shifa et al 2015). Bactérias antagônicas agem na maioria dos casos por antibiose e, eventualmente, por parasitismo e competição (Santos et al., 2006). Dentre as bactérias estudadas como ACBs, espécies de bactérias do gênero *Bacillus* se destacam como agentes de biocontrole de

doenças de plantas, por produzirem uma série de antibióticos e várias outras substâncias antimicrobianas (Edwards & Seddon, 2001).

Em experimentos realizados por Zou *et al* 2007. Bactérias antagonistas inibiram o crescimento micélio dos fungos *Paecilomyces lilacinus* e *Pochonia chlamydosporia* no solo. Essa inibição foi correlacionada com a produção de compostos orgânicos fungistáticos produzidos pelas bactérias.

Diversos autores estudaram a eficiência na utilização de *Bacillus* spp. e de *Trichoderma* spp. em conjunto no controle biológico de patógenos. Amorim & Itamar (1999) testaram a ação conjunta de isolados de *T. harzianum* e *T. koningii*, e suspensão contendo *Pseudomonas putida*, *P. fluorescens* e *Bacillus subtilis* em raízes de mudas de *Citrus* sp, que foram transplantadas para substratos pré-infestados com *Phytophthora nicotianae* e *Phytophthora citrophthora*. Ao fim dos experimentos, foi observado que tratamento com os antagonistas foi eficiente no controle dos dois patógenos.

O presente trabalho teve como objetivo, avaliar o potencial antagonístico de *Bacillus* spp. e de *Trichoderma harzianum* sobre espécies de *Fusarium* spp., por meio de estudo *in vitro*. E investigar a possibilidade da utilização dos dois ACBs em conjunto.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas-BA. O isolado de *T. harzianum* utilizado para os experimentos já é trabalhado na Embrapa Mandioca e Fruticultura em parceria com a Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB). Dos cinco isolados de *Bacillus* utilizados, quatro foram obtidos junto ao Laboratório de Microbiologia do Solo e Resíduos Orgânicos da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas-BA, e um foi adquirido na Clínica Fitosanitária da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), Cruz das Almas-BA. Os isolados fitopatogênicos estudados são todas espécies do gênero *Fusarium*, e foram adquiridos em coleções de microrganismos do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas-BA e da Universidade Federal Rural de Pernambuco (CMM), Recife-PE (Tabela 1). Os isolados fúngicos foram

reativados em meio de cultura batata dextrose-ágar (BDA) e os isolados bacterianos foram reativados em meio nutriente-ágar (NA).

Após a obtenção dos isolados, foram realizados testes de antagonismo em confrontação direta, ação de compostos voláteis e ação de compostos não-voláteis, para avaliar o potencial antagonístico dos isolados Bac 1, Bac 2, Bac 3, Bac 4 e Bac 5 de *Bacillus* spp. sobre fungos fitopatogênicos. Juntamente aos isolados fitopatogênicos, foi incluso o isolado de *T. harzianum* nos testes, com o intuito de verificar a possibilidade de utilização de *T. harzianum* e os isolados de *Bacillus* em conjunto. Também foi realizado teste de antagonismo em confrontação direta entre *T. harzianum* e os isolados fitopatogênicos.

Tabela 1. Isolados de *Fusarium* spp., *Bacillus* spp. e *Trichoderma harzianum*, com os respectivos códigos, classificação taxonômica, ano de obtenção, local de origem, hospedeiro e substrato utilizados nos ensaios.

Código	Antagonista/ Patógenos	Isolamento			
		Ano	Local	Hospedeiro	Substrato
<i>T. harzianum</i>	<i>T. harzianum</i>	2015	x	Plantio Sisal	Solo
Bac 1	<i>Bacillus</i>	x	x	x	x
Bac 2	<i>Bacillus</i>	x	Cruz das almas-BA	Feijão	Filoplano
Bac 3	<i>Bacillus</i>	x	Cruz das almas-BA	Prata anã	Rizosfera
Bac 4	<i>Bacillus</i>	x	Cruz das almas-BA	Prata anã	Pseudocaulo
Bac 5	<i>Bacillus</i>	x	Cruz das almas-BA	Prata anã	Pseudocaulo
Foc218A	Foc	2014	Eldorado-SP	Nanica	Pseudocaulo
Fc 04	Fc	2012	Marechal C. R-PR	Mandioca	Raiz
Fs 01	Fs	2007	Porto Seguro-BA	Mandioca	Raiz
FI 01	FI	2014	Cruz das almas-BA	Mandioca	Caule
Fo 09	Fo	2007	Ribeirópolis-SE	Mandioca	Raiz
Fo 06	Fo	2007	Cachoeira-BA	Mandioca	Raiz
Fo 12	Fo	2008	Guaratinga - BA	Mandioca	Raiz
Fo S1	Fo	2013	Umbaúba-SE	Mandioca	Raiz
Fv 02	Fv	2012	Cruz das almas-BA	Mandioca	Raiz
CMM500	Fot	2011	São João-PE	Feijão caupi	Caule
CMM0800	For	2007	Irecê-BA	Mamona	Caule
CMM4115	Foly	2011	Gama-DF	Tomate	Caule
CMM3576	Fol	2012	Campinas-SP	Alface	Caule
CMM1437	Fov	X	Campina Grande-PB	Algodão	Caule
Fop 05	Fop	2015	Dom Basílio -BA	Maracujá	Caule

*Foc- *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense; Fot- *Fusarium oxysporum* f. sp. tracheiphilum; Fol- *Fusarium oxysporum* f. sp. lactucae; Foly - *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici; Fop- *Fusarium oxysporum* f. sp. passiflorae; For-*Fusarium oxysporum* f. sp. ricini; Fov-*Fusarium oxysporum* f. sp. vasinfectum; Fo- *Fusarium oxysporum* sp. FI- *Fusarium lateritium* sp.; *Fusarium solani*; Fv- *Fusarium verticillioides* s.; Fc- *Fusarium chlamydosporum*.

Antagonismo de *Bacillus* sp. a espécies de *Fusarium* spp. e *T. harzianum* em teste de confrontação direta

Em placas de Petri de 9 cm de diâmetro contendo meio de cultivo BDA, os isolados de fungos fitopatogênicos e de *T. harzianum* com sete dias de crescimento foram repicados para o centro da placa, separadamente. Após 48 horas, quatro discos de papel filtro autoclavados foram imersos em uma suspensão bacteriana contendo *Bacillus* sp. com 48 horas de crescimento, posteriormente, os discos foram transferidos para a placa em posição equidistantes, a um centímetro da borda da placa. Como controles, foram utilizadas placas contendo os fungos fitopatogênicos e quatro papeis filtro mergulhadas em água destilada estéril. As placas foram mantidas a 25 °C por 12 dias em fotoperíodo de 12 horas. Foram utilizados quatro repetições em delineamento inteiramente casualizado.

As avaliações consistiram em medições do crescimento micelial do fungo em direção ao disco de papel filtro, oito dias após a aplicação das bactérias, ou seja, 10 dias após a repicagem dos fungos. Por meio de uma régua milimetrada. A partir dos dados, determinou-se a porcentagem de inibição do crescimento micelial (PICM) utilizando a fórmula:

$$\text{PICM} = \frac{(\text{Diâmetro da testemunha} - \text{diâmetro do tratamento}) \times 100}{\text{Diâmetro da testemunha}}$$

Efeito de compostos voláteis produzidos por *Bacillus* spp. sobre espécies de *Fusarium* spp. e *T. harzianum*.

O método utilizado consiste em posicionar tampas de placas de Petri umas sobre as outras, após ter sido vertido o meio de cultivo BDA em cada uma delas. Na parte inferior da placa, um isolado de *Bacillus* sp. foi repicado, com o auxílio de uma alça de platina, e na parte superior, um disco contendo micélio de Foc. Foram utilizados três repetições em delineamento inteiramente casualizado. O mesmo procedimento foi adotado para os tratamentos controle com *Bacillus* e Foc.

As avaliações consistiram em medições do diâmetro das colônias aos 12

dias, por meio de uma régua Milimetrada. A partir dos dados, determinou-se a porcentagem de inibição do crescimento micéial (PICM), por meio da formula de PICM.

Efeito de compostos não-voláteis produzidos por *Bacillus* sp. sobre espécies de *Fusarium* spp. e *T. harzianum*.

Cinco isolados de *Bacillus* sp. foram cultivados em meio BD (batata-dextrose), em erlenmeyers de 150 mL durante sete dias. Após esse período, a biomassa bacteriana foi descartada por filtração utilizando filtro Millipore Millex® com 0,20 µm, separando os metabólitos que foram liberados pelas bactérias no meio BD, das células bacterianas. Posteriormente, quatro discos de papel filtro autoclavados foram imersos no filtrado e transferidos em seguida para placas de Petri de 9 cm de diâmetro contendo meio de cultivo BDA em posição equidistantes, a um centímetro da borda da placa. Após, foram repicados separadamente um disco de 5 mm de diâmetro contendo micélio e conídios dos fungos fitopatogênicos e de *T. harzianum* para o centro da placa. Como controles, foram utilizadas placas contendo os fungos e quatro papeis filtro imersos em água destilada estéril. As placas foram mantidas a 25 °C por 12 dias em fotoperíodo de 12 horas. Foram utilizados quatro repetições em delineamento inteiramente casualizado.

As avaliações consistiram em medições do crescimento micéial do fungo em direção ao disco de papel filtro, oito dias após a aplicação do filtrado com o auxílio de uma régua milimetrada. A partir dos dados, determinou-se a porcentagem de inibição do crescimento micéial (PICM), por meio da formula de PICM.

Antagonismo de *T. harzianum* a espécies de *Fusarium* spp. em teste de pareamento.

Em placas de Petri de 9 cm de diâmetro contendo meio de cultivo BDA foi colocado separadamente um disco de 5 mm de diâmetro contendo micélio e conídios de *Fusarium* spp. a uma distância de 1 cm da borda da placa. Em seguida, foi colocado um disco de micélio e conídios de *T. harzianum* em posição oposta ao disco de *Fusarium* spp. em três repetições. Como controle, foram confrontadas

colônias de *Fusarium* spp. x *Fusarium* spp., *T. harzianum* x *T. harzianum*. As placas foram mantidas a 25 °C com fotoperíodo de 12 horas.

O potencial antagônico dos isolados foi avaliado aos 4, 8 e 12 dias, atribuindo-se notas de acordo com escala proposta por Bell et al. (1982) que variam entre: Nota 1- sobreposição de *Trichoderma* que colonizou a superfície total do meio, e reduziu a colônia de *Fusarium* spp ; Nota 2- sobreposição de *Trichoderma* que colonizou pelo menos 2/3 da superfície do meio; Nota 3 - *Trichoderma* e *Fusarium* spp colonizaram mais que 1/3 e, menos que 2/3 da superfície do meio; Nota 4 - *Fusarium* spp colonizou ao menos 2/3 da superfície do meio e resistiu a invasão por *Trichoderma*; Nota 5- sobreposição de *Fusarium* spp, que colonizou toda a superfície do meio. No 12º dia, o crescimento micelial dos fungos fitopatogênicos foram medidos com o auxílio de uma régua milimetrada. A partir dos dados, determinou-se a porcentagem de inibição do crescimento micelial (PICM), por meio da formula de PICM.

Todos os dados dos experimentos que foram transformados pela formula de de PICM, foram submetidos à análise de variância pelo teste F a 1% de significância, e para o caso de diferenças significativas entre os tratamentos, foi realizado teste de medias de Scott knott a 5%, utilizando o programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2000).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Antagonismo de *Bacillus* sp. a espécies de *Fusarium* spp. e *T. harzianum* em teste de confrontação direta.

Analisando a tabela 2, é possível observar que todos os isolados de *Bacillus* testados, inibiram o crescimento micelial das espécies de *Fusarium* sp.. Os tratamentos controle apresentaram crescimento contínuo, com os micélios ultrapassando os discos de papel. Já os tratamentos com os isolados de *Bacillus* sp., apresentaram diferentes graus de antagonismo, variando de acordo com o isolado de *Fusarium* sp. (Tabela 2).

O isolado de *Bacillus* sp. Bac 1, inibiu em um maior grau o crescimento micelial dos fungos Fc 04, Fo 09, CMM1437 e Fo S1. Diferindo estatisticamente dos demais isolados avaliados. Em relação ao Bac 2, os isolados de *Fusarium* sp. Foc218A e CMM500 foram os mais antagonizados. Em relação ao isolado Bac 3, oito fungos foram os mais antagonizados, Foc218A, Fo 09, CMM3576, CMM4115, CMM500, CMM1437, Fo S1 e Fv 02, não diferindo estatisticamente entre si. O isolado Bac 4 apresentou maior inibição aos isolados FOP 005, CMM500, CMM1437 e Fo 06, em relação ao Bac 5, os isolados de *Fusarium* sp. Foc218A, Fo 09, CMM4115, CMM500, CMM1437, Fo 06 e Fo S1 (Tabela 2).

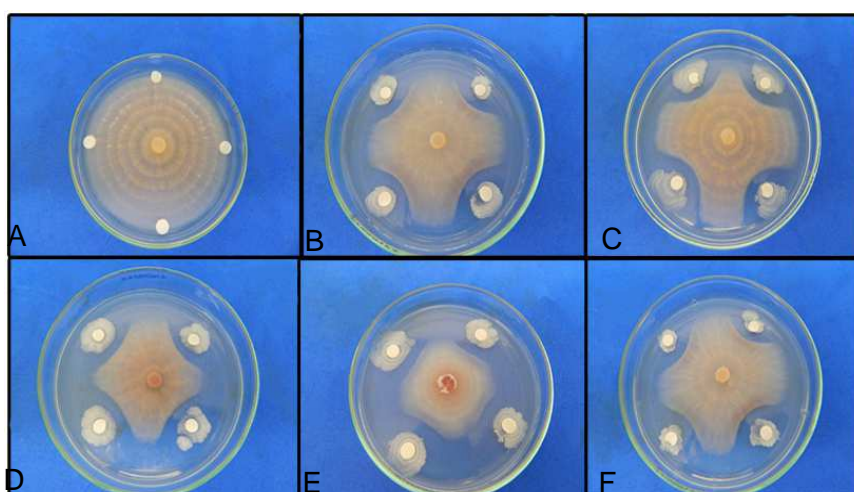


Figura 1. Tratamento controle do isolado Fc 04 (A); Isolado de *Bacillus* sp. Bac 3 inibindo o crescimento micelial do fungo Fo 09 (B); Isolado de *Bacillus* sp. Bac 4 inibindo o crescimento micelial do fungo Fc 04 (C); Isolado de *Bacillus* sp. Bac 5 inibindo o crescimento micelial do fungo CMM4115 (D); Isolado de *Bacillus* sp. Bac 2 inibindo o crescimento micelial do fungo Fop 05 (E); Isolado de *Bacillus* sp. Bac 1 inibindo o crescimento micelial do fungo Fo 09 (F).

Tabela 2. Porcentagem de inibição do crescimento micéial dos fungos fitopatogênicos e *T. harzianum* pelos isolados de *Bacillus* sp. Bac 1, Bac 2, Bac 3, Bac 4 e Bac 5, em teste de confrontação direta.

Fungos	Bactérias Antagonistas				
	Bac 1	Bac 2	Bac 3	Bac 4	Bac 5
Fc 04	41,87 a*	43,12 b	35,62 b	40,00 b	36,25 b
Fs 01	24,99 b	39,86 c	35,81 b	37,84 b	35,81 b
<i>T. harzianum</i>	5,55 c	26,11 e	35,56 b	24,44 c	16,11 d
Foc218A	39,44 b	49,44 a	46,67 a	41,11 c	45,00 a
Fop 005	29,28 b	43,57 b	38,57 b	46,43 a	37,85 b
FI 01	24,59 b	39,68 c	37,30 b	30,15 c	31,74 c
Fo 09	41,10 a	47,22 b	45,55 a	40,00 b	42,77 a
CMM3576	29,70 b	37,66 d	42,97 a	42,30 b	37,00 b
CMM4115	36,34 b	44,29 b	43,63 a	42,97 b	47,61 a
CMM800	27,69 b	34,61 d	33,07 b	27,69 c	31,53 c
CMM500	40,00 b	51,66 a	45,00 a	50,55 a	50,00 a
CMM1437	41,66 a	41,11 c	48,88 a	44,44 a	43,33 a
Fo 06	37,77 b	46,66 b	40,55 b	44,44 a	47,88 a
Fo 12	31,69 b	40,97 c	39,65 b	40,97 b	38,33 b
Fo S1	40,62 a	40,00 c	45,62 a	41,25 b	46,25 a
Fv 02	30,62 b	37,17 d	44,37 a	43,06 b	37,82 b
Controle	0 c	0 f	0 c	0 d	0 e
CV%	16,26	7,5	8,79	10,65	9,61

*Médias seguidas por letras distintas na mesma coluna diferem entre si, pelo teste de Scott knott, a 5% de probabilidade.

