

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

**BIOCONTROLE DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*,
Mycosphaerella musicola E *Mycosphaerella fijiensis*
CAUSADORES DAS PRINCIPAIS DOENÇAS EM BANANEIRA**

MARIANA PEREIRA SANTANA

**CRUZ DAS ALMAS – BA
DEZEMBRO-2021**

**BIOCONTROLE DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*,
Mycosphaerella musicola E *Mycosphaerella fijiensis*
CAUSADORES DAS PRINCIPAIS DOENÇAS EM BANANEIRA**

MARIANA PEREIRA SANTANA

Licenciada em Biologia

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2017

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

Orientador: Dr. Fernando Haddad

Coorientador: Dr. Harllen Sandro Alves Silva

CRUZ DAS ALMAS – BA

DEZEMBRO-2021

FICHA CATALOGRÁFICA

S232b	<p>Santana, Mariana Pereira. Biocontrole de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. cubense, <i>Mycosphaerella musicola</i> e <i>Mycosphaerella fijiensis</i> causadores das principais doenças em bananeira / Mariana Pereira Santana._ Cruz das Almas, BA, 2021. 48f.; il.</p> <p>Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Mestrado em Microbiologia Agrícola.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Fernando Haddad. Coorientador: Prof. Dr. Harllen Sandro Alves Silva.</p> <p>1.Banana – Pragas e doenças. 2.Banana – Fungos – Controle. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.</p> <p>CDD: 634.772</p>
-------	--

Ficha elaborada pela Biblioteca Universitária de Cruz das Almas - UFRB. Responsável pela Elaboração – Antonio Marcos Sarmento das Chagas (Bibliotecário - CRB5 / 1615). Os dados para Catalogação foram enviados pela usuária via formulário eletrônico.

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

**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE
MARIANA PEREIRA SANTANA**




Dr. Fernando Haddad

(Orientador)



Dr. Carlos Augusto Dórea Bragança



Dra. Leilane Silveira D'Ávila

“Dissertação

homologada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola

em _____ conferindo o grau de Mestre em Microbiologia Agrícola

em _____.”

DEDICATÓRIA

A Deus, que me sustentou durante esta jornada;

Dedico a mim, por toda força e determinação;

Ao meu esposo, Leonam;

Aos meus pais, Lucidalva e José Mário;

Ao meu padrasto Ronaldo;

Aos meus irmãos, Marcos, Mário Júnior, Tatiane e Késia Vitória;

Dedico!!!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que por sua graça infinita me permitiu alcançar lugares nunca imaginados.

À Embrapa Mandioca e Fruticultura, pelo apoio estrutural, técnico e financeiro.

À Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, pela oportunidade de crescimento profissional e pessoal, aprendizagem e vivências.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado concedida.

Ao meu orientador Dr. Fernando Haddad e ao meu coorientador Dr. Harllen Sandro Alves Silva pelas contribuições e orientações para a realização deste trabalho e para minha formação acadêmica.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola pelos ensinamentos e experiências compartilhadas.

Aos meus colegas de turma pelas trocas de experiência, especialmente Marília e Danilo que estiveram comigo, apoiando um ao outro por todo este curso.

A toda equipe do Laboratório de Fitopatologia, Dr. Hermes, Paulo, Leandro, Sr. João e Sinésio também aos agregados, Cícera, Fátima, Luciano e Sr. Bizunga, pelo apoio técnico e experiências compartilhadas.

Aos amigos e “sociedades” que construí durante este percurso, especialmente a Marília, Danilo, Flávia, Laryssa, Isis, Jean, Lucas, Julia, Ana, Tamires e Mileide muito obrigada por todo apoio, vocês tornaram meus dias mais leves e alegres.

As meninas da equipe da Banana, que mesmo não estando diariamente comigo se mostram sempre dispostas em apoiar quando necessário.

Ao meu esposo, Leonam, que sempre me apoiou emocionalmente e me incentivou a continuar esta jornada, esteve comigo nos momentos mais difíceis, obrigada pelos conselhos, pelo carinho, sou grata a Deus por ter você ao meu lado.