Nos resultados obtidos no presente estudo, as bactérias variaram a porcentagem de inibição micéial dos fungos patogênicos entre 24,99% a 51,66%, com destaque para o isolado Bac 5, que apresentou porcentagens de inibição de 31,54% a 50%, e o isolado Bac 2, que apresentou porcentagens de inibição de 34,61% a 51,66%.

Resultados semelhantes foram encontrados por diversos autores que estudam espécies do gênero *Bacillus*, como inibidores de crescimento micéial de fungos fitopatogênicos. Em experimentos realizados por Cavaglieri *et al* 2005, foi observado que todos os isolados de *Bacillus* testados inibiram em até o crescimento micéial de *Fusarium verticillioides*, causador das podridões-de-colmo e da espiga no milho, a porcentagem de inibição do crescimento variou de 28% a 78% de acordo com o isolado utilizado. Shiomi & Minhoni 2008, em testes de antagonismo *in vitro*, entre bactérias endofíticas do milho e fungos de solo *Phytium aphanidermatum*, *Fusarium moniliforme*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii*. Constatou que, de forma geral,

todos os isolados selecionados apresentaram atividade antagônica aos patógenos desafiantes, com destaque para as bactérias *Bacillus subtilis* e *Bacillus lentimorbus*, com taxas de inibição entre 32,0% e 53,8%. Indicando uma inespecificidade de ação.

Diversos estudos relatam que isolados de *Bacillus* spp. apresentam antagonismo a fungos devido a produção de enzimas, metabólitos antifúngicos e ácidos que inibem fitopatógenos, sendo esses os principais mecanismos de ação desses antagonistas (Motomura *et al* 1998, Gordillo *et al* 2015, Shifa *et al* 2015, Adibi *et al* 2017). Dentre os principais metabólitos produzidos por isolados de *Bacillus* spp. estão os lipopeptídeos da família das surfactinas, iturina A e fengicina. Asaka & Shoda 1996, em experimentos realizados com *Bacillus subtilis* RB14, verificaram que o antagonismo realizado pelo isolado de *Bacillus* ao patógeno de solo *Rhizoctonia solani*, foi devido principalmente à produção dos antibióticos iturina A e surfactina.

Diversas espécies de *Bacillus* foram investigadas por Chang *et al* 2003, e sua capacidade inibitória foi relacionada a produção de enzimas. Eles verificaram que endoquitinases excretadas pelo isolado *B. cereus* estavam diretamente relacionadas com a inibição do crescimento micelial de *Fusarium oxysporum*.

Os isolados de *Bacillus* sp. Bac 2, Bac 3, Bac 4 e Bac 5 apresentaram antagonismo a *T. harzianum*, com destaque para o isolado Bac 3 que inibiu em 35,56% o crescimento micelial do fungo.

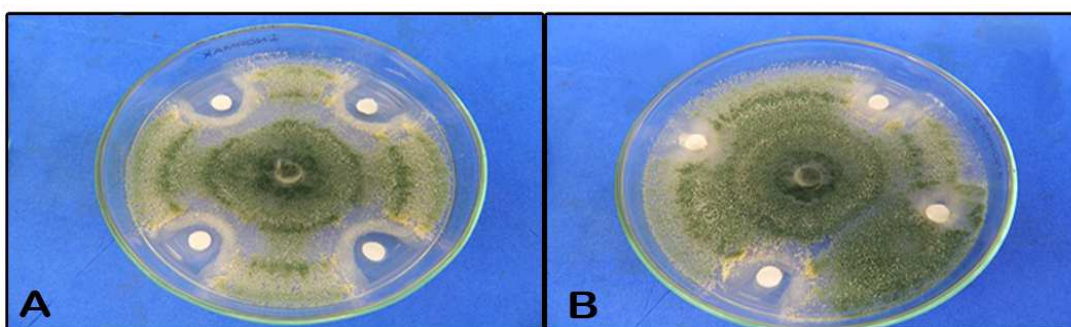


Figura 2 - Crescimento micelial de *T. harzianum* em teste de confrontação direta com o isolado de *Bacillus* sp. Bac 3 (A), e em confrontação direta com o isolado de *Bacillus* sp. Bac 2 (B).

T. harzianum apresentou maior resistência aos compostos antagônicos produzidos pelos isolados de *Bacillus* sp., se comparado aos fungos fitopatogênicos, porém, apenas o isolado Bac 1 não apresentou antagonismo significativo a *T. harzianum*. Esse fato pode ser explicado pela maior resistência de fungos do gênero

Trichoderma a um grande número de compostos químicos. Chet *et al* 1997, relatam que espécies de *Trichoderma* apresentam um crescimento acelerado quando inoculadas no solo, por possuírem naturalmente resistênciã a muitos compostos tóxicos, incluindo herbicidas, fungicidas, inseticidas e compostos fenólicos.

Efeito de compostos voláteis produzidos por *Bacillus* sp. sobre espécies de *Fusarium* spp. e *T. harzianum*.

Analisando a tabela 3, observa-se que compostos voláteis liberados pelos isolados de *Bacillus* sp. Bac 1, Bac 2, Bac 3, Bac 4 e Bac 5, inibiram o crescimento micéial das espécies de *Fusarium* sp., os tratamentos controle apresentaram crescimento contínuo, já os tratamentos com os isolados de *Bacillus* sp., apresentaram diferentes porcentagens de antagonismo, variando de acordo com o isolado de *Fusarium* sp., podendo ser destacado o isolado de *Bacillus* sp. Bac 3, que inibiu em maior porcentagem, sete isolados de *Fusarium* sp. que não diferiram estatisticamente entre si, sendo eles: Foc218A, Fop 005, FI 01, CMM4115, CMM800, CMM1437 e Fo 12. Pode-se destacar igualmente, os compostos voláteis liberados pelo isolado de *Bacillus* Bac 2, que inibiram o crescimento micéial dos isolados de *Fusarium* sp., destacando os isolados CMM3576, CMM4115, CMM1437, Fo 12, Fo S1 e Fv 02, que foram os mais inibidos e não diferindo entre si estatisticamente. Os compostos voláteis liberados pelos isolados de *Bacillus* sp. Bac 4 e Bac 5 apresentaram menores porcentagens de inibição contra os fungos avaliados (Tabela 3).

Tabela 3. Porcentagem de inibição do crescimento micelial dos fungos fitopatogênicos e *T. harzianum* por ação dos isolados de *Bacillus* sp. Bac 1, Bac 2, Bac 3, Bac 4 e Bac 5, em teste de produção de compostos voláteis.

Fungos	Bactérias Antagonistas				
	Bac 1	Bac 2	Bac 3	Bac 4	Bac 5
Fc 04	27,94 b*	31,47 c	30,29 b	13,52 c	17,94 c
Fs 01	13,82 d	32,05 b	28,23 b	13,97 c	10,58 e
<i>T. harzianum</i>	1,76 e	11,47 d	11,76 c	0,00 e	0,00 f
Foc218A	25,59 b	25,00 b	36,76 a	16,02 b	16,97 c
Fop 005	27,64 b	20,59 c	40,29 a	11,92 c	20,88 a
FI 01	25,29 b	29,41 c	35,00 a	17,50 b	22,05 a
Fo 09	11,76 d	31,76 b	25,59 b	9,47 d	9,50 e
CMM3576	25,29 b	38,23 a	27,94 b	17,06 b	17,35 c
CMM4115	18,23 c	37,64 a	33,82 a	17,30 b	22,05 a
CMM800	16,47 d	30,58 c	37,05 a	7,98 d	14,11 d
CMM500	34,11 a	10,29 d	41,76 a	8,79 d	11,32 e
CMM1437	24,70 b	36,17 a	38,23 a	24,11 a	19,81 b
Fo 06	12,94 d	31,76 b	25,59 b	6,47 d	10,00 e
Fo 12	22,64 c	42,06 a	39,70 a	13,23 c	10,14 e
Fo S1	25,00 b	38,23 a	30,00 b	17,65 b	18,82 b
Fv 02	19,70 c	37,05 a	28,07 b	18,57 b	14,08 d
Controle	0 e	0 e	0 d	0 e	0 f
CV%	13,91	12,78	13,12	13,13	8,48

*Médias seguidas por letras distintas na mesma coluna diferem entre si, pelo teste de Scott knott, a 5% de probabilidade.

As porcentagens de inibição obtidas pelos isolados Bac 1, Bac 2 e Bac 3 nesse experimento, evidenciaram que grande parte do antagonismo a fungos patogênicos, é devido a produção de compostos voláteis. Com destaque para o isolado Bac 3, que apresentou porcentagem de inibição entre 25,59% a 41,76%.

Wheatley 2002, em estudos para verificar as interações mediadas por compostos voláteis entre uma ampla gama de fungos e bactérias de solo. Observou que os resultados demonstraram que os isolados fúngicos tiveram o crescimento micelial inibido em até 60%, dependendo do isolado bacteriano. Shifa *et al* 2015, demonstraram que isolados de *Bacillus* produzem compostos orgânicos voláteis aldeídos, ácidos graxos, alcanos, ésteres e enxofre. Belal *et al* 2013, relataram que ácidos graxos orgânicos tais como ácido n-hexadecanóico, ácido octadecanóico, ácido pentadecanóico, ácido heptadecanóico, ácido nanoanóico e ácido decanóico

produzidos por *Bacillus subtilis*, foram efetivos no controle dos fungos fitopatogênicos *Pseudoperonospora cubensis* e *Sphaerotheca fuliginea* no pepino. A natureza química dos compostos voláteis orgânicos aparece como fator determinante na atividade antifúngica da bactéria. Por exemplo, os aldeídos alifáticos foram descritos como mais eficazes do que álcoois na inibição da formação de tubo germinativo do fungo fitopatogênico *Alternaria alternata* (Andersen *et al*, 1994).

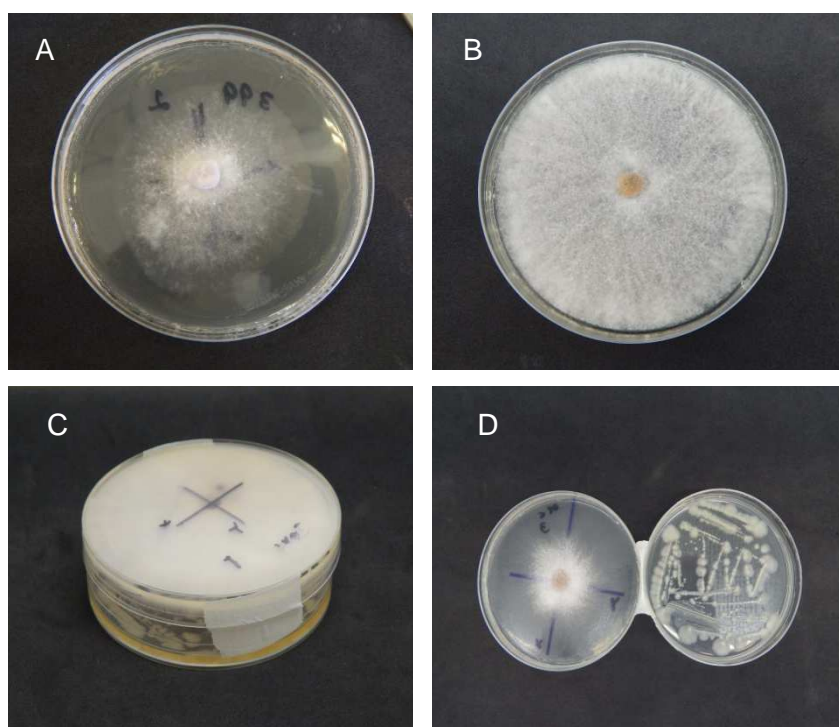


Figura 3 - Teste de liberação de compostos voláteis; Isolado Fo 06 após 12 dias de exposição aos metabólitos liberados pelo isolado de *Bacillus* spp. Bac 1 (A); Tratamento Isolado Fo 06 testemunha(B); Placas sobrepostas com *Bacillus* spp. em na placa inferior e fungo patogênico na placa superior (C); Isolado Fo 12 a esquerda e Bac 2 a direita, logo após abertura da placa sobreposta para avaliação (D).

Existiu grande variação entre os resultados obtidos pelos isolados de *Bacillus* sp.. Os isolados Bac 4 e Bac 5 não apresentaram grandes porcentagens de inibição contra os isolados de *Fusarium* sp., o isolado Bac 4 apresentou resultados entre 7% e 24%, e o isolado Bac 5 obteve resultados entre 9% e 22%. Esses resultados são análogos aos obtidos por Kai *et al* 2007, que avaliaram compostos voláteis liberados por diferentes isolados bacterianos, dentre eles, diversos isolados de *Bacillus* sp. contra *Rhizoctonia solani*, sendo constatado que o isolado de *Bacillus* B2g inibiu o crescimento micelial do fungo em 20%, enquanto o isolado *Bacillus* 1S18, apresentou inibição de 70% em média, demonstrando grande variação entre os isolados avaliados.

Os isolados Bac 1, Bac 4 e Bac 5, não apresentaram antagonismo significativo a *T. harzianum*. Os isolados Bac 2 e Bac 3 inibiram o crescimento micélio de *T. harzianum*, diferindo estatisticamente do controle, porém com porcentagem de inibição inferior aos demais fungos avaliados.

Efeito de compostos não-voláteis produzidos por *Bacillus* sp. sobre espécies de *Fusarium* spp. e *T. harzianum*.

Os compostos não-voláteis produzidos pelos isolados de *Bacillus* sp. Bac 1, Bac 2, Bac 3, Bac 4 e Bac 5 apresentaram diferentes porcentagens de inibição, variando de acordo com cada isolado de *Fusarium* sp. testado. Os compostos não-voláteis produzidos pelo isolado Bac 1 inibiram significativamente o crescimento micélio em maior porcentagem, dos isolados: Fop 05, FI 01, CMM3576, CMM4115, CMM800, CMM500 e Fo S1. Já os compostos não-voláteis produzidos pelo Bac 2, apresentaram maior porcentagem de inibição significativa, ao isolado CMM4115, da mesma forma que o isolado Bac 3, que também apresentou maior porcentagem de inibição ao isolado CMM4115. O isolado Bac 4, demonstrou maior porcentagem de inibição significativa aos isolados CMM4115 e Fop 05, e o isolado Bac 5, apresentou maior porcentagem de inibição significativa, aos isolados FI 01, CMM3576, CMM4115, CMM800, CMM500 e Fo S1.

Tabela 4. Porcentagem de inibição do crescimento micelial dos fungos fitopatogênicos e *T. harzianum* por ação dos isolados de *Bacillus* sp. Bac 1, Bac 2, Bac 3, Bac 4 e Bac 5, em teste de produção de compostos não-voláteis.

Fungos	Bactérias Antagonistas				
	Bac 1	Bac 2	Bac 3	Bac 4	Bac 5
Fc 04	0 c*	10,61 b	5,00 c	0 d	0 c
Fs 01	9,16 b	7,5 b	9,16 c	8,33 c	7,50 b
<i>T. harzianum</i>	0 c	6,11 c	0 d	0 d	0 c
Foc218A	10,00 b	13,75 b	12,50 b	13,75 b	7,50 b
Fop 005	16,66 a	8,33 b	12,50 b	19,16 a	5,33 b
FI 01	13,33 a	11,66 b	14,16 b	15,83 b	13,33 a
Fo 09	10,00 b	9,37 b	9,37 c	7,50 c	9,37 b
CMM3576	18,57 a	11,43 b	10,00 c	12,14 b	15,00 a
CMM4115	17,50 a	24,37 a	23,12 a	20,62 a	15,62 a
CMM800	12,50 a	5,00 c	11,65 b	5,83 c	10,83 a
CMM500	18,12 a	10,00 b	16,87 b	16,25 b	16,87 a
CMM1437	5,62 b	9,37 b	5,00 c	6,25 c	6,87 b
Fo 06	7,50 b	9,16 b	7,50 c	5,83 c	4,16 b
Fo 12	10,00 b	9,37 b	9,37 c	8,75 c	8,75 b
Fo S1	15,83 a	10,00 b	15,00 b	14,16 b	13,33 a
Fv 02	6,87 b	10,00 b	5,62 c	8,75 c	7,50 b
Controle	0 c	0 d	0 d	0 d	0 c
CV%	33,45	26,8	35,5	29,8	33,01

*Médias seguidas por letras distintas diferem entre si, pelo teste de Scott knott, a 5% de probabilidade.

Os resultados obtidos no presente estudo diferem dos encontrados por Rocha & Moura 2013, que em avaliações dos efeitos de inibição micelial de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, por compostos não-voláteis produzidos por isolados bacterianos incluindo *Bacillus* spp., não verificaram nenhuma inibição micelial. Porém, foram semelhantes aos resultados encontrados por Kupper *et al*, 2003, que avaliou 66 metabólitos produzidos por isolados de *Bacillus* spp. e destes, 64 inibiram significativamente o crescimento micelial de *Colletotrichum acutatum*.

A inibição do crescimento micelial dos fungos por metabólitos de *Bacillus*, está ligado diretamente a presença de antibióticos. Esses compostos antibióticos incluem predominantemente péptidos (Katz & Demain, 1977), que são sintetizados ribossomicamente ou não-ribossomicamente (Stein, 2005). Os antibióticos peptídicos ribossômicos são sintetizados durante o crescimento ativo da bactéria, enquanto que os não-ribossômicos, são sintetizados após o crescimento das

bactérias ter cessado (Shifa *et al* 2015). O que levanta a hipótese que provavelmente, os metabólitos predominantes nos filtrados de *Bacillus* sp. foram os não-ribossômicos. Esse fato explicaria por que a porcentagem de inibição apresentada pelos compostos não-voláteis, foram bem menores que os obtidos nos testes de antagonismo direto, que tiveram as substâncias produzidas durante o crescimento dos isolados de *Bacillus* sp. (ribossômicos), em contato direto com os fungos patogênicos. Além disso, os filtrados bacterianos podem ter perdidos compostos durante o processo de filtração.

Os péptidos produzidos pelas espécies de *Bacillus* incluem micobacilinas (Sengupta *et al* 1971), iturinas (Isogai *et al*, 1982), bacillomicins (Peypoux *et al* 1981), surfactinas (Kluge *et al*, 1988), micosubtilins (Peypoux *et al* 1976; Besson & Michel 1990), fungistatina (Korzybski *et al*, 1978) e Subsporins (Ebata *et al* 1969). A maioria desses antibióticos são peptídios cíclicos compostos inteiramente de aminoácidos, mas alguns podem conter outros resíduos. (Kluger *et al*, 1990). Os tipos e quantidades de antibióticos produzidos variam de acordo com o meio de crescimento (Akpa *et al*, 2001).

O isolado de *T. harzianum* teve seu crescimento inibido apenas pelos compostos não-voláteis produzidos pelo isolado Bac 2, que diferiu significativamente do controle.

Antagonismo de *T. harzianum* a espécies de *Fusarium* spp. em teste de pareamento.

Os tratamentos controles apresentaram um crescimento radial regular, no entanto, para os pareamentos entre *T. harzianum* e os isolados de *Fusarium* sp., diferentes graus de colonização dos patógenos foram observados (Tabela 5).

O grau de antagonismo de *T. harzianum*, variou de acordo com o isolado de *Fusarium* sp., independentemente do tempo de avaliação. Não foi verificado os graus quatro e cinco, que consistem na colonização de ao menos 2/3 e no total da placa, pelos isolados patogênicos. Quatro dias após o pareamento, foram observados efeitos anatógônicos sobre 14, dos 15 isolados avaliados. Na segunda avaliação com oito dias, todos os isolados foram antagonizados por *T. harzianum*, porém, em maior grau nos isolados CMM4115, Fop 05, CMM1437 e Fo 12. Na última avaliação, 12 dias após o pareamento, o antagonismo foi mais evidenciado,

sendo observado grau um de antagonismo ao isolado Fc 04, que consiste na colonização total do patógeno pelo antagonista, em todos os outros 14 fungos avaliados, o grau de antagonismo foi em valores próximo a 1 (Tabela 5).

Tabela 5. Grau de antagonismo (GA) em diferentes tempos de acordo com escala de Bel et al. (1982) e porcentagem de inibição da colonização micélica (%ICM) de *Fusarium* spp., exercido por *Trichoderma harzianum*.

Fungos	<i>Trichoderma harzianum</i>			%ICM
	GA 4º Dia	GA 8º Dia	GA12º Dia	
Fc 04	2,6	2	1	78,89 a*
Fs 01	2,6	2	1,7	71,01 a
Foc218A	2,6	2	1,3	74,07 a
Fop 05	2,7	1,7	1,3	71,85 a
FI 01	2,7	2,3	1,3	69,63 a
Fo 09	2,3	2	1,7	67,78 a
CMM3576	3	2	1,3	73,33 a
CMM4115	2,7	1,3	1,7	78,14 a
CMM800	2,3	2	1,3	78,15 a
CMM500	2,7	2	1,3	76,66 a
CMM1437	2,3	1,7	1,3	77,41 a
Fo 06	2,3	2,3	1,7	63,33 a
Fo 12	2,3	1,7	1,3	81,11 a
Fo S1	2,3	2,0	1,3	73,33 a
Fv 02	2,3	2,3	1,7	74,07 a
Controle	3	3	3	0 b
CV%				8,54

*Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si, pelo teste de Scott knott, a 5% de probabilidade.

Após 12 dias, da montagem do experimento, foi avaliada a porcentagem de inibição proporcionada por *T. harzianum*. 12 isolados de *Fusarium* sp., apresentaram acima de 70% de inibição do crescimento micelial, podendo ser destacado o isolado Fo 12, que teve seu crescimento micelial inibido em 81% (Tabela 5).

Os resultados obtidos nos testes com *T. harzianum* foram semelhantes aos obtidos por Louzada et al 2009. Neste trabalho, os autores verificaram que 50 isolados de *Trichoderma* spp. inibiram o crescimento micelial de *Fusarium solani* e as notas obtidas no teste de pareamento de culturas, foram menores que 3. Já Carvalho et al (2011) testaram seis isolados de *T. harzianum* para controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, dos quais, dois isolados de *Trichoderma* controlaram com eficiência o fungo patogênico nos testes *in vitro*. Em experimentos

realizados por Hoffmann *et al* 2015, foram avaliados 15 isolados de *Trichoderma* spp. em testes de confrontação direta *in vitro* contra isolados de *Fusarium* sp., nesse experimento, todos os isolados de *Trichoderma* apresentaram antagonismo aos isolados patogênicos.

Os isolados de *Trichoderma* spp. demonstram diversas habilidades como agentes de biocontrole, segundo Bettioli 1991, uma das características mais importantes é que o antagonista atue por meio de mais de um mecanismo, combinando antibiose, micoparasitismo, competição e estímulo à defesa do hospedeiro. A partir dos resultados observados na avaliação de confrontação direta, é possível afirmar que um dos mecanismos predominantes empregado pelo isolado de *T. harzianum* foi o micoparasitismo, sendo verificado pela colonização micelial imposta pelo isolado ao *Fusarium* (Figura 3C).

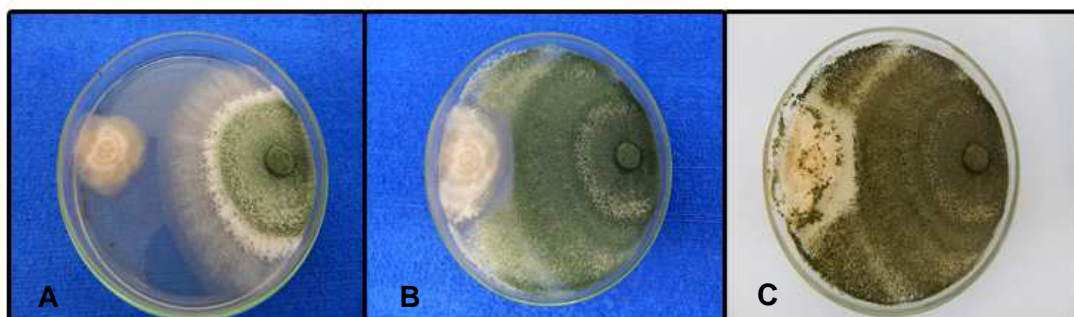


Figura 4 – Pareamento entre *T. harzianum* e isolado Fc 04 após 4 dias de crescimento (A); Pareamento entre *T. harzianum* e isolado Fc 04 após 8 dias de crescimento (B); Pareamento entre *T. harzianum* e isolado Fc 04 após 12 dias de crescimento (C).

Segundo Ribeiro 2009, os eventos que levam ao micoparasitismo são complexos. Primeiramente, linhagens de *Trichoderma* detectam outro fungo e crescem em direção a ele. O fungo hospedeiro é enrolado pelas hifas do parasita que libera as enzimas degradadoras de parede celular, penetrando no fungo patogênico, utilizando-se dele para obter alimento e por fim, ocasionando sua morte (Santos *et al* 2012). Essa ação, que aqui ocorre, se deve a expressão de enzimas degradadoras de parede celular como exoquitinases (Ribeiro, 2009).

As avaliações *in vitro* servem como uma seleção preliminar para avaliar a capacidade antagonista de agentes biocontroladores promissores, indicando o comportamento do antagonista, facilitando assim uma melhor seleção entre os isolados, observando os mais promissores para futuras avaliações em campo ou

casa de vegetação.

Os resultados dos experimentos realizados neste trabalho, indicam que os isolados de *Bacillus* sp. Bac 1, Bac 2, Bac 3, Bac 4 e Bac 5, e *T. harzianum* possam ser utilizados em experimentos em casa de vegetação ou em campo, devido à suas propriedades como agentes de controle biológico já constadas, principalmente contra os fungos patogênicos do gênero *Fusarium* sp.. Pesquisadores relatam que misturas de diferentes espécies de antagonistas podem permitir a colonização do substrato de forma mais eficiente, melhorando a adaptabilidade às mudanças ambientais e com mecanismos de supressão distintos, inibindo, inclusive, um maior espectro de patógenos (Cavaglieri *et al* 2005). Porém, os isolados Bac 1, Bac 2, Bac 3, Bac 4 e Bac 5 apresentaram antagonismo *in vitro* a *T. harzianum*, dessa forma, se utilizados em conjunto, espaços de tempo entre as aplicações dos agentes biocontroladores se fazem necessárias.

CONCLUSÃO

- Os isolados de *Bacillus* spp. Bac 1, Bac 2, Bac 3, Bac 4 e Bac 5 produzem metabólitos que interferem no crescimento de diferentes espécies de *Fusarium* spp., tornando-os antagonistas promissores.
- *T. harzianum* apresenta antagonismo às espécies de *Fusarium* spp..
- Os isolados de *Bacillus* spp. Bac 1, Bac 2, Bac 3, Bac 4 e Bac 5, apresentam antagonismo significativo a *T. harzianum*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADIBI, A.; REES, E. R.; MCCARLEY, S.; SICA, V. P.; OBERLIES, N. H. CHARACTERIZATION AND ISOLATION OF PEPTIDE METABOLITES OF AN ANTIFUNGAL BACTERIAL ISOLATE IDENTIFIED AS *BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS* SUBSPECIES PLANTARUM STRAIN FZB42. **The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 6, n. 6, p. 1309, 2017.

AKPA, E.; JACQUES, P.; WATHELET, B.; PAQUOT, M.; FUCHS, R.; BUDZIKIEWICZ, H.; THONART, P. Influence of culture conditions on lipopeptide production by *Bacillus subtilis*. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 91, n. 1, p. 551-561, 2001.

AMORIM, E. P. R.; ITAMAR, S. D. Efeito da associação de antagonistas no controle de *Phytophthora parasitica* e *P. citrophthora* em plantulas de citrus. **Summa Phytopathologica.**, p. 335-338. 1999.

ANDERSEN R. A.; HAMILTON-KEMP T. R; HILDEBRAND D. F; MCCRAKEN J.R.C. T; COLLINS R. W; FLEMING P. D. Structure–antifungal activity relationships among C6 and C9 aliphatic aldehydes, ketones and alcohols. **J. Agric. Food Chem.** 42, 1563-1568, 1994.

ASAKA, O.; SHODA, M. Biocontrol of Rhizoctonia solani damping-off of tomato with *Bacillus subtilis* RB14. **Applied and environmental microbiology**, v. 62, n. 11, p. 4081-4085, 1996.

BELAL, E. B.; KAMEL, S. M. H.; HASSAN, M. M. Production of Antimicrobial Metabolites by *Bacillus subtilis* and their Applications. **Biotechnology**, v. 12, n. 1, p. 14, 2013.

BELL, D. K.; WELLS, H. D.; MARKHAM, C. R. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. **Phytopathology**, p. 379-382, 1982.

BESSION, F.; MICHEL, G. Mycosubtilins B and C: minor antibiotics from mycosubtilin-producer *Bacillus subtilis*. **Microbios**, v. 62, n. 251, p. 93-99, 1990.

BETTIOL, W. Controle biológico de doenças do filoplano. In: **Controle biológico de doenças de plantas**. BETTIOL, W. (Org.) Jaguariúna: Embrapa-Cnpda, 1991. p.338, 1991. (EMBRAPA-CNPDA. Documentos, 15).

CARVALHO, D. D.; MELLO, S. C.; LOBO JÚNIOR, M.; SILVA, M. C. Controle de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* in vitro e em sementes, e promoção do crescimento inicial do feijoeiro comum por *Trichoderma harzianum*. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 36, n. 1, p. 28-34, 2011.

CAVAGLIERI, L.; ORLANDO, J. R. M. I.; RODRIGUEZ, M. I.; CHULZE, S.; ETCHEVERRY, M. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against *Fusarium verticillioides* in vitro and at the maize root level. **Research in Microbiology**, v. 156, n. 5-6, p. 748-754, 2005.

CHANG, W. T.; CHEN, C. S.; WANG, S. L. And antifungal chitinase produced by *Bacillus cereus* with shrimp and crab shell powder as a carbon source. **Current Microbiology**, Nova York, v. 47, p. 102-108, 2003.

CHET, I.; INBAR, J.; HADAR, I. Fungal antagonists and mycoparasites. **The mycota IV: environmental and microbial relationships**. Springer-Verlag, Berlin, p. 165-184, 1997.

COOK, R. J.; BAKER, K. F. **The nature and practice of biological control of plant pathogens**. American Phytopathological Society, p.120-170, 1983.

COOK, R. J.; THOMASHOW, L. S.; WELLER, D. M.; FUJIMOTO, D.; MAZZOLA, M.; BANGERA, G.; KIM, D. S. Molecular mechanisms of defense by rhizobacteria against root disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 92(10) 4197-4201, 1995.

EBATA, M.; MIYAZAKI, H.; TAKAHASHI, Y. Studies on subsporin. I. **The Journal of antibiotics**, v. 22, n. 10, p. 467-472, 1969.

EDWARDS, S. G.; SEDDON, B. Mode of antagonism of *Brevibacillus brevis* against *Botrytis cinerea* in vitro. **J. Appl. Microbiolol.** 91:652-659. 2001.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. **Reunião anual da região brasileira da sociedade internacional de biometria**, v. 45, n.2000, p. 235, 2000.

GORDILLO, M. A.; GOMEZ, R. L.; NAVARRO, A. R.; MALDONADO, M. C. Ecotoxicity studies of antifungal metabolites of *Bacillus* sp. IBA 33. **Revista de Toxicología**, v. 32, n. 2, 2015.

GUPTA, A.; GOPAL, M.; TILAK, K. V. B. R. Mechanism of plant growth promotion by rhizobacteria. **Indian journal of experimental biology**, 38(9) 856-862, 2000.

HOFFMANN, C. A., CHAGAS, L. F. B., DA SILVA, D. P., JUNIOR, A. F. C., SCHEIDT, G. N. Potencial de antagonismo de isolados de *Trichoderma* sp. contra o isolados de *Fusarium* sp., in vitro. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 10, n. 1, p. 236-242, 2015.

ISOgai, A.; TAKAYAMA, S.; MURAKOSHI, S.; SUZUKI, A. Structure of β -amino acids in antibiotics iturin A. **Tetrahedron Letters**, v. 23, n. 30, p. 3065-3068, 1982.

KAI, M., EFFMERT, U., BERG, G., PIECHULLA, B. Volatiles of bacterial antagonists inhibit mycelial growth of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*. **Archives of microbiology**, v. 187, n. 5, p. 351-360, 2007.

KATZ, E.; DEMAINE, A. L. The peptide antibiotics of *Bacillus*: chemistry, biogenesis, and possible functions. **Bacteriological reviews**, v. 41, n. 2, p. 449, 1977.

KLUGE, B.; VATER, J.; SALNIKOW, J.; ECKART, K. Studies on the biosynthesis of surfactin, a lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis* ATCC 21332. **FEBS letters**, v.

231, n. 1, p. 107-110, 1988.

KORZYBSKI T.; KOWSZYK-GIFINDER Z.; KURYTOWICZ W. Antibiotics Origin, Nature and Properties. **American Society for Microbiology**, Washington, D.C. pp.501-534, 1978.

KUGLER, M.; LOEFFLER, W.; RAPP, C.; KERN, A.; JUNG, G. Rhizoctin A, an antifungal phosphono-oligopeptide of *Bacillus subtilis* ATCC 6633: biological properties. **Archives of microbiology**, v. 153, n. 3, p. 276-281, 1990.

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

LOUZADA, G. A. S.; CARVALHO, D. D. C.; MELLO, S. C. M.; LOBO JÚNIOR, M.; MARTINS, I.; BRAÚNA, L. M. **Potencial antagônico de *Trichoderma spp.* originários de diferentes agroecossistemas contra *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium solani***. *Biota Neotrop*, v. 9 n. 3, 2009.