A minha mãe, Lucidava, meu pai, José Mário, ao meu padrasto Ronaldo, e meus irmãos, por estarem sempre dispostos a me ajudar.

A todos que fizeram parte direta e indiretamente desta jornada.

Muito obrigada a todos!

ÍNDICE

RESUMO

ABSTRACT

INTRODUÇÃO GERAL.....10

CAPÍTULO 1

Revisão de Literatura

Aspectos Botânicos e Econômicos Da Bananeira13

Fusariose da Bananeira14

Sigatoka Amarela15

Sigatoka Negra17

Manejo das doenças18

Controle Biológico19

Referências22

CAPÍTULO 2

Controle Biológico de *Mycosphaerella musicola* e *Mycosphaerella fijiensis* por *Trichoderma asperellum* e *Bacillus* spp. e seu uso de forma combinada no controle *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense

RESUMO27

ABSTRACT28

INTRODUÇÃO29

MATERIAL E MÉTODOS31

RESULTADOS36

DISCUSSÃO41

CONCLUSÃO45

REFERÊNCIAS46

RESUMO

SANTANA, MP. Biocontrole de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, *Mycosphaerella musicola* e *Mycosphaerella fijiensis* causadores das principais doenças em bananeira

A bananeira é uma cultura de grande importância socioeconômica por todo o mundo. Doenças como a Fusariose, a Sigatoka Amarela e a Sigatoka Negra, causadas por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (FOC), *Mycosphaerella musicola* (MM) e *Mycosphaerella fijiensis* (MF) (respectivamente), comprometem a produtividade nesta cultura. O uso de microrganismos antagonistas aos patógenos se apresenta como um método eficiente e sustentável, podendo ser incluído ao manejo integrado destas doenças. Neste estudo foi verificado o efeito antifúngico de 10 isolados de *Bacillus* spp. e do isolado CMF1007 de *Trichoderma asperellum* sobre o crescimento micelial de MM e MF e também o uso combinado das cepas bacterianas na redução do crescimento micelial de FOC. Os patógenos MM e MF foram submetidos ao teste de biocontrole por pareamento direto de culturas; compostos voláteis; e compostos difusíveis, no teste de pareamento direto os halos de inibição do crescimento micelial foram mensurados e suas medias foram agrupadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), destacando como melhores controladores de MM os isolados APC51, PA05, 399 e BAC3, com inibição de 15,5%, 14,9%, 13,5% e 12,8% respectivamente e para MF os isolados APC51 com 10,27% e 399 com 10,85% de inibição micelial. Os outros testes foram avaliados por meio de observação e comparação com o tratamento controle. A partir disto os isolados 399 e APC51 de *bacillus* e o isolado CMF1007 (*T. asperellum*) se destacaram como potenciais agentes de biocontrole das Sigatoka Amarela e Negra, podendo destacar os efeitos dos compostos voláteis sobre o crescimento as colônias. Já FOC foi submetido ao teste de pareamento direto com os combinados de isolados bacterianos, e a porcentagem de inibição do crescimento micelial pode ser comprada pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade. Os combinados bacterianos não se mostram mais efetivos quando comparados as cepas bacterianas utilizadas de forma isolada.

Palavras-chave: Biocontrole; Bananeira; Fusariose; Manchas foliares; Sigatoka Amarela; Sigatoka Negra.

ABSTRACT

SANTANA, MP. Biocontrol of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, *Mycosphaerella musicola* and *Mycosphaerella fijiensis* causing the main diseases in banana