MENEZES, J. P. ***Trichoderma spp.* - microrganismo utilizado no controle de fitopatógenos**. 2002. Disponível em:
<<http://www.agronline.com.br/artigos/artigo.php?id=91>> Acesso em: 26 de Março de 2017.

MONTE, E. Understanding *Trichoderma*: between biotechnology and microbial ecology. **International Microbiology**, v. 4, n. 1, p. 1-4, 2001.

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

MOTOMURA, M.; LOURENÇO, C. E.; VENTURINI, D.; UENO, Y.; HIROOKA, E. Y. . Screening and isolation of anti-*Fusarium moniliforme* compounds producing microorganisms from soil and corn. **Revista de Microbiologia**, v. 27, n. 4, p. 213-

217, 1996.

ONGENA, M.; JACQUES, P. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. **Trends in microbiology**, v. 16, n. 3, p. 115-125, 2008.

PEYPOUX, F.; MICHEL, G.; DELCAMBE, L. The structure of Mycosubtilin, an antibiotic isolated from *Bacillus subtilis*. **Eur. J. Biochem.** 63,391-398, 1976.

PEYPOUX, F.; BESSON, F.; MICHEL, G.; DELCAMBE, L. Structure of bacillomycin D, a new antibiotic of the iturin group. **The FEBS Journal**, v. 118, n. 2, p. 323-327, 1981.

RIBEIRO, T. S. **O fungo *Trichoderma* spp. no controle de fitopatógenos: dificuldades e perspectivas** 35f. Monografia (Pós-Graduação Tecnologias Inovadoras no Manejo Integrado de Pragas e Doenças de Plantas) Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2009.

ROCHA, D. J. A.; MOURA, A. B. Biological control of tomato wilt caused by *Ralstonia solanacearum* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* by rhizobacteria. **Tropical Plant Pathology**, v. 38, n. 5, p. 423-430, 2013.

SANTOS, C. C.; OLIVEIRA, F. A.; 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**, v. 8, n. 4 (b), 2012.

SANTOS, E.R.; GOUVEIA, E.R.; MARIANO, R.L.R.; SOUTO-MAIOR, A.M. Controle biológico da mancha aquosa do melão por compostos bioativos produzidos por *Bacillus* spp. **Summa Phytopathologica**, 32,. 376-378, 2006.

SENGUPTA, S.; BANERJEE, A. B.; BOSE, S. K. γ -Glutamyl and D-or L-peptide linkages in mycobacillin, a cyclic peptide antibiotic. **Biochemical Journal**, v. 121, n. 5, p. 839-846, 1971.

SHIFA, H.; GOPALAKRISHNAN, C.; VELAZHAHAN, R. Characterization of

antifungal antibiotics produced by *Bacillus subtilis* G1 antagonistic to *Sclerotium rolfsii*. **Biochem Cell Arch**, v. 15, p. 99-104, 2015.

SHIOMI, H. F.; MINHONI, M. T. Seleção de bactérias endofíticas com ação antagônica a fitopatógenos. **Scientia Agraria**, v. 9, n. 4, p. 535-538, 2008.

SOGLIO, F. K. D. Manejo de doenças na perspectiva da transição agroecológica. In: STADNIK, M. J.; TALAMINI, V. (Eds.). **Manejo Ecológico de Doenças de Plantas**. Florianópolis: CCA/UFSC, p. 293, 2004.

STEIN, T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. **Molecular microbiology**, v. 56, n. 4, p. 845-857, 2005.

WELLER, D. M.; RAAIJMAKERS, J. M.; GARDENER, B. B. M.; THOMASHOW, L. S. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens 1. **Annual review of phytopathology**, 40(1), 309-348, 2002.

WHEATLEY, R. E. The consequences of volatile organic compound mediated bacterial and fungal interactions. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 81, p. 357-364, 2002.

WHIPPS, J. M. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. **Journal of experimental Botany**, 52(1), 487-511, 2001.

ZOU, C. S.; MO, M. H.; GU, Y. Q.; ZHOU, J. P.; ZHANG, K. Q. Possible contributions of volatile-producing bacteria to soil fungistasis. **Soil Biology and Biochemistry**, 39(9), 2371-2379, 2007.

ARTIGO 2

EFICIÊNCIA DE *Bacillus* spp. E *Trichoderma harzianum* NA REDUÇÃO DA INCIDÊNCIA DE MURCHA DE FUSARIUM EM BANANEIRAS CULTIVADAS SOB AMBIENTE PROTEGIDO

¹Artigo a ser submetido ao Comitê Editorial do periódico científico Caatinga, em versão na

íngua inglesa

RESUMO: A banana é uma das frutas mais cultivadas no mundo, se estabelecendo em mais de 120 países, sendo base alimentar de milhões de pessoas. Por apresentar um elevado nível nutricional, a banana compreende um papel estratégico na segurança alimentar e nutricional mundial. O *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc), é o agente causal da doença mais ameaçadora aos bananais, conhecida como mal-do-Panamá ou murcha de fusarium. Atualmente, o único controle efetivo dessa doença se apresenta somente por meio do plantio de variedades resistentes, porém, a resistência dessas variedades pode ser suplantada por uma pressão de inóculo ou por um variante de Foc. Neste contexto, a proposta do presente estudo foi avaliar o potencial de biocontrole de isolados de *Bacillus* spp. denominados Bac 1, Bac 2, Bac 3, Bac 4 e Bac 5, e *Trichoderma harzianum* utilizados em conjunto, em diferentes períodos de aplicação, sobre Foc *in vivo*, na cultivar Prata Anã, em casa de vegetação. Para isso, foram realizados dois experimentos, no primeiro, os isolados de *Bacillus* spp. foram adicionados a sacos com substrato infestado com Foc aos, 15, 30, 45 e 60 dias antes de *T. harzianum*. E no segundo experimento, *T. harzianum* foi adicionado a sacos com substrato infestado com Foc aos, 15, 30, 45 e 60 dias antes dos isolados de *Bacillus* spp.. Ao final dos experimentos os resultados foram analisados e foi observado que a utilização dos agentes de controle biológico em conjunto reduziu o índice de doença em mudas de bananeira da variedade Prata-Anã, sendo o tratamento com aplicação do isolado de *Bacillus* spp. Bac 1, 30 dias antes da inoculação de *T. harzianum* no substrato já infestado com Foc (Bac 1 + Foc + *T. harzianum* 30) e o tratamento com aplicação do isolado de *Bacillus* spp. Bac 3 45 dias antes da inoculação de *T. harzianum* no substrato já infestado com Foc (Bac 3 + Foc + *T. harzianum* 45) os mais eficientes na redução da incidência do mal-do-Panamá, reduzindo em 94% e 84% respectivamente a incidência da doença. Também foi observado que *T. harzianum* promoveu significativamente o crescimento de mudas de bananeiras da cultivar Prata-Anã.

Palavras chaves: *Musa* spp., mal-do-Panamá, controle biológico, promoção de

crescimento.

ABSTRACT: The banana is one of the most cultivated in the world, settling in over 120 countries, being food base of millions of people. By presenting a high nutritional level, the banana has a strategic role in food security and nutrition world. The *Fusarium oxysporum* f. Sp. *Cubense* (Foc), is the causal agent of the disease more threatening to the banana plantations, known as Panama disease or fusarium wilt. Currently, the only effective control of this disease presents itself only through the planting of resistant varieties, however, the resistance of these varieties may be supplanted by a pressure of inoculum, or a variant of Foc. In this context, the purpose of this study was to evaluate the potential for biocontrol of isolates of *Bacillus* spp. called Bac 1, Bac 2, Bac 3, Bac 4 and Bac 5, and *Trichoderma harzianum* used together, in different periods of application, on Foc *in vivo*, in cultivar Prata Anã, in a greenhouse. For this reason, two experiments were carried out in the first, the isolates of *Bacillus* spp. were adcionados the bags with Infested substrates with Foc to, 15, 30, 45 and 60 days before *t. Harzianum*. And in the second experiment, *T. Harzianum* was adcionado the bags with Infested substrates with Foc to, 15, 30, 45 and 60 days prior of the isolates of *Bacillus* spp.. At the end of the experiments the results were analyzed and it was observed that the use of the agents of biological control in combination reduced the rate of disease in seedlings of banana trees of the variety Prata-Anã and treatment with application of the isolate of *Bacillus* spp. Bac 1, 30 days before inoculation of *T. Harzianum* on the substrate is already infested with Foc (Bac 1 + Foc + *T. Harzianum* 30) and the treatment with application of the isolate of *Bacillus* spp. Bac 3 45 days before inoculation of *T. Harzianum* on the substrate is already infested with Foc (Bac 3 + Foc + *T. Harzianum* 45) the most efficient in reducing the incidence of Panama disease, reducing in 94% and 84%, respectively, the incidence of the disease. It was also observed that *T. Harzianum* promoted significantly the growth of seedlings of banana plants of the cultivar Prata-Anã.

Keywords: *Musa* spp., Panama disease, biological control, growth promotion.

INTRODUÇÃO

A banana é uma das frutas mais cultivadas no mundo, se estabelecendo em mais de 120 países, sendo base alimentar de milhões de pessoas, principalmente nas regiões tropicais da Ásia, África e Américas do Sul e Central (Aurore *et al* 2009). A área total cultivada no mundo corresponde a 5,1 milhões de hectares, alcançando uma produtividade de 107 milhões de toneladas (FAO, 2013). Cerca de 87% das bananas que são produzidas no mundo são consumidas pelos produtores ou vendidas em mercados locais ou regionais. O restante, cerca de 13%, são exportados pelos países produtores movimentando US\$ 8,9 bilhões (FAO, 2013). O Brasil é reponsável por uma grande parcela da produção, sempre figurando entre os cinco maiores produtores mundiais (FAO, 2013).

Por apresentar um elevado nível nutricional, a banana representa um papel estratégico na segurança alimentar e nutricional mundial (Silva Neto & Guimarães, 2011). A bananicultura apresenta importante papel social no Brasil, uma vez que é fonte de renda, principalmente para pequenos produtores rurais, o que permite a fixação de mão-de-obra no campo (Mascarenhas, 1997). A Bahia é o maior produtor, sendo grande parte da produção oriunda da agricultura familiar.

A bananeira é afetada por diversos problemas fitossanitários causados por fungos, bactérias, vírus, nematóides e insetos (Cordeiro, 2004). Porém, as doenças fúngicas destacam-se como as mais destrutivas. O *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc), é agente causal da doença mais ameaçadora aos bananais, conhecida como mal-do-Panamá ou murcha de fusarium. Uma doença vascular endêmica no Brasil, que pode inviabilizar o plantio de cultivares suscetíveis, como a Maçã e a Prata que são de grande aceitação no mercado nacional.

Pesquisadores têm estudado diferentes manejos para reduzir a gravidade da doença, como métodos fisiológicos, químicos e biológicos (Fortunato *et al*, 2012). O único controle efetivo dessa doença se apresenta somente por meio do plantio de variedades resistentes (Cordeiro & Kimati, 1997), como as cultivares do subgrupo Cavendish (Nanica, Nanicão, Grande Naine), que vem sendo utilizadas em áreas com altos índices de infestação de Foc.

É imprescindível o desenvolvimento e ampliação de tecnologias alternativas no manejo dessa doença, que minimizem os prejuízos causados pelo Foc. Nesse

cenário, a utilização de Agentes de Controle Biológico (ACBs), que apresentem eficiência no controle de doenças causadas por patógenos de solo, pode ser uma alternativa de controle ecologicamente correta e economicamente viável. Essa estratégia pode viabilizar o plantio das cultivares mais suscetíveis à doença como a Maçã e a Prata em áreas com a presença de *Foc*.

Dentre os microrganismos que apresentam potencial como ACB, destacam-se os fungos do gênero *Trichoderma* spp.. A capacidade antagônica inerente a esse fungo é atribuída a atividade sinérgica de vários mecanismos de ação que atuam de forma direta sobre o patógeno como a competição por nutrientes e espaço, produção de enzimas que degradam a parede celular de outros fungos e micoparasitismo. Entretanto, a presença de *Trichoderma* pode agir de forma indireta beneficiando a planta, pois, possui a capacidade de induzir resistência em plantas, promover crescimento vegetal e aumentar a absorção de nutrientes (Harman, 2000; Brunner, 2005; Harman, 2011).

Espécies de bactérias do gênero *Bacillus* spp., se destacam entre os ACBs, por produzirem uma série de antibióticos e várias outras substâncias antimicrobianas (Edwards & Seddon 2001). Como as bactérias crescem rapidamente, utilizam diversas fontes de nutrientes e sobrevivem em ampla faixa de temperatura, espera-se que sejam bons agentes de biocontrole (Cook & Baker, 1983). Morandi & Bettiol (2009), relatam que dentre os microrganismos com potencial para biocontrole de doenças de plantas, a bactérias do gênero *Bacillus* sp. e espécies do fungo *Trichoderma* spp. são os mais utilizados. No entanto, informações relativas a utilização combinada de espécies de *Trichoderma* e *Bacillus*, especialmente no controle biológico de doenças é escassa, apesar de ambos serem bem conhecidos por sua ação como ACBs e como promotores de crescimento de plantas (Yobo, 2011).

Com isso, a proposta do presente estudo foi avaliar o potencial de biocontrole de isolados de *Bacillus* sp. e *Trichoderma harzianum* utilizados em conjunto, em diferentes períodos de aplicação, sobre *Foc in vivo* na cultivar Prata Anã, em casa de vegetação.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia e em casa de vegetação da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas-BA. O isolado de *T. harzianum* utilizado para os experimentos foi isolado de solo em um trabalho conjunto entre a Embrapa e a Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB). Dos cinco isolados de *Bacillus* utilizados, os isolados Bac 1, Bac 2, Bac 3 e Bac 4 foram obtidos junto ao Laboratório de Microbiologia do Solo e Resíduos Orgânicos da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas-BA, e o isolado Bac 2, foi adquirido na Clínica Fitosanitária da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), Cruz das Almas-BA. O isolado 218A de Foc foi adquirido na coleção de microrganismos do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas-BA.

Para avaliar o potencial antagônico dos isolados Bac 1, Bac 2, Bac 3, Bac 4 e Bac 5 de *Bacillus* sp. e de *T. harzianum* a Foc, foram realizados dois experimentos simultâneos. Por serem microrganismos que em testes *in vitro* não apresentaram compatibilidade, as aplicações dos ACBs foram separados em espaços de 15 dias entre si. No primeiro experimento, as bactérias foram aplicadas dois dias após a infestação do substrato com Foc, posteriormente, foram feitas aplicações únicas de *T. harzianum* 15, 30, 45 e 60 dias após a aplicação da bactéria. No segundo experimento, a ordem foi invertida, *T. harzianum* foi aplicado dois dias após a infestação do substrato com Foc e as bactérias foram aplicadas 15, 30, 45 e 60 dias após a aplicação da bactéria.

Produção de inóculo de *Trichoderma harzianum* e Foc

O isolado 218A de Foc foi multiplicado em meio de cultura BDA (Batata, Dextrose e Agar) durante 7 dias, em BOD a 25 °C e fotoperíodo de 12 horas. Após esse período, cinco placas tomadas por colônias de Foc tiveram o conteúdo transferidos para sacos plásticos de 5 kg, contendo meio de cultura areia-fubá (4 kg de areia lavada + 1 kg de fubá de milho + 500 ml de água destilada esterilizada, autoclavados durante três dias consecutivos a 120°C por 20 minutos). Em seguida os sacos foram colocados em BOD a 25°C e fotoperíodo de 12 horas, onde

permaneceram por 30 dias. Esse mesmo procedimento foi realizado para a produção do inóculo de *T. harzianum*.

Para quantificação das unidades formadoras de colônias (UFC) de *Foc/T. harzianum*, foi utilizada a técnica de diluição em série. Em um tubo de ensaio, 10 g do inóculo areia-fubá foi misturado em 90 ml de água destilada esterilizada. Em seguida, realizou-se a diluição da suspensão inicial retirando 1 ml da solução e colocando em um tubo de ensaio com 9 ml de água destilada esterilizada, esse processo foi repetido até chegar a diluição 10^{-6} . Uma alíquota das suspensões 10^{-5} e 10^{-6} foram plaqueadas em meio BDA em triplicata. Posteriormente, as placas foram mantidas em BOD a 25°C e após 48 horas, realizou-se a quantificação do inóculo por meio da contagem do UFC e o inóculo foi ajustado para 10^6 UFC/grama de substrato.

Multiplicação dos isolados de *Bacillus* sp.

A multiplicação dos cinco isolados de *Bacillus* sp. foi realizada utilizando meio líquido BD (batata-dextrose). Para isso, os isolados foram cultivados em meio de cultura BDA por 48 horas. Após esse período, 5 ml de água destilada estéril foi adicionado em cada placa e as células bacterianas foram desprendidas do meio de cultura com o auxílio de uma alça de Drigalski. A suspensão bacteriana resultante foi vertida para erlenmeyers de 5 L contendo meio líquido BD, sendo vedados com plástico filme. Os erlenmeyers foram deixados em temperatura ambiente durante 15 dias com agitação manual diária. Esse procedimento foi adotado somente para a primeira aplicação que precisou de maior quantidade de calda bacteriana, para as aplicações quinzenais, as mesmas técnicas foram empregadas, porém, o número de placas de bactérias utilizadas foi reduzido para duas, em erlenmeyers de 1,5 L e o período de crescimento reduzido para 7 dias.

Após o período de crescimento, foi realizada a contagem de UFC das caldas, em um tubo de ensaio, 1 ml da calda foi misturado em 9 ml de água destilada esterilizada. Em seguida, realizou-se a diluição da suspensão inicial retirando 1 ml da solução e colocando em um tubo de ensaio com 9 ml de água destilada esterilizada, esse processo foi repetido até chegar a diluição 10^{-8} . Uma alíquota das suspensões 10^{-7} e 10^{-8} foram plaqueadas em meio de cultura BDA em triplicata.

Posteriormente, as placas foram mantidas em BOD a 30 °C e após 24 horas, realizou-se a quantificação do inóculo por meio da contagem do UFC e o inóculo foi ajustado para 10^8 UFC/ml. Durante as 24 horas do crescimento das placas, as caldas foram mantidas em geladeira para diminuir a multiplicação das células.

Material vegetal

As mudas da cultivar Prata Anã utilizadas no experimento foram obtidas a partir de micropropagação, e aclimatadas em casa-de-vegetação.

Montagem dos experimentos

Foram utilizados sacos plásticos de 1,5L preenchidos com mistura de substrato industrializado (70%) e fibra de coco (30%). O substrato foi infestado com 100 g de inóculo de Foc a 10^6 UFC/grama de substrato. Os tratamentos compostos pelos isolados Bac 1, Bac 2, Bac 3, Bac 4 e Bac 5 de *Bacillus* sp. e *T. harzianum* foram adicionados aos sacos com substrato infestado com Foc, aplicando-se 100 ml de calda de *Bacillus* a 10^8 UFC/ml e 100 g de inóculo de *T. harzianum* a 10^6 UFC/grama de substrato, em cada saco. As aplicações foram únicas, sendo realizadas aos 15, 30, 45 e 60 dias, divididas em dois experimentos distintos.

No primeiro experimento, após dois dias da infestação dos sacos com Foc, foram adicionadas as caldas de *Bacillus* sp., posteriormente, o inóculo de *T. harzianum* foi adicionado aos 15, 30, 45 e 60 dias depois das caldas, por exemplo: Tratamento Bac 1 + Foc + *T. harzianum* 15 (Isolado Bac 1 aplicado dois dias após infestação com Foc e *T. harzianum* adicionado 15 dias depois do isolado Bac 1); Bac 1 + Foc + *T. harzianum* 30 (Isolado Bac 1 aplicado dois dias após infestação com Foc e *T. harzianum* adicionado 30 dias depois do isolado Bac 1); Bac 1 + Foc + *T. harzianum* 45 (Isolado Bac 1 aplicado dois dias após infestação com Foc e *T. harzianum* adicionado 45 dias depois do isolado Bac 1); Bac 1 + Foc + *T. harzianum* 60 (Isolado Bac 1 aplicado dois dias após infestação com Foc e *T. harzianum* adicionado 60 dias depois do isolado Bac 1).

Os controles foram constituídos de aplicações isoladas de cada *Bacillus* sp. e de *T. harzianum*, sem nenhum tratamento e somente aplicação de Foc, por exemplo: Controle (Sacos com substrato sem aplicação); Controle Foc Início (Mudas

plantadas no dia da infestação com Foc) Controle Foc 60 (Apenas substrato infestado com Foc 60 dias antes do plantio) Controle *T. harzianum* (Apenas *T. harzianum*); Controles com os isolados de *Bacillus* sp. (Bac 1, Bac 2, Bac 3, Bac 4 ou Bac 5); *T. harzianum* + Foc (*T. harzianum* aplicado dois dias após infestação com Foc); *Bacillus* + Foc (Isolado de *Bacillus* aplicado dois dias após infestação com Foc). Todos os outros tratamentos do experimento seguiram o mesmo padrão variando os isolados de *Bacillus* sp. (Bac 1, Bac 2, Bac 3, Bac 4 ou Bac 5). Além disso, no segundo experimento, os tratamentos foram os mesmos, porém a aplicação de *T. harzianum* foi realizada dois dias após a infestação dos sacos com Foc.e os isolados de *Bacillus* adicionados após os intervalos de 15, 30, 45 e 60 dias.

Após a última aplicação dos tratamentos, ou seja, 62 dias após a infestação do substrato com Foc, as mudas de banana tipo Prata-Anã foram plantadas nos substratos tratados, em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com 7 repetições.

Após 65 dias da inoculação, as plantas foram removidas do substrato e avaliadas quanto à descoloração do rizoma segundo escala de notas de Cordeiro *et al.* (1993): 1: ausência de sintomas, 2: pontos isolados de infecção, 3: descoloração de até 1/3 do anel formado pela região de origem das raízes, 4: descoloração entre 1/3 e 2/3 do anel, 5: descoloração acima de 2/3 do anel e 6: total descoloração do rizoma. A partir dessas notas, serão calculados os índices da doença (ID), para sintomas externos e internos, utilizando a formula de Mckinney (Mckinney, 1923), onde $ID = \frac{\sum (\text{grau da escala} \times \text{frequência}) \times 100}{(n^\circ \text{ total de unidades} \times \text{grau máximo da escala})}$.

A fim de avaliar os melhores tratamentos testados, os valores de ID foram submetidos a análise de componentes principais e, posteriormente, a análise de cluster hierárquico. Para isso, utilizou-se o critério baseado no ganho na inércia para reter os primeiros componentes associados com a maior variância dos dados e gerar os grupamentos dos tratamentos por meio do algoritmo k-médias. As análises foram realizadas com auxílio do pacote FactorMineR (Lê *et al* 2008).

Além da descoloração do rizoma, foram avaliadas as seguintes variáveis: altura (ALT) entre a base do pseudocaule até a última folha totalmente aberta; o diâmetro do pseudocaule (DIAM), mensurado com o auxílio de um paquímetro; número de folhas (NF); fitomassa fresca da parte aérea (FFPA); fitomassa seca da parte aérea (FSPA); fitomassa fresca do sistema radicular (FFSR) e fitomassa seca

do sistema radicular (FSSR). Para isso, as mudas foram mantidas em estufa a 60 °C por cinco dias, posteriormente, obteve-se fitomassa da parte aérea e raízes secas.

Os dados foram tabulados e analisados por ANOVA e teste de médias (Scott e Knott a 5% de probabilidade) utilizando o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2000).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento 1

É possível observar na Figura 2, que o índice de doença (ID) nas mudas de banana tipo Prata-anã foi reduzido em diferentes porcentagens, dependendo da combinação entre o isolado de *Bacillus* spp. e o espaço de tempo entre as aplicações de *T. harzianum*. Como em estudos *in vitro* foi verificado que os isolados de *Bacillus* spp. e *T. harzianum* não são compatíveis, o presente estudo utilizou espaço de tempo entre as aplicações, para que os isolados bacterianos pudessem agir reduzindo o nível de inóculo de Foc e posteriormente, *T. harzianum* pudesse ser adicionado ao substrato sem ser antagonizado pela bactéria.

Dentre os tratamentos, os que foram aplicados o isolado Bac 1 e *T. harzianum* 15, 30, 45 e 60 dias após, foram os que apresentaram melhores resultados, reduzindo as porcentagens de ID nas mudas. O Tratamento Bac 1 + Foc + *T. harzianum* 30 destaca-se, pois foi o que apresentou menor porcentagem de ID (2,8%), o que representa 94% a mais na redução de ID, se comparado com a testemunha que apresentou 54,3% de ID. O ID apresentado pelas mudas submetidas ao tratamento Bac 1 + Foc + *T. harzianum* 30, também foram menores que as testemunhas com aplicação de apenas Foc e *T. harzianum* (Controle *T. harzianum* + Foc), e Foc e isolado Bac 1 (Foc + Bac 1), que apresentaram 28,6% e 34,3% de ID respectivamente. Comparando o tratamento Bac 1 + Foc + *T. harzianum* 30 com os outros tratamentos com aplicações de Bac 1 antes e *T. harzianum* depois, verifica-se que o espaço de tempo entre as aplicações foram fundamentais para que cada ACB pudesse agir sem se antagonizarem. Aplicando *T. harzianum* 15 dias após o isolado Bac 1 (Bac 1 + Foc + *T. harzianum* 15), o ID

apresentado foi de 20%, provavelmente a quantidade de metabólitos antifúngicos produzidos pela bactéria no substrato ainda era elevado, o que além de afetar o desenvolvimento do fungo patogênico, também afetou negativamente o crescimento de *T. harzianum*. Já na aplicação de *T. harzianum* 30 dias após o isolado Bac 1 (Bac 1 + Foc + *T. harzianum* 30), os metabólitos produzidos pela bactéria já estavam em menor quantidade, proporcionando assim, que o *T. harzianum* se desenvolvesse e continuasse a ação sobre as estruturas e propágulos de Foc ainda presentes no substrato. O segundo tratamento que apresentou maior redução na porcentagem de ID foi o Bac 3 + Foc + *T. harzianum* 45 (8,5), diminuindo em 84 % a porcentagem de incidência do mal-do-Panamá se comparado ao controle. Em relação a aplicação de apenas *T. harzianum* em substrato infestado (*T. harzianum* + Foc), o tratamento Bac 3 + Foc + *T. harzianum* 45 foi 71% mais eficiente na redução do ID.

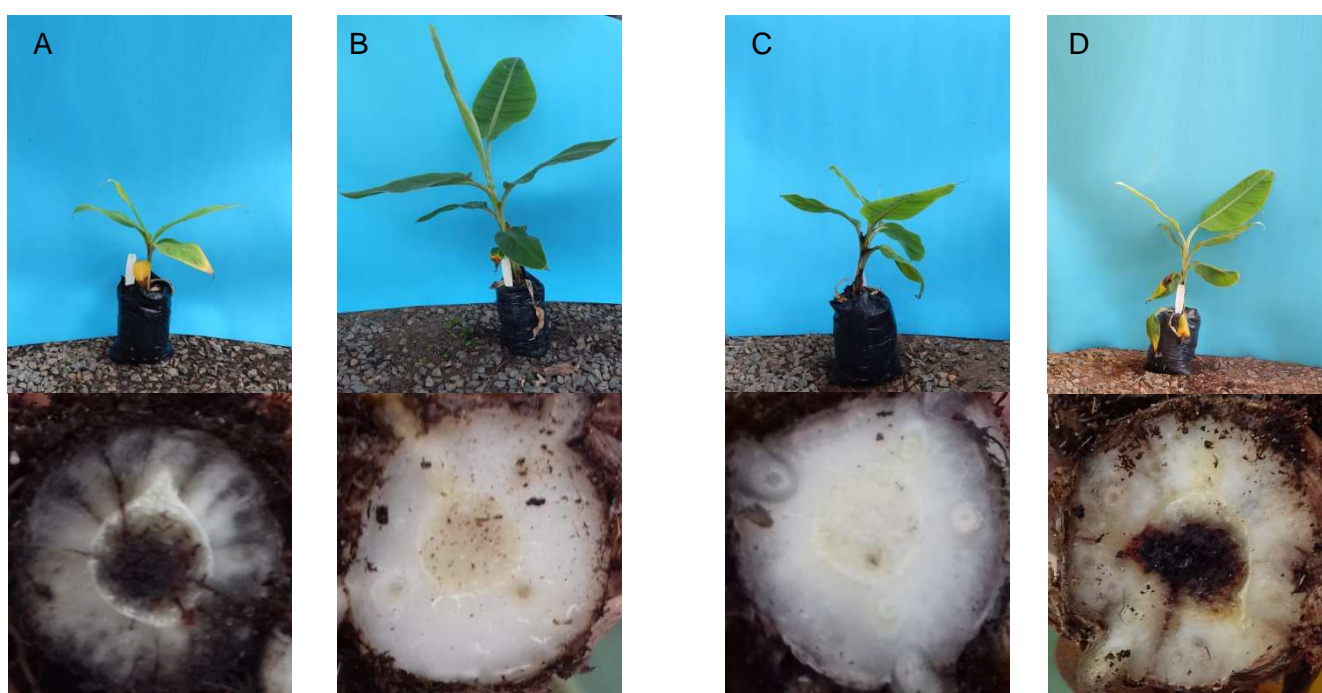


Figura 1- Sintomas externos e internos em mudas de bananeira tipo Prata-Anã após 65 dias do plantio; Tratamento Testemunha com Foc (A), com seu respectivo rizoma apresentando sintoma interno; Tratamento Bac 1 + Foc + *T. harzianum* 30, com seu respectivo rizoma não apresentando sintomas internos (B); Tratamento Testemunha com seu respectivo rizoma sem apresentar sintoma interno; Tratamento *T. harzianum* + Foc+ Bac 5 -60, com seu respectivo rizoma apresentando sintomas internos (D).

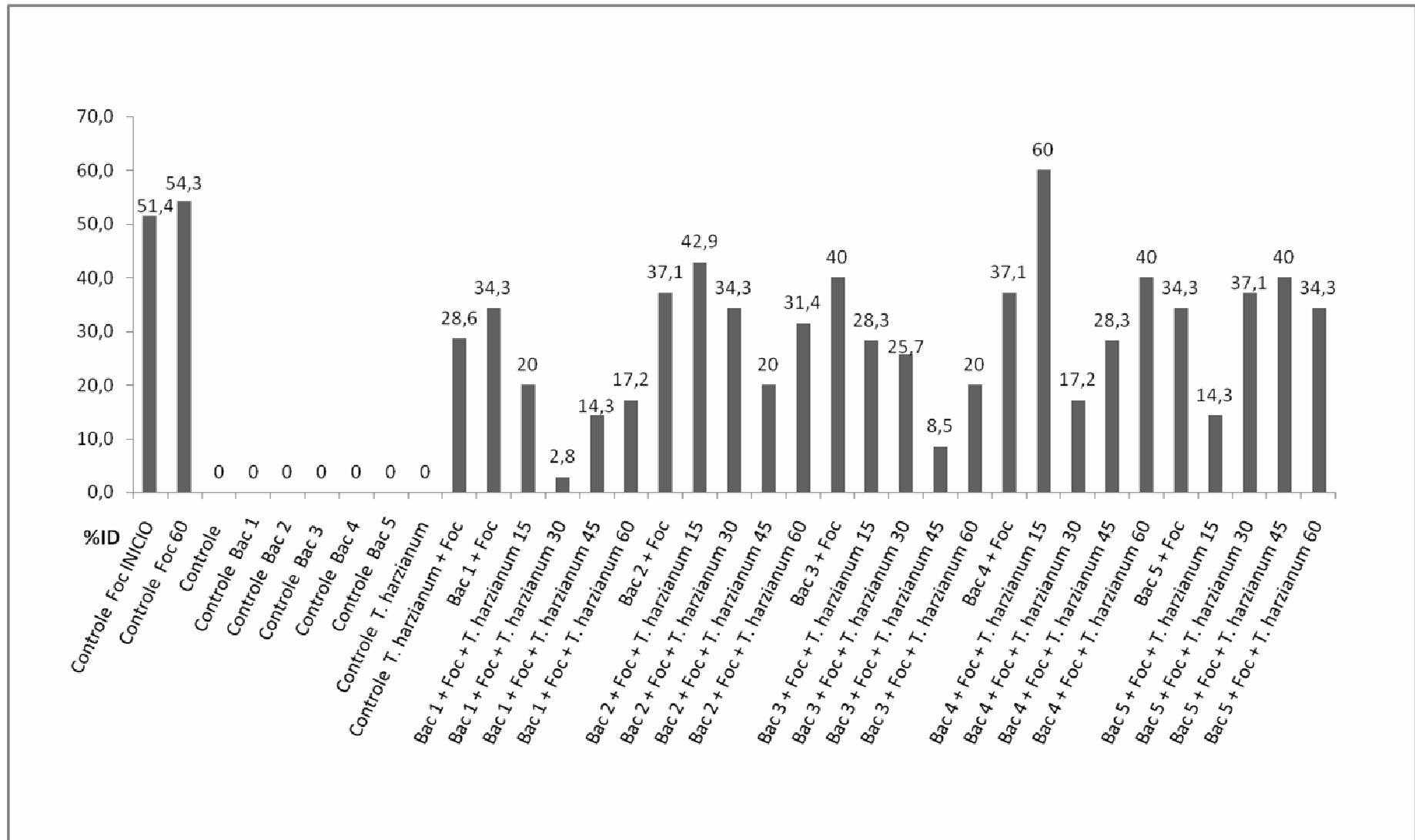


Figura 2 – Porcentagem do índice de doença (ID) apresentado por cada tratamento do experimento 1, calculados a partir dos sintomas internos de Foc em mudas de bananeira 'Prata-anã' cultivadas em casa de vegetação, após 65 dias.