The banana tree is a crop of great socioeconomic importance throughout the world. Diseases such as Fusarium, Yellow Sigatoka and Black Sigatoka, caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (FOC), *Mycosphaerella musicola* (MM) and *Mycosphaerella fijiensis* (MF) (respectively), compromise productivity in this culture. The use of microorganisms antagonistic to pathogens is presented as an efficient and sustainable method, which can be included in the integrated management of these diseases. In this study, the antifungal effect of 10 *Bacillus* spp. and the *Trichoderma asperellum* isolate CMF1007 on the mycelial growth of MM and MF and also the combined use of bacterial strains to reduce the mycelial growth of FOC. The MM and MF pathogens were submitted to the direct culture pairing biocontrol test; volatile compounds; and diffusible compounds, in the direct pairing test, the mycelial growth inhibition halos were measured and their means were grouped by the Tukey test ($p < 0.05$), highlighting the isolates APC51, PA05, 399 and BAC3 as the best MM controllers, with inhibition of 15,5%, 14,9%, 13,5% and 12,8% respectively and for MF the isolates APC51 with 10,27% and 399 with 10,85% of mycelial inhibition. The other tests were evaluated through observation and comparison with the control treatment. From this, isolates 399 and APC51 of *bacillus* and isolate CMF1007 (*T. asperellum*) stood out as potential biocontrol agents for Yellow and Black Sigatoka, highlighting the effects of volatile compounds on colony growth. On the other hand, FOC was submitted to the direct pairing test with the combined bacterial isolates, and the percentage of inhibition of mycelial growth can be purchased by the Scott-Knott test at 5% probability. Bacterial combinations are not shown to be more effective when compared to bacterial strains used in isolation.

Keywords: Biocontrol; Banana tree; Fusarium; Leaf spot; Yellow Sigatoka; Black Sigatoka.

INTRODUÇÃO GERAL

A bananeira é uma cultura de grande importância socioeconômica, fazendo parte da alimentação e obtenção de renda de famílias em diferentes classes sociais. Os principais países produtores de banana são a Índia, a China, a Indonésia e o Brasil, em ordem de importância produtiva. De acordo com os dados da FAO (2021), o Brasil produziu em 2019 aproximadamente 7 milhões de toneladas de banana. E para que o seu desenvolvimento e produtividade não sejam comprometidos, a cultura requer determinadas condições de solo, clima, nutrição, manejo da cultura e boa fitossanidade. (Borges & Souza, 2004).

Dentre as doenças que causam perdas produtivas em bananais podem-se destacar a Fusariose, a Sigatoka Amarela e a Sigatoka Negra, que tem como agente causal *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (FOC), *Mycosphaerella musicola* e *Mycosphaerella fijiensis*, respectivamente (Arzanlou et al., 2007; Dita et al., 2018; Olivares et al., 2021).

A Fusariose é uma doença caracterizada por desenvolver, em seus estágios mais avançados, a murcha da planta, este processo se inicia quando o patógeno contido no solo penetra a planta, alcança os vasos xilemáticos, se reproduz e causa o entupimento destes, conseqüentemente impedindo que a água e os nutrientes alcancem as partes superiores da planta (Dita et al., 2018; Olivares et al., 2021). Já as Sigatokas são doenças caracterizadas pelo aparecimento de manchas necróticas em forma de estrias paralelas as nervuras secundárias do limbo foliar, reduzindo a área fotossintética, refletindo na redução do rendimento e na qualidade de frutos (Cordeiro et al., 2004; Arzanlou et al., 2007; PLOETZ, 2015; Dita et al., 2018). Novas práticas para o controle sustentável têm sido valorizadas por produtores, visto que a estratégia mais eficaz para estas doenças é o manejo integrado, quanto mais possibilidades de controle estiverem disponíveis e se utilizados em conjunto, maiores são as chances em reduzir as perdas na produção.

Dentro do manejo integrado, o controle das Sigatokas se dá em maior proporção pelo controle químico, com o uso de fungicidas dos grupos dos Triazois e Estrobilurinas, elevando o custo da produção, também o seu uso indevido pode acarretar em danos ambientais contaminando alimentos, rios, apresentando perigo à saúde dos agricultores e do consumidor final, além de selecionar isolados do

patógeno resistentes aos seus mecanismos, tomando o uso inviável com a recorrência de aplicações (Brent, 1995; Orozco, 2008). No caso da Fusariose, a utilização de cultivares resistentes tem sido a prática mais utilizada e eficiente, porém a ocorrência de diferentes raças do patógeno torna reduzida a disponibilidade de cultivares com resistência a todas as raças. Com isto, pesquisas que buscam identificar microrganismos associados ao controle destas doenças têm ganhado relevância (Costa, 2015; Dita et al, 2018; Gonçalves et al, 2019; Gasparotto et al, 2020; Olivares et al, 2021).