Após a avaliação do ID, foi realizada análise cluster hierárquico, que apontou três grupos (G1, G2, G3, G4 e G5) a partir do corte no dendrograma (Figura 3). No G1, ficaram os tratamentos que apresentaram maior redução no ID, Bac 1 + Foc + *T. harzianum* 30 e Bac 3 + Foc + *T. harzianum* 45. Entretanto, observado o G2, que é o segundo grupo de tratamentos que apresentou maior redução nos índices de ID, os outros tratamentos com aplicação da Bac 1 + *T. harzianum* estão presentes, independente do tempo de aplicação. Esse fato está correlacionado com o Artigo 1, que nos experimentos avaliando o antagonismo *in vitro* entre a Bac 1 e *T. harzianum*, foi observado que os níveis de antagonismo proporcionados pela bactéria foram baixos ou inesistentes. Já a Bac 3, apresentou um alto índice de inibição a *T. harzianum* nos experimentos *in vitro*, fato que pode ser correlacionado com a análise de agrupamento, pois no G2, aparece apenas o tratamento Bac 3 + Foc + *T. harzianum* 60, já os tratamentos com aplicação de *T. harzianum* em espaços de tempo mais curtos em relação a Bac 3 (15 e 30 dias), foram menos eficientes na redução de ID. Demonstrando que os metabólitos produzidos pela Bac 3 ainda estavam presentes no substrato, em quantidades suficientes para antagonizar *T. harzianum*.

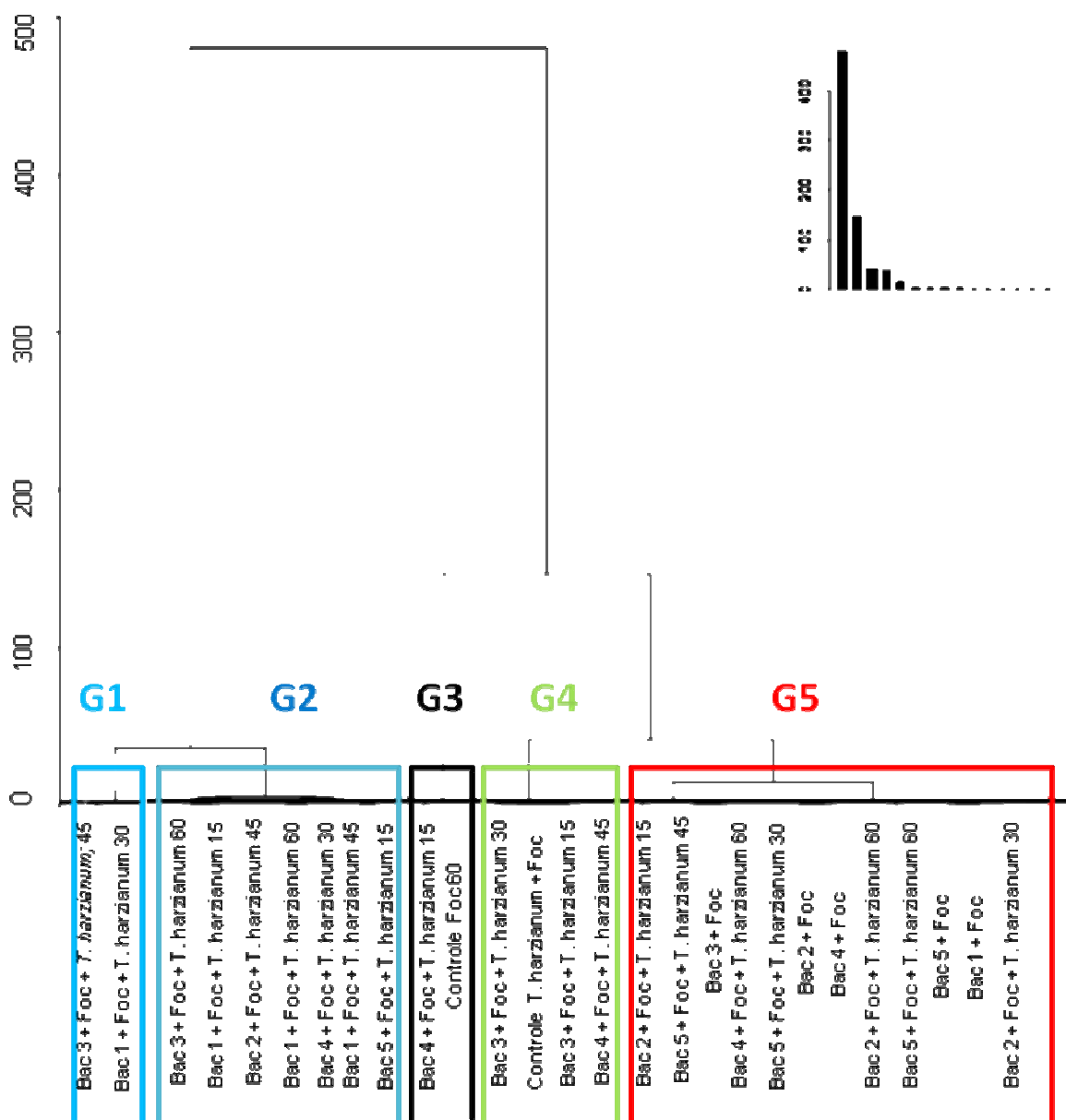


Figura 3 - Agrupamento hierárquico dos tratamentos testados para o controle do mal do Panamá no experimento 1. Os tratamentos foram ordenados de acordo com a sua coordenada no primeiro componente principal.

Diversos autores relatam a redução da incidência da doença em bananeiras inoculadas com Foc utilizando microrganismos. Tan *et al* 2015, em experimentos com mudas de bananeiras inoculadas com Foc raça 4 em casa de vegetação, reduziram em 78 % a incidência da doença utilizando bactéria endofítica. Já Taribuka *et al* 2017, avaliaram isolados de *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma asperellum*, *Trichoderma gamsii* e *Trichoderma koningiopsis* e reduziram em 60% a incidência de Foc em bananeiras.

Pérez *et al* 2009, verificaram que a depender do tempo de aplicação de

Trichoderma no solo já infestado com Foc, antes do plantio das mudas de banana, a porcentagem de incidência da doença pode reduzir ou aumentar. Inoculando *Trichoderma harzianum* 7 dias antes do plantio, a incidência da doença verificada foi de 0%, já com inoculação de *Trichoderma harzianum* no mesmo dia do plantio, a incidência de infestação subiu para 40%. Esses resultados estão de acordo com o observado na Figura 1, que em geral, demonstrou que *T. harzianum* quando inoculado no dia do plantio, apresenta porcentagem de ID maior do que quando inoculado antes do plantio. Adicionando *T. harzianum* antes do plantio, o fungo tem tempo para desenvolver melhor seus diversos mecanismos de ação sobre o patógeno.

Com relação aos parâmetros de desenvolvimento avaliados (Tabela 1), os tratamentos Bac 1 + Foc + *T. Harzianum* 30 e Bac 4 + Foc + *T. Harzianum* 45, foram os que apresentaram melhores resultados. Na variável altura (ALT), eles diferiram estatisticamente dos outros tratamentos, apresentando 27,40 cm no tratamento Bac 1 + Foc + *T. Harzianum* 30 e 26,40 cm de média para o tratamento Bac 4 + Foc + *T. Harzianum* 45. Comparando com o controle, as mudas tratadas com Bac 1 + Foc + *T. Harzianum* 30 foram em média, 77,9% maiores (Figura 4), e as tratadas com Bac 4 + Foc + *T. Harzianum* 45, foram 71% maiores que o controle. Esses resultados são associados a já relatada promoção de crescimento de plantas proporcionado por isolados de *Trichoderma*, pois, ao comparar os melhores tratamentos Bac 1 + Foc + *T. Harzianum* 30 e Bac 4 + Foc + *T. Harzianum* 45, com as mudas tratadas apenas com os isolados de *Bacillus* spp. correspondentes aos tratamentos, verifica-se que o tratamento Bac 1 + Foc + *T. Harzianum* 30 foi 82, 6% superior ao tratamento Controle Bac 1. E o tratamento Bac 4 + Foc + *T. Harzianum* 45 foi 91, 3% superior ao Controle Bac 4.

Tabela 1 – Variáveis das mudas avaliadas após 65 dias do plantio; Altura (ALT), diâmetro do pseudocaule (DIAM), número de folhas (NF), massa fresca da parte aérea (MPAF), massa fresca do sistema radicular (MSRF), massa seca da parte aérea (MPAS) e massa seca do sistema radicular (MSRS).

Tratamentos	Variáveis						
	ALT	DIAM	NF	MPAF	MSRF	MPAS	MSRS
Controle Foc Início	18,64 e	1,38 c	7,40 a	22,18 d	9,24 b	4,26 a	2,16 a
Controle Foc 60	17,60 e	1,84 a	5,60 a	38,32 c	11,62 b	3,14 b	1,50 b
Controle	15,40 f	1,66 b	4,60 b	19,02 d	11,82 b	1,74 d	1,16 b
Controle Bac 1	15,00 f	1,62 b	5,00 b	19,22 d	14,32 a	1,74 d	1,56 a
Controle Bac 2	13,60 f	1,44 c	4,60 b	15,68 d	11,04 b	1,62 d	1,28 b
Controle Bac 3	13,80 f	1,58 b	4,60 b	15,94 d	13,88 b	1,66 d	1,60 a
Controle Bac 4	13,80 f	1,52 b	4,80 b	14,86 d	11,64 b	1,50 d	1,22 b
Controle Bac 5	15,20 f	1,70 a	4,40 b	20,72 d	11,22 b	1,46 d	0,88 b
Controle <i>T. harzianum</i>	22,40 c	1,86 a	6,00 a	37,46 c	19,78 a	3,52 b	2,60 a
Controle <i>T. harzianum</i> + foc	22,40 c	1,74 a	5,60 a	53,32 a	17,60 a	4,08 a	1,86 a
Bac 1 + Foc	18,80 e	1,68 a	5,20 b	37,86 c	15,30 a	3,02 b	1,96 a
Bac 1 + Foc + <i>T. harzianum</i> 15	22,80 c	1,80 a	5,40 a	56,40 a	17,68 a	3,46 b	1,88 a
Bac 1 + Foc + <i>T. harzianum</i> 30	27,40 a	1,82 a	6,60 a	59,84 a	17,30 a	4,30 a	2,64 a
Bac 1 + Foc + <i>T. harzianum</i> 45	23,80 b	1,80 a	6,00 a	53,44 a	16,02 a	3,34 b	1,60 a
Bac 1 + Foc + <i>T. harzianum</i> 60	20,60 d	1,78 a	5,80 a	56,64 a	22,52 a	3,66 a	2,36 a
Bac 2 + Foc	18,20 e	1,78 a	5,80 a	44,04 b	20,52 a	3,34 b	2,16 a
Bac 2 + Foc + <i>T. harzianum</i> 15	24,40 b	1,82 a	5,80 a	56,94 a	18,76 a	3,96 a	2,92 a
Bac 2 + Foc + <i>T. harzianum</i> 30	23,60 b	1,80 a	5,60 a	52,52 a	16,00 a	3,24 b	2,06 a
Bac 2 + Foc + <i>T. harzianum</i> 45	22,40 c	1,80 a	6,40 a	53,30 a	18,46 a	4,68 a	2,30 a
Bac 2 + Foc + <i>T. harzianum</i> 60	19,20 e	1,68 a	5,60 a	37,50 c	15,92 a	3,12 b	1,82 a
Bac 3 + Foc	18,80 e	1,74 a	6,00 a	44,48 b	17,94 a	2,92 b	2,12 a
Bac 3 + Foc + <i>T. harzianum</i> 15	23,80 b	1,72 a	5,80 a	58,02 a	20,64 a	3,78 a	2,12 a
Bac 3 + Foc + <i>T. harzianum</i> 30	23,80 b	1,76 a	6,00 a	57,54 a	18,92 a	3,82 a	1,88 a
Bac 3 + Foc + <i>T. harzianum</i> 45	24,20 b	1,76 a	5,80 a	54,32 a	19,24 a	3,66 a	1,66 b
Bac 3 + Foc + <i>T. harzianum</i> 60	20,20 d	1,64 b	5,40 a	45,10 b	16,40 a	3,24 b	1,74 b
Bac 4 + Foc	14,40 f	1,40 c	5,00 b	27,38 d	16,28 a	2,04 d	1,42 a
Bac 4 + Foc + <i>T. harzianum</i> 15	20,80 d	1,54 b	5,80 a	43,24 b	18,10 a	2,90 b	2,30 a
Bac 4 + Foc + <i>T. harzianum</i> 30	24,60 b	1,64 b	5,60 a	53,88 a	17,28 a	3,82 a	1,86 a
Bac 4 + Foc + <i>T. harzianum</i> 45	26,40 a	1,88 a	5,20 b	67,36 a	19,58 a	3,96 a	2,38 a
Bac 4 + Foc + <i>T. harzianum</i> 60	19,40 e	1,72 a	5,80 a	49,10 b	18,80 a	2,72 c	2,16 a
Bac 5 + Foc	16,80 e	1,60 b	5,60 a	35,38 c	19,52 a	2,18 c	2,26 a
Bac 5 + Foc + <i>T. harzianum</i> 15	24,40 b	1,86 a	5,80 a	63,28 a	20,84 a	3,32 b	2,10 a
Bac 5 + Foc + <i>T. harzianum</i> 30	23,60 b	1,76 a	5,80 a	53,54 a	17,68 a	3,64 a	1,92 a
Bac 5 + Foc + <i>T. harzianum</i> 45	24,20 b	1,76 a	6,00 a	56,76 a	21,50 a	3,42 b	2,32 a
Bac 5 + Foc + <i>T. harzianum</i> 60	18,20 e	1,64 b	6,00 a	41,50 b	19,90 a	2,58 c	1,96 a
CV%	8,25	9,06	13,77	18,66	25,74	21,01	30,12

*Médias seguidas por letras distintas diferem entre si, pelo teste de Scott knott, a 5% de probabilidade.

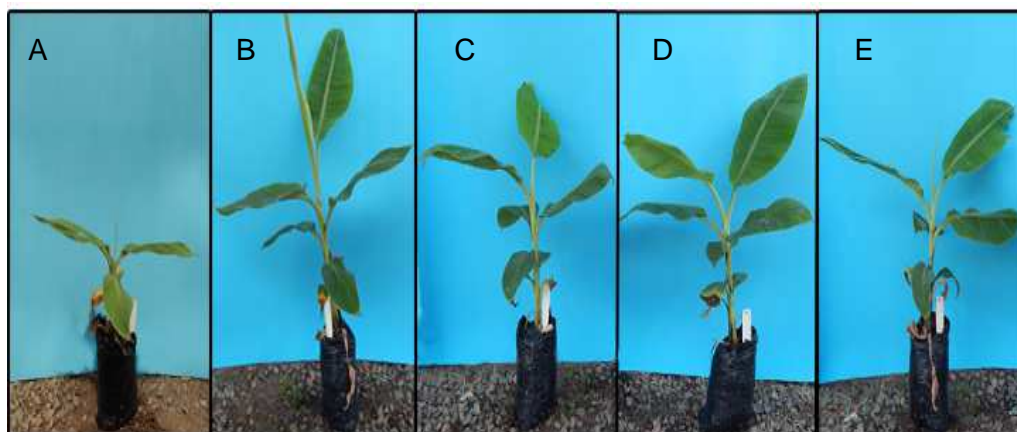


Figura 4 – Promoção de crescimento nas mudas de bananeiras da cultivar Prata Anã promovida pelo tratamento Bac 1 + Foc + *T. harzianum* 30, em comparação com a testemunha. Tratamento Controle (A); Repetição 1 do tratamento Bac 1 + Foc + *T. harzianum* 30 (B); Repetição 2 do tratamento Bac 1 + Foc + *T. harzianum* 30 (C); Repetição 3 do tratamento Bac 1 + Foc + *T. harzianum* 30 (D); Repetição 4 do tratamento Bac 1 + Foc + *T. harzianum* 30 (E).

Com relação às outras variáveis DIAM, NF, MPAF, MSRF, MPAS e MSRS, os tratamentos Bac 1 + Foc + *T. harzianum* 30 e Bac 4 + Foc + *T. harzianum* 45 também apresentaram melhores medias, mas não diferindo estatisticamente de outros tratamentos.