O controle biológico é um fenômeno natural no qual organismos de uma espécie atuam como inimigos modulando o crescimento populacional de outras, a partir disto, os mecanismos inerentes a este fenômeno tem se tornado foco de estudos para reprodução em agrossistemas, a aplicação desta técnica no controle de doenças de diversas culturas e também na cultura da banana tem apresentado resultados motivadores ao seu uso dentro do manejo integrado, reduzindo perdas na produção (Dita et al, 2018; Bubici et al, 2019).

Espécies dos gêneros *Trichoderma* spp. e *Bacillus* spp. apresentaram-se como bons agentes de biocontrole, devido a sua capacidade de formar estruturas de resistência e múltiplos mecanismos de ação, tanto no biocontrole quanto na liberação de metabólitos capazes de promover o desenvolvimento da planta (Bubici et al, 2019).

Com o objetivo de identificar microrganismos com potencial de biocontrole das Sigatokas e também testar o uso combinado de bactérias no controle da Fusariose, testes *in vitro* foram realizados neste trabalho.

Este trabalho está dividido em dois capítulos, o primeiro capítulo traz uma abordagem teórica acerca do tema proposto e o segundo capítulo refere-se ao trabalho propriamente dito, no qual as metodologias, resultados, discussão e conclusões foram apontados.

CAPUTULO I
Revisão de Literatura

Aspectos Botânicos e Econômicos Da Bananeira

A banana (*Musa* spp.) é uma monocotiledônea pertencente à Família *Musaceae* originada no continente asiático (Dantas et al., 1997). Basicamente, a planta é formada por um caule subterrâneo, denominado rizoma de onde brotam as raízes, pelo pseudocaule formado pelas bainhas das folhas e uma copa de folhas longas, que se origina da folha vela (Dias & Barreto, 2011).

A bananeira pode ser diferenciada em três fases de desenvolvimento, a fase infantil, fase juvenil e a fase reprodutiva, que duram cerca de 90-100 dias cada a depender da cultivar utilizada e das condições de campo (Donato et al, 2015).

A cultura da banana requer, para seu bom desenvolvimento e produtividade, condições climáticas de regiões tropicais com temperaturas que podem variar entre 15°C e 35°C, umidade relativa de 80%, com precipitação anual de 1.900 mm (Borges & Souza, 2004).

As variedades de banana cultivadas pertencem a diferentes grupos genômicos formados, principalmente, pelos cruzamentos entre duas as espécies diploides selvagens *Musa acuminata* Colla (AA) e *Musa balbisiana* Colla (BB), originando híbridos (SIMMONDS, 1955). No Brasil, as variedades mais produzidas para o mercado interno são triploides do grupo AAB (Prata, Pacovan, Prata Anã, Maçã, terra e D'Angola) e para exportação, variedades do grupo genômico AAA (Nanica, Nanicão e Grande Nine) (Cordeiro et al., 2004; Pereira et al., 2006; Lima et al., 2012).

A banana é um dos frutos mais consumidos mundialmente devido seu alto valor nutritivo como fonte de energia, vitaminas e minerais, podendo ser consumida in natura ou processada (Borges & Souza, 2004).

Os países que ocupam as primeiras posições no ranking mundial como produtores de banana são a Índia, a China, a Indonésia e o Brasil, ocupando o 1^a, 2^a, 3^a e 4^a posição respectivamente. De acordo com os dados da FAO (2021), o Brasil produziu em 2019 aproximadamente 7 milhões de toneladas de banana, destacando os estados de São Paulo (15%), Bahia (12,16%) e Minas Gerais (12,11%) com maior produção e deste montante, maior parte se direciona ao mercado interno (IBGE, 2019).

Algumas doenças e pragas acometem esta cultura, podendo ser causadas por bactérias, fungos, insetos, nematoides e vírus, acarretando a redução da

produtividade. Dentre as doenças, as que se destacam são a Fusariose (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (FOC)), apresentando como principais sintomas o amarelecimento foliar e a murcha da planta, a Sigatoka Amarela (*Mycosphaerella musicola*) e Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis*) ambas apresentando manchas foliares em forma de estria como sintoma principal das doenças (Cordeiro et al., 2004; Ploetz et al., 2006).