Estudos mostram que isolados de *Trichoderma* podem colonizar raízes formando associações simbióticas, atuando na solubilização de nutrientes no solo, aumentando a absorção de nutrientes e proporcionando maior desenvolvimento radicular (Verma *et al* 2007). Alguns pesquisadores sugerem que a produção de hormônios de crescimento e transferência de minerais na rizosfera são os principais mecanismos de promoção de crescimento (Harman *et al* 2004). Porém os mecanismos utilizados por cada espécie de *Trichoderma* são distintos. Taribuka *et al* 2017, avaliaram isolados de *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma asperillum*, *Trichoderma gamsii* e *Trichoderma koningiopsis*, os autores relataram promoção de crescimento significativa, proporcionado pelos isolados de *Trichoderma*, com destaque para as mudas tratadas com isolado de *Trichoderma harzianum*, que apresentou as maiores médias.

Grande parte da promoção de crescimento realizada por linhagens de *Trichoderma*, segundo Contreras-Cornejo *et al* 2009 se deve a produção de fatores reguladores de crescimento pelo fungo, tais como compostos semelhantes a auxinas. Chowdappa *et al* 2013, em experimentos utilizando *T. harzianum* na

promoção de crescimento de tomateiros, observaram promoção de crescimento significativa nas mudas. Nesse trabalho, os autores relacionaram a promoção de crescimento aos níveis de auxina e ácido giberélico que aumentaram significativamente nas raízes das mudas tratadas com *T. harzianum*. Apesar de a auxina ser uma substância reguladora do crescimento central da planta, Contreras-Cornejo *et al* 2009, observaram que a inoculação com *Trichoderma virens* aumentou o desenvolvimento de raízes laterais em plantas de *Arabidopsis*, de uma maneira que sugere que os efeitos são mediados pela auxina.

Observando a Tabela 1, verifica-se que a promoção de crescimento das mudas, foi afetada diretamente pela distância entre as aplicações de *T. harzianum* e o plantio das mudas, pois, os tratamentos em que *T. harzianum* foi inoculado no mesmo dia do plantio (*T. harzianum* 60), apresentaram médias menores do que os tratamentos com *T. harzianum* inoculado previamente, demonstrando que o isolado de *T. harzianum* avaliado apresenta melhores resultados quando aplicado antes do plantio.

Experimento 2

No segundo experimento, o isolado de *T. harzianum* foi inoculado no substrato antes das bactérias, Na figura 2, é possível observar que o ID nas mudas de banana tipo Prata-anã foi reduzido em diferentes porcentagens, dependendo da combinação entre o isolado de *Bacillus* spp. e o espaço de tempo entre as aplicações de *T. harzianum*.

Dentre os tratamentos, Foc + *T. harzianum* + Bac 1 - 45 e Foc + *T. harzianum* + Bac 3 - 45 destacam-se, pois foram os que apresentaram a menor porcentagem de ID (8,5%), enquanto a testemunha (Controle + Foc 60) apresentou 54,3% de ID, o que representa 81,1% a mais na redução do ID proporcionado pelos tratamentos, se comparado com a testemunha.

O ID apresentado pelas mudas submetidas aos tratamentos Foc + *T. harzianum* + Bac 1- 45 e Foc + *T. harzianum* + Bac 3 - 45, também foram menores que a testemunha com aplicação de apenas Foc e *T. harzianum*, que apresentou 28,6%. Esses dados revalam que os isolados de *Bacillus* spp. foram fundamentais na redução do ID nas mudas de banana avaliadas. Porém, quando aplicadas no dia

do plantio, não apresentaram o antagonismo ao Foc desejado. Dos cinco tratamentos com aplicação de *Bacillus* spp. no dia do plantio, três (Foc + *T. harzianum* + Bac 1 - 60, Foc + *T. harzianum* + Bac 4 - 60 e Foc + *T. harzianum* + Bac 5 - 60), apresentaram porcentagem de ID muito superiores aos tratamentos com aplicação de *Bacillus* spp. 15, 30 e 45 dias antes do plantio, principalmente se comparados aos tratamentos com os isolados de *Bacillus* spp. Bac 1, Bac 2, Bac 3 e Bac 4 aplicados 15 dias antes do plantio das mudas, que apresentaram os melhores resultados para cada bactéria (Figura 3).

Após a avaliação do ID, foi realizada análise de agrupamento, que apontou três grupos (G1, G2 e G3) a partir do corte no dendrograma (Figura 4). No G1, ficaram os tratamentos que apresentaram maior ID, Foc + *T. harzianum* + Bac 1 - 60, Foc + *T. harzianum* + Bac 4 - 60, Foc + *T. harzianum* + Bac 5 - 60 e Testemunha + Foc.

Proavelmente, quando o fermentado dos isolados de *Bacillus* spp. foram adicionados ao substrato infestado com Foc e *T. harzianum*, 60 dias após a inoculação, o isolado de *T. harzianum* já havia colonizado o substrato. Porém, *T. harzianum* foi afetado pelos metabólitos antifúngicos, deixando as raízes das mudas de bananeira expostas aos propagulos de Foc presentes no substrato. Quando os fermentados foram adicionados ao substrato dias antes do plantio, o *T. harzianum* foi afetado, mas teve tempo para se restabelecer e voltar a colonizar o substrato, e com isso, utilizar os seus variados mecanismos de ação sobre propágulos de Foc, que possam ter resistido aos metabólitos bacterianos, e venham a germinar na presença do hospedeiro.

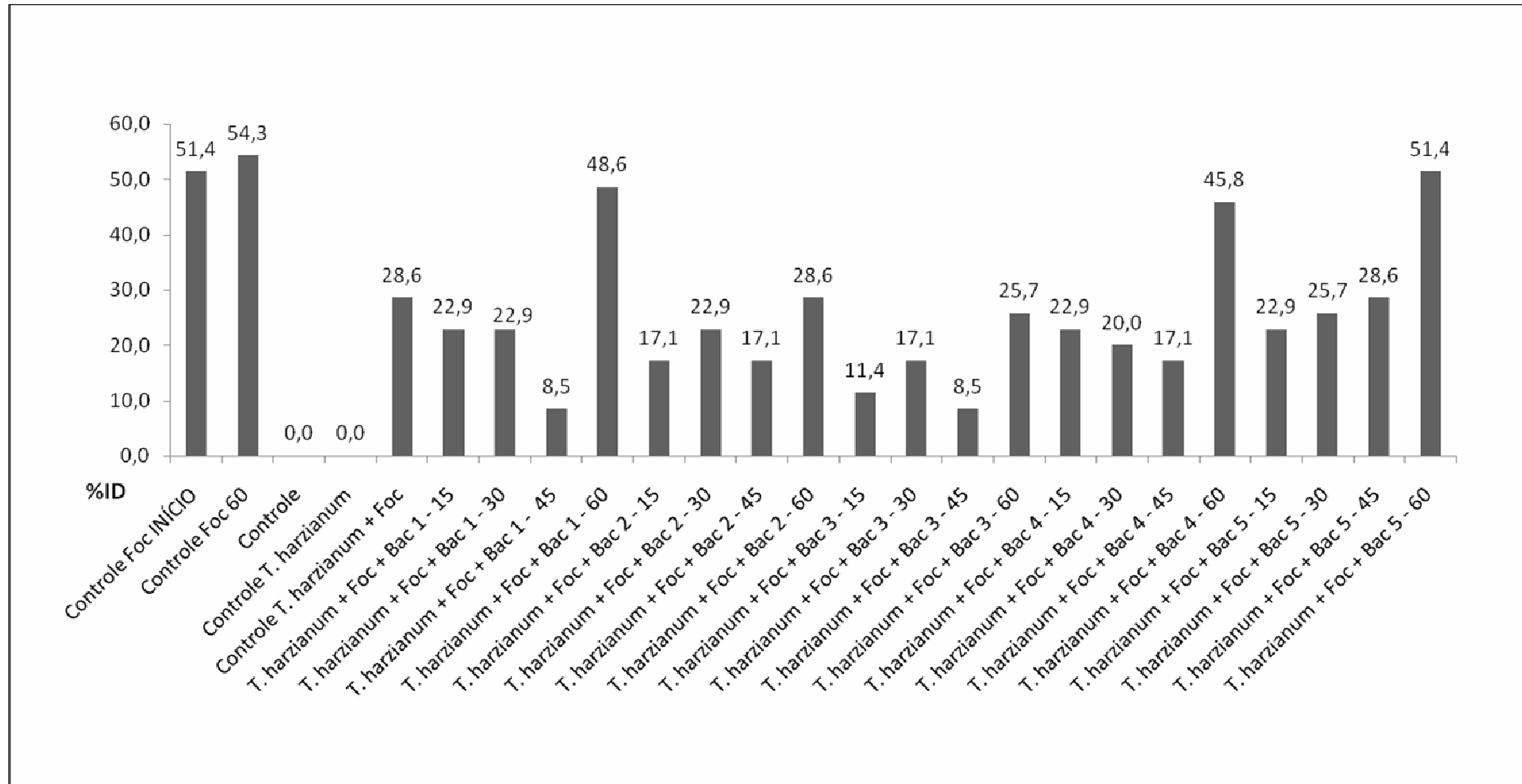


Figura 3 – Porcentagem do índice de doença (ID) apresentado por cada tratamento do experimento 2, calculados a partir dos sintomas internos de Foc em mudas de bananeira 'Prata-anã' cultivadas em casa de vegetação, após 65 dias.

Os melhores tratamentos foram agrupados no G3, *T. harzianum* + Foc + Bac 3 – 15, *T. harzianum* + Foc + Bac 1 – 45, *T. harzianum* + Foc + Bac 3 – 45, *T. harzianum* + Foc + Bac 4 – 30, *T. harzianum* + Foc + Bac 4 – 45, *T. harzianum* + Foc + Bac 3 – 30, *T. harzianum* + Foc + Bac 2 – 45 e *T. harzianum* + Foc + Bac 2 – 15. É possível observar que nenhum tratamento com o isolado de *Bacillus* spp. aplicado 60 dias após inoculação com *T. harzianum* está presente no grupo G3, reforçando as observações anteriores que os tratamentos com aplicação de bactérias no dia do plantio, em solos que já estejam infestados com Foc e *T. harzianum* é ineficiente.

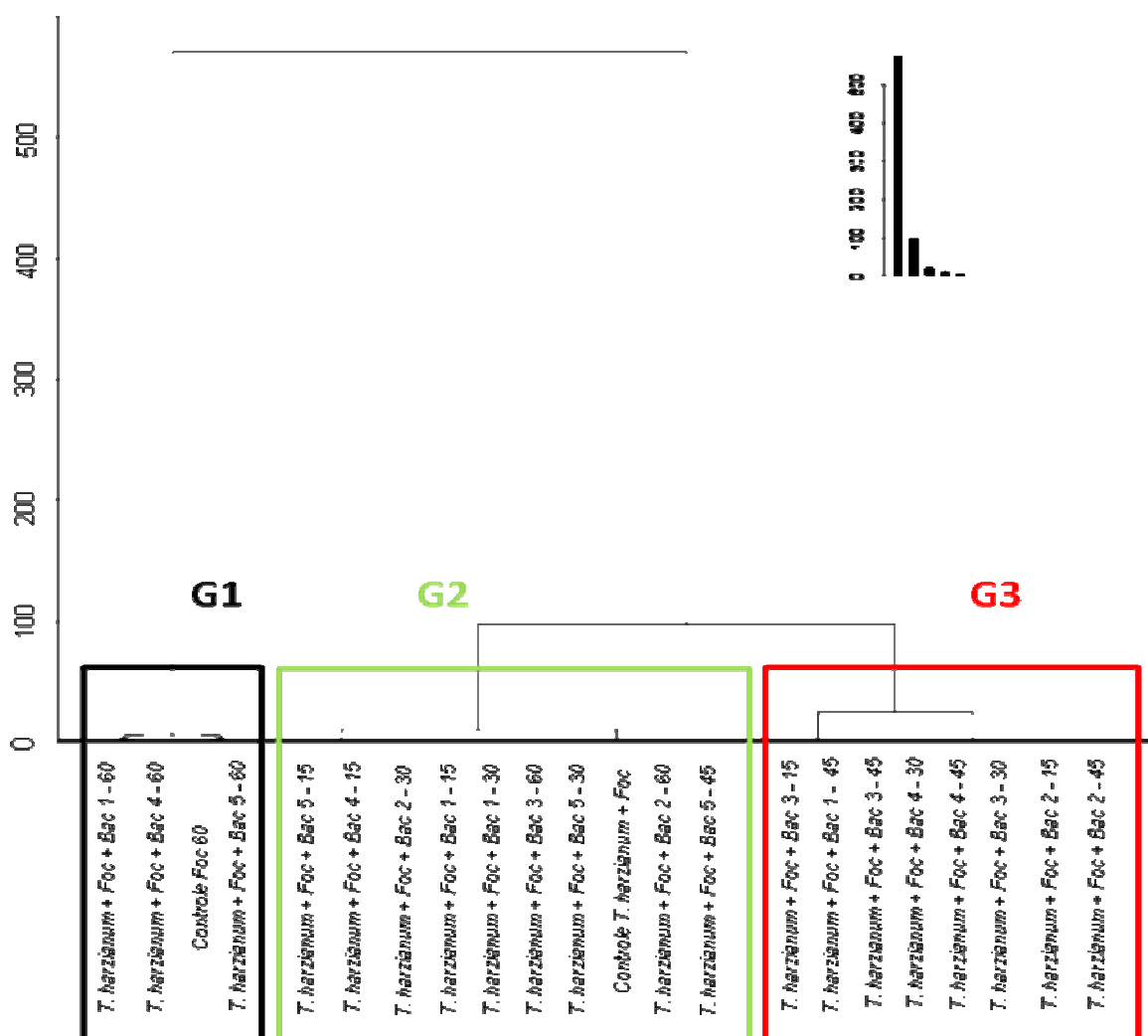


Figura 4 - Agrupamento hierárquico dos tratamentos testados para o controle do mal-do-Panamá no experimento 2. Os tratamentos foram ordenados de acordo com a sua coordenada no primeiro componente principal.

Com relação aos parâmetros de desenvolvimento avaliados (Tabela 2), na variável ALT, seis tratamentos apresentaram os melhores resultados, não diferindo entre si, mas diferindo significativamente da testemunha, sendo eles Controle *T. harzianum* (22,40 cm), Controle *T. harzianum* + Foc (22,40 cm), *T. harzianum* + Foc + Bac 2 - 30 (23 cm), *T. harzianum* + Foc + Bac 2 - 45 (22,20), *T. harzianum* + Foc + Bac 3 - 30 (22 cm) e *T. harzianum* + Foc + Bac 5 - 15 (22,8 cm). Nenhum tratamento utilizando *Bacillus* spp. em conjunto com *T. harzianum* foi significativamente superior aos tratamentos com a inoculação de apenas *T. harzianum*, o que demonstra que a promoção de crescimento visualizada na Tabela 2, são em decorrência da presença de *T. harzianum* no substrato.

Observando às outras variáveis, DIAM, NF, MPAF, MSRF, MPAS e MSRS, tratamentos Controle *T. harzianum*, Controle *T. harzianum* + Foc, *T. harzianum* + Foc + Bac 2 - 30, *T. harzianum* + Foc + Bac 2 - 45, *T. harzianum* + Foc + Bac 3 - 30 e *T. harzianum* + Foc + Bac 5 - 15 também apresentaram melhores medias, mas não diferiram estatisticamente de outros tratamentos.

Os resultados obtidos no presente experimento sugerem que, a utilização de *Bacillus* spp. após a inoculação de *T. harzianum*, não interferiu em sua capacidade de promover o crescimento das mudas de bananeira. E que a promoção de crescimento observada, pode ter sido um fator que favoreceu a redução de ID nas mudas.

Tabela 2 – Variáveis das mudas avaliadas após 65 dias do plantio; Altura (ALT), diâmetro do pseudocaule (DIAM), número de folhas (NF), massa fresca da parte aérea (MPAF), massa fresca do sistema radicular (MSRF), massa seca da parte aérea (MPAS) e massa seca do sistema radicular (MSRS).