Fusariose da Bananeira

A Fusariose ou Murcha de *Fusarium* ou ainda Mal do Panamá, é considerada uma das doenças mais destrutivas da bananicultura e é causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, fungo de solo, pertencente ao Filo Ascomycota, sem forma sexuada conhecida, sendo que em sua forma assexuada/anamórfica são produzidos esporos de 3 tipos: os microconídios, macroconídios e clamidósporos (Cordeiro et al., 2004; Ploetz et al., 2006).

Os microconídios e os macroconídios são estruturas de reprodução produzidas em maiores quantidades em condições favoráveis ao desenvolvimento do fitopatógeno, estes esporos podem ser diferenciados morfológicamente, pois os microconídios são constituídos apenas por uma célula, possui formato oval a reniforme, hialino, já os macroconídios são ligeiramente curvados, fusiformes e multicelulares. Os clamidósporos são esporos de sobrevivência, com paredes espessas, de formato globoso, sua produção se dá a todo momento durante o ciclo da doença, mas sua maior produção se dá no momento em que o fungo está crescendo de forma saprofítica, permitindo sua permanência e viabilidade no solo por até 30 anos (Leslie et al., 2006; Dita et al., 2018; Olivares et al., 2021).

O processo de infecção por FOC, inicia-se quando os clamidósporos são estimulados a germinar pela liberação de exsudatos das raízes do hospedeiro, ao alcançar as raízes as hifas penetram nos tecidos do hospedeiro por ferimentos na raiz principal ou, mais comumente, por aberturas naturais na base de onde saem as raízes secundárias, o micélio continua a crescer e atinge o córtex, passa pela epiderme e atinge os vasos do xilema, ao colonizar os vasos xilemáticos, o fungo continua a produzir conídios e clamidósporos. Como uma resposta de defesa da planta ocorre a formação tiloses, que são estruturas capazes de impedir a passagem do patógeno para as partes mais superiores da planta, porém

juntamente com as estruturas do fungo, acabam causando o entupimento dos vasos, impossibilitando a translocação de seiva, isto irá desencadear um processo de amarelecimento seguido de murcha das folhas mais velhas, até que atinja todas as folhas e a planta esteja toda murcha com um aspecto de guarda-chuva fechado, sintoma característico da Murcha de Fusarium, levando até a morte da planta. A disseminação do patógeno se dá principalmente atividades antrópicas, animais que transitam nos solos infestados, mudas e transporte de solo contaminado (Dita et al., 2018; Olivares et al., 2021).

A diferentes raças do patógeno são identificadas com base na cultivar em que é capaz de causar doença, isto possibilita identificar quais raças são endêmicas em um determinado local. As cultivares Gros Michel, Maçã, Prata, são susceptíveis a raça 1 (R1) do patógeno; a raça 2 (R2) afeta a cultivar 'Figo'; a raça 3 (R3) causa danos as Helicônias; e a raça 4 está dividida em dois grupos a Raça Subtropical 4 (RST4) e a Raça Tropical 4 (RT4). A RST4 causa danos as cultivares do Subgrupo Clavendish em regiões de clima subtropical, já a RT4 causa danos em no mesmo subgrupo e as cultivares resistentes e suscetíveis as raças 1 e 2 em regiões tropicais e subtropicais. No Brasil são relatadas as ocorrências das R1, R2, R3 e a RST4, porém se encontra como um país quarentenário a RT4, toda via o Peru e a Colômbia, países que dividem fronteira com o Brasil já é endêmico RT4, reforçando a grande preocupação em manter o país livre de cepas desta raça. A R1 é a raça mais difundida no país e foi responsável por tornar escassos os plantios da cultivar Maçã, a saída tem sido a seleção de híbridos resistentes as raças difundidas no país (Costa, 2015; Dita et al, 2018; Gonçalves et al, 2019; Gasparotto et al, 2020; Olivares et al, 2021).

Sigatoka Amarela

A sigatoka-amarela tem como agente causal um fungo pertencente ao Filo Ascomycota, *Mycosphaerella musicola* (forma teliomórfica) / *Pseudocercospora musae* (forma anamórfica). É uma doença foliar que interfere no processo produtivo da planta causando perdas econômicas e sociais por todo o mundo (Arzanlou 2007). As quedas da produtividade da cultura são em decorrência da redução da

área fotossintética da folha, refletindo na redução do tamanho e quantidade dos frutos (Cordeiro et. al, 2004).

A doença foi observada pela primeira vez em Java, por Zimmermann em 1902. Posteriormente houve a ocorrência da doença em sua forma epidêmica no distrito de Sigatoka na ilha de Viti Levu, em Fiji, em 1912, a partir desta ocorrência a doença foi denominada como doença-de-Sigatoka ou, somente, Sigatoka. No Brasil, foi registrada a ocorrência primária no estado do Amazonas em 1944, posteriormente se estendendo por todos os estados brasileiros.

Segundo Agrios (2005), a produção de conídios geralmente ocorre em estágios primários da doença. Esta produção requer um ambiente de clima úmido e a disseminação desta estrutura propagativa se dá pela água da chuva ou orvalho e o vento a curtas distâncias. Os ascósporos são produzidos nos peritécios, em lesões que primeiramente houve a produção e liberação dos conídios. A produção dos ascósporos pode ocorrer em ambientes de clima úmido ou seco, porém para sua disseminação é necessário à ocorrência de orvalhos pesados e as correntes de ar que são responsáveis pela sua disseminação a distâncias maiores. Ainda, segundo Agrios (2005), a infecção por qualquer um dos dois tipos de esporos causa o mesmo tipo de lesão e posterior desenvolvimento da doença.

Após a disseminação e os esporos estarem em contato com a planta sadia, as condições do ambiente irão influenciar na germinação dos esporos, a partir disso há um crescimento micelial na superfície da folha até que ocorra a penetração nos tecidos por aberturas naturais, os estômatos (Agrios 2005). A infecção ocorre em folhas mais jovens, em ordem decrescente, vão da “vela” à folha 3, pois são mais susceptíveis (Cordeiro et. al, 2004). Dentro dos tecidos, estes patógenos irão causar destruição total ou parcial, isto de acordo com algumas variáveis, como: número e tamanho das lesões; resistência da cultivar; condições ambientais; e tratamentos fitossanitários (Ferrari e Nogueira, 2013).

Posterior a colonização do fungo nos tecidos das folhas de bananeira e a progressão da doença, ocorre um decaimento da produção, que consiste na redução no tamanho e número de cachos. Esta ocorrência se dá devido os sintomas que o patógeno desencadeia hospedeiro, que em seu estágio mais avançado é o aparecimento de lesões necróticas nas folhas, assim reduzindo a área fotossintetizante, acarretando perdas na produção (Arzanlou 2007).

Sigatoka Negra

Com o surgimento mais recente que a Sigatoka Amarela, a Sigatoka Negra apareceu pela primeira vez nas ilhas de Fiji, no continente asiático, no ano de 1963. No Brasil, o surgimento da doença foi identificado primeiramente no estado do Amazonas, em 1998. Atualmente é uma das doenças de grande importância para a cultura, pois às perdas na produção podem chegar até 100% dependendo da variedade utilizada e se as práticas culturais devidas são aplicadas (Cordeiro et. al, 2004). Ramos (2018) relata o aparecimento de sintomas da doença na cidade de Cruz das Almas-BA no ano de 2015.

Assim como a Sigatoka Amarela, a Sigatoka Negra também é uma doença foliar, caracterizada pelo aparecimento de estrias escuras paralelas as nervuras secundarias, que levam a diminuição da área ativa da folha, reduzindo a capacidade fotossintética, resultando em perdas na produção. A Sigatoka Negra é uma doença com uma maior gravidade que a Sigatoka Amarela, pois os distúrbios provocados na planta são de maior intensidade (Ferrari e Nogueira, 2013; Cordeiro et al., 2014).