Tratamentos	Variáveis						
	ALT	DIAM	NF	MPAF	MSRF	MPAS	MSRS
Controle Foc Início	18,64 c	1,38 c	7,40 a	22,18 c	9,24 d	4,26 a	2,16 a
Controle Foc 60	17,60 c	1,84 a	5,60 a	38,32 b	11,62 d	3,14 b	1,50 b
Controle	15,40 d	1,66 a	4,60 b	19,02 c	11,82 d	1,74 c	1,16 b
Controle Bac 1	15,00 d	1,62 b	5,00 b	19,22 c	14,32 d	1,74 c	1,56 a
Controle Bac 2	13,60 d	1,44 c	4,60 b	15,68 c	11,04 d	1,62 c	1,28 b
Controle Bac 3	13,80 d	1,58 b	4,60 b	15,94 c	13,88 d	1,66 c	1,60 b
Controle Bac 4	13,80 d	1,52 c	4,80 b	14,86 c	11,64 d	1,50 c	1,22 b
Controle Bac 5	15,20 d	1,70 a	4,40 b	20,72 c	11,22 d	1,46 c	0,88 b
Controle <i>T. harzianum</i>	22,40 a	1,86 a	6,00 a	37,46 b	19,78 b	3,52 a	2,60 a
Controle <i>T. harzianum</i> + Foc	22,40 a	1,74 a	5,60 a	53,32 a	17,60 c	4,08 a	1,86 a
Bac 1 + FOC	18,80 c	1,68 a	5,20 b	37,86 b	15,30 c	3,02 b	1,96 a
Bac 2 + FOC	18,20 c	1,78 a	5,80 a	44,04 b	20,52 b	3,34 b	2,16 a
Bac 3 + FOC	18,80 c	1,74 a	6,00 a	44,48 b	17,94 c	2,92 b	2,12 a
Bac 4 + FOC	14,40 d	1,40 c	5,00 b	27,38 c	16,28 c	2,04 c	1,42 b
Bac 5 + FOC	16,80 c	1,60 b	5,60 a	35,38 b	19,52 b	2,18 c	2,26 a
<i>T. harzianum</i> + Foc + Bac 1 15	21,40 b	1,62 b	6,20 a	49,80 a	18,52 c	3,04 b	1,90 a
<i>T. harzianum</i> + Foc + Bac 1 30	18,20 c	1,50 c	5,60 a	43,72 b	17,90 c	2,68 b	1,90 a
<i>T. harzianum</i> + Foc + Bac 1 45	21,40 b	1,74 a	6,20 a	55,24 a	19,78 b	3,78 a	1,84 a
<i>T. harzianum</i> + Foc + Bac 1 60	19,80 b	1,64 b	5,80 a	44,16 b	16,74 c	3,26 b	1,66 b
<i>T. harzianum</i> + Foc + Bac 2 15	21,00 b	1,78 a	6,00 a	47,70 b	22,72 b	3,84 a	2,10 a
<i>T. harzianum</i> + Foc + Bac 2 30	23,00 a	1,72 a	5,80 a	56,40 a	20,64 b	3,64 a	2,02 a
<i>T. harzianum</i> + Foc + Bac 2 45	22,20 a	1,84 a	6,60 a	58,74 a	19,96 b	3,10 b	2,24 a
<i>T. harzianum</i> + Foc + Bac 2 60	20,00 b	1,76 a	6,00 a	57,36 a	20,76 b	3,96 a	2,06 a
<i>T. harzianum</i> + Foc + Bac 3 15	19,80 b	1,66 a	6,00 a	44,34 b	17,86 c	3,34 b	1,84 a
<i>T. harzianum</i> + Foc + Bac 3 30	22,00 a	1,72 a	6,00 a	50,42 a	19,34 b	3,86 a	2,20 a
<i>T. harzianum</i> + Foc + Bac 3 45	19,80 b	1,88 a	6,60 a	53,04 a	26,34 a	3,20 b	1,84 a
<i>T. harzianum</i> + Foc + Bac 3 60	16,80 c	1,76 a	5,60 a	44,10 b	21,66 b	3,34 b	1,86 a
<i>T. harzianum</i> + Foc + Bac 4 15	20,00 b	1,84 a	5,80 a	50,52 a	26,44 a	2,90 b	2,04 a
<i>T. harzianum</i> + Foc + Bac 4 30	21,40 b	1,78 a	6,20 a	50,68 a	25,16 a	3,36 b	2,00 a
<i>T. harzianum</i> + Foc + Bac 4 45	24,80 b	1,76 a	6,80 a	63,72 a	21,32 b	3,66 a	1,70 a
<i>T. harzianum</i> + Foc + Bac 4 60	18,00 c	1,72 a	5,20 b	39,82 b	24,18 a	3,46 b	1,80 a
<i>T. harzianum</i> + Foc + Bac 5 15	22,80 a	1,80 a	6,20 a	57,30 a	29,08 a	3,86 a	2,14 a
<i>T. harzianum</i> + Foc + Bac 5 30	20,80 b	1,82 a	5,60 a	49,98 a	27,30 a	3,06 b	1,88 a
<i>T. harzianum</i> + Foc + Bac 5 45	21,40 b	1,90 a	6,00 a	57,10 a	25,40 a	3,90 a	1,96 a
<i>T. harzianum</i> + Foc + Bac 5 60	18,60 c	1,74 a	5,20 b	45,72 b	27,40 a	3,36 b	1,76 a
CV%	9,36	9,39	13,90	18,77	23,16	19,83	28,95

*Médias seguidas por letras distintas diferem entre si, pelo teste de Scott knott, a 5% de probabilidade.

Diversos estudos relatam a utilização de *Trichoderma* spp. e *Bacillus* spp. em conjunto. Os resultados obtidos no presente trabalho então de acordo com os observados por Morsy et al 2009, que em experimentos utilizando *Trichoderma viride* e/ou *Bacillus subtilis* como ACBs de *Fusarium solani*, verificaram que o uso combinado de *Trichoderma viride* e *Bacillus subtilis* reduziram mais o índice de nos tomateiros, quando comparado as testemunhas, ou aos ACBs aplicados sozinhos. No mesmo experimento, também foi costatado que o uso em conjunto dos ACBs, aumentou de forma significativa os parâmetros de crescimento do tomateiro, em comparação com os ACBs utilizados individualmente. Porém, os resultados obtidos por Yobo et al 2011, diferem dos obtidos no presente estudo, pois em ensaios de controle biológico, foram realizadas inoculações de *T. harzianum*, *T. atroviride* e isolados de *Bacillus*, combinados e individuais contra *Rhizoctonia solani*. Nenhuma das combinações de *Trichoderma* e *Bacillus* foram melhores do que a inoculação individual dos ACBs.

Na utilização em conjunto de ACBs, é necessário considerar as interações diretas e indiretas entre as populações dos agentes antagonistas. Uma forma eficiente na utilização de ACBs em conjunto é tentar agregar os principais mecanismos de ação de cada ACB para aumentar a eficiência no controle do patógeno. Como a combinação demonstrada no presente estudo, que utilizou a produção de metabólitos antifúngicos produzidos pelos isolados de *Bacillus* spp. em conjunto com o micoparasitismo e promoção de crescimento de *T. harzianum*. Comparando alguns trabalhos em que foram aplicados dois ou mais ACBs em conjunto para controle biológico de fitopatógenos, é possível verificar que os resultados são variados, em alguns trabalhos, o combinado de dois BCAs levaram ao aumento dos índices de controle do patógeno, quando comparados à utilização do ACB dominante sozinho (Le Floch et al 2009). Em outros trabalhos, os resultados obtidos com a aplicação do combinado de ACBs foram inferiores a utilização do ACB dominante sozinho (Bora et al 2004, Xu et al 2010). Já em outros, os resultados entre a utilização dos ACBs em conjunto e o uso do ACB dominante sozinho, foram semelhantes e não diferiram estatisticamente (Dooley et al 2010, Janousek et al 2009, Xu et al 2010). Em estudos realizados por Xu et al 2011, os autores avaliaram 465 tratamentos publicados utilizando ACBs em conjunto. Desses 465 tratamentos, apenas 2% apresentaram eficiência na utilização de ACBs em conjunto. Os resultados sugeriram que a supressão da doença a partir do uso combinado de dois

ACBs foi, em geral, muito semelhante aos obtidos com a utilização do ACB mais dominante sozinho.

Contudo, os resultados apresentados neste trabalho demonstraram que é possível a utilização de ACBs em conjunto no controle biológico de Foc, mesmo quando os ACBs apresentam antagonismo entre si em experimentos *in vitro*. Nesse caso, um manejo adequado se faz necessário para favorecer os ACBs sem que eles se antagonizem, como a utilização de diferentes espaços de tempo entre as aplicações de ACBs, que nesse trabalho mostrou-se eficiente.

CONCLUSÕES

- A utilização de agentes de controle biológico em conjunto reduziu o índice de doença em mudas de bananeira da variedade Prata Anã;
- O tratamento com aplicação do isolado de *Bacillus* spp. Bac 1 30 dias antes da inoculação de *T. harzianum* no substrato já infestado com Foc (Bac 1 + Foc + *T. harzianum* 30) e o tratamento com aplicação do isolado de *Bacillus* spp. Bac 3 45 dias antes da inoculação de *T. harzianum* no substrato já infestado com Foc (Bac 3 + Foc + *T. harzianum* 45) foram os mais eficientes na redução da incidência do mal-do-Panamá;
- *T. harzianum* promove o crescimento de mudas de bananeiras da cultivar Prata Anã.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AUORE, G.; PARFAIT, B.; FAHRASMANE, L. Bananas, raw materials for making processed food products. **Trends in Food Science & Technology**, v. 20, n. 2, p. 78-91, 2009.

BORA, T., ÖZAKTAN, H., GÖRE, E., ASLAN, E. Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* by wettable powder formulations of the two strains of

Pseudomonas putida. **Journal of Phytopathology**, v. 152, n. 8-9, p. 471-475, 2004.

BRUNNER, K.; ZEILINGER, S.; CILIENTO, R.; WOO, S. L.; LORITO, M.; KUBICEK, C. P.; MACH, R. L. Improvement of the fungal biocontrol agent *Trichoderma atroviride* to enhance both antagonism and induction of plant systemic disease resistance. **Applied and environmental microbiology**, v. 71, n. 7, p. 3959-3965, 2005.

CHOWDAPPA, P.; KUMAR, S. M.; LAKSHMI, M. J.; UPRETI, K. K. Growth stimulation and induction of systemic resistance in tomato against early and late blight by *Bacillus subtilis* OTPB1 or *Trichoderma harzianum* OTPB3. **Biological Control**, v. 65, n. 1, p. 109-117, 2013.

CONTRERAS-CORNEJO, H. A.; MACÍAS-RODRÍGUEZ, L.; CORTÉS-PENAGOS, C.; LÓPEZ-BUCIO, J. *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 149, n. 3, p. 1579-1592, 2009.

COOK, R. J.; BAKER, K. F. **The nature and practice of biological control of plant pathogens**. American Phytopathological Society, p.120-170, 1983.

CORDEIRO Z. J. M.; KIMATI, H. Doenças da bananeira (*Musa* sp.) In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIM FILHO, A; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M.; (eds.). **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Ceres, p.112-136,1997.

CORDEIRO, Z. J. M.; MATOS, A. P.; MEISSNER FILHO, P. E. Doenças e Métodos de Controle. In: BORGES, A.L.; SOUZA, L.S. **O Cultivo da Bananeira**. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004. 279p.

CORDEIRO, Z.J.M.; SHEPHERD, K.; SOARES FILHO, W.S.; DANTAS, J.L.L.

Avaliação de resistência ao mal-do-panamá em híbridos tetraploides de bananeira. *Fitopatologia Brasileira*, v.18, n.4, p.478-483, 1993.

DOOLEY, S. R.; BECKSTEAD, J. Characterizing the interaction between a fungal seed pathogen and a deleterious rhizobacterium for biological control of cheatgrass. **Biological Control**, v. 53, n. 2, p. 197-203, 2010.

EDWARDS, S. G.; SEDDON, B. Mode of antagonism of *Brevibacillus brevis* against *Botrytis cinerea* in vitro. **J. Appl. Microbiol.** 91:652-659. 2001.

FAO. **Agricultural Database**. Disponível em: <<http://www.fao.org>> Acesso em: 15 agosto. 2016.

FORTUNATO, A. A.; RODRIGUES, F. Á.; NASCIMENTO, K. J. T. Physiological and biochemical aspects of the resistance of banana plants to *Fusarium* wilt potentiated by silicon. **Phytopathology**, v. 102, n. 10, p. 957-966, 2012.

HARMAN, G. E. Multifunctional fungal plant symbionts: new tools to enhance plant growth and productivity. **New Phytologist**, v. 189, p. 647–649, 2011.

HARMAN, G. E. Myths and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. **Plant Disease**, v. 84, n. 4, p. 376–393, 2000.

JANOUSEK, C. N.; LORBER, J. D.; GUBLER, W. D. Combination and rotation of bacterial antagonists to control powdery mildew on pumpkin/Kombination und Wechsel bakterieller Antagonisten zur Bekämpfung des Echten Gurkenmehltaus an Kürbis. **Journal of Plant Diseases and Protection**, p. 260-262, 2009.

LE FLOCH, G.; VALLANCE, J.; BENHAMOU, N.; REY, P. Combining the oomycete *Pythium oligandrum* with two other antagonistic fungi: root relationships and tomato grey mold biocontrol. **Biological Control**, v. 50, n. 3, p. 288-298, 2009.

LÊ S.; JOSSE, J.; HUSSON F. FactoMineR: An R package for multivariate analysis. **J Stat Software** 25: 1-18, 2008.

MAGET-DANA, R.; THIMON, L.; PEYPOUX, F.; PTAK, M. Surfactin/Iturin A interactions may explain the synergistic effect of surfactin on the biological properties of iturin A. **Biochimie**, v.74, p.1047–1051, 1992.

MASCARENHAS, G. **Análise do mercado brasileiro de banana**. Preços Agrícolas, v. 134, p. 4-12, 1997.

McKINNEY, H. H. Influence of soil, temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. **Journal of Agricultural Research**, Washington, v.26, p.195-217, 1923.

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

MORSY, E. M., ABDEL-KAWI, K. A., KHALIL, M. N. A. Efficiency of *Trichoderma viride* and *Bacillus subtilis* as biocontrol agents against *Fusarium solani* on tomato plants. **Egyptian Journal of Phytopathology**, v. 37, n. 1, p. 47-57, 2009.

PÉREZ V. L., BATLLE V. A., CHACÓN B. J., MONTENEGRO M. V. Eficacia de *Trichoderma harzianum* a34 en el biocontrol de *Fusarium oxysporum* f. *Sp. cubense*, agente causal de la marchitez por fusarium o mal de Panamá de los bananos en Cuba. **Fitosanidad**, v. 13, n. 4, p. 259-264, 2009.

SILVA NETO S. P.; GUIMARÃES T. G. **Evolução da cultura da banana no Brasil e no mundo**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2011. Disponível em: <<http://www.cpac.embrapa.br/noticias/artigosmidia/publicados/287/>>. Acesso 25 abril 2015.

TAN, D., FU, L., HAN, B., SUN, X., ZHENG, P., ZHANG, J. Identification of an endophytic antifungal bacterial strain isolated from the rubber tree and its application in the biological control of banana Fusarium wilt. **PloS one**, v. 10, n. 7, p. e0131974, 2015.

TARIBUKA, J., WIBOWO, A., WIDYASTUTI, S. M., SUMARDIYONO, C. Potency of six isolates of biocontrol agents endophytic *Trichoderma* against fusarium wilt on banana. **Journal of Degraded and Mining Lands Management**, v. 4, n. 2, p. 723-731, 2017.

VERMA, M.; BRAR, S. K.; TYAGI, R. D.; SURAMPALLI, R. Y.; VALERO, J. R. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: panoply of biological control. **Biochemical Engineering Journal**, v. 37, n. 1, p. 1-20, 2007.

XU, X. M., JEFFRIES, P., PAUTASSO, M., JEGER, M. J. Combined use of biocontrol agents to manage plant diseases in theory and practice. **Phytopathology**, v. 101, n. 9, p. 1024-1031, 2011.

XU, X., ROBINSON, J., JEGER, M., JEFFRIES, P. Using combinations of biocontrol agents to control *Botrytis cinerea* on strawberry leaves under fluctuating temperatures. **Biocontrol Science and Technology**, v. 20, n. 4, p. 359-373, 2010.

YOBO, K. S.; LAING, M. D.; HUNTER, C. H. Effects of single and combined inoculations of selected *Trichoderma* and *Bacillus* isolates on growth of dry bean and biological control of *Rhizoctonia solani* damping-off. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 44, p. 8746-8756, 2011.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A ausência de métodos de controle que apresentem eficiência para o mal-do-Panamá e a crescente necessidade pela busca de agroecossistemas sustentáveis faz com que à procura por novos métodos de controle de Foc estejam em sintonia com essa necessidade. Os ensaios realizados nesse trabalho visaram a redução da incidência do mal-do-Panamá, na cultivar Prata Anã, utilizando microrganismos antagonistas para o controle biológico de Foc. Essa prática está em harmonia com a exigência crescente da população mundial por alimentos mais saudáveis e sem resíduos de agrotóxicos.

Os estudos realizados neste trabalho *in vitro*, e em casa de vegetação, são necessários para a compreensão dos mecanismos de ação utilizados pelos ACBs investigados *T. harzianum* e isolados de *Bacillus* spp.. Pois permitem, de forma prática, avaliar o potencial do antagonista sobre o fitopatógeno.

Estes resultados abrem novos caminhos para pesquisas em controle biológico de Foc no sentido de elucidar a possibilidade da utilização de ACBs em conjunto, intencionando um melhor entendimento das relações entre as ACBs, o patógeno e a planta hospedeira, para que haja, no futuro, a possibilidade de desenvolvimento de manejos integrados, utilizando diferentes técnicas em conjunto com a aplicação de microrganismos biocontroladores, visando à redução da incidência do mal-do-Panamá em condições de campo.