A Sigatoka Negra é causada pelo fungo pertencente ao filo Ascomycota, *Mycosphaerella fijiensis* (forma teliomórfica) / *Paracercospora fijiensis* (forma anamórfica). Sua infecção e disseminação são influenciadas pela presença de umidade, temperatura e vento. Havendo condições favoráveis, após a disseminação e o esporo repousar sobre a folha sadia, irá germinar e o tubo germinativo irá desenvolver sobre o limbo foliar até que ocorra a penetração via estômatos. Após, o fungo irá desencadear o processo infeccioso nos tecidos internos da folha, assim como na Sigatoka Amarela, ocorrerá o aparecimento de lesões necróticas em forma de estrias paralelas as nervuras secundárias das folhas, porém se diferem por apresentar machas negras (Cordeiro et al., 2004).

Devido a Sigatoka Negra ser mais agressiva e mais eficiente na ocupação dos sítios de infecção, por apresentar maior número e mais precoce produção de esporos, em locais onde há a incidência da Sigatoka Negra, a Sigatoka Amarela em poucos anos não é mais encontrada (Ferrari e Nogueira, 2013; Caverro et al., 2015; Cordeiro et al., 2004).

A consequência das lesões causadas pela doença é redução da produtividade nos bananais, e é uma realidade preocupante aos produtores, pois

as perdas variam de 70% a 100% dependendo da variedade utilizada e se as práticas culturais devidas são devidamente aplicadas (Cordeiro et al., 2004). Desta maneira, tanto para a Sigatoka Negra, quanto para Sigatoka Amarela, é necessário que medidas de controle sejam implementadas a fim de excluir ou reduzir a doença de áreas produtoras.

Manejo das Doenças

A Sigatoka Negra e a Sigatoka Amarela são doenças de grande seriedade na bananicultura e difícil controle. A melhor estratégia para controlá-las é através do manejo integrado, com a utilização de variedades resistentes, drenagem, desfolha sanitária, combate às plantas infestantes, nutrição das plantas, entretanto o controle químico consiste como a principal prática utilizada (Cordeiro et. al, 2004; Cavero, 2015).

Dentre os fungicidas utilizados no manejo das Sigatokas há diferenças no ingrediente ativo e nos mecanismos de ação. Os do grupo G1-Triazol, o Flutriafol, atua na inibição da biossíntese de ergosterol; o C3- Metoxi-acrilato, a Azoxistribina, tem como sítio o Complexo III, atuando na inibição extracelular de quinona, consequentemente impossibilitando a formação de ATP; e o grupo G1- Triazol, o Tebuconazol, que tem como sítio a C14- desmetilase, inibindo a biossíntese de esterol. Esses dois últimos fungicidas podem ser usados de forma combinada, possibilitando um maior número de mecanismos de ação, aumentando a eficiência do controle (Nogueira, 2009; De Bellaire, 2010; Frac, 2021). No entanto, esta prática gera preocupações quanto seu uso seguro, pois pode acarretar em danos indesejáveis ao meio ambiente, contaminando o solo, a água, afetando também organismos não-alvo ocasionando um desequilíbrio ecológico e podendo ser prejudicial à saúde humana (Orozco, 2008; Tyszkiewicz et. al, 2022).

Devido FOC ser um fungo de solo e a não existência de fungicida eficiente no seu controle, pesquisadores e produtores por todo mundo se preocupam com o manejo da doença. Até o momento o manejo integrado tem sido o meio mais eficiente no controle da Fusariose, dentro dele a prática mais recomendada é o plantio de mudas certificadas e variedades resistentes ao patógeno, entretanto deve-se levar em conta que a utilização de variedades resistentes não é uma solução duradora, pois com o surgimento de novas raças e com a variabilidade

genética do patógeno possibilita a quebra de resistência em um curto período. Para os casos em que se deseja utilizar cultivares suscetíveis, o local de plantio deve ser livre da incidência de FOC, mantendo sempre as condições favoráveis para um bom desenvolvimento das plantas. Visto que para R4 ainda não existem variedades resistentes, surge a necessidade em implementar novos métodos e partir disto o controle biológico é trazido como uma alternativa eficaz para enfrentar a Murcha de *Fusarium* (Gasparotto et al, 2020).

Com o intuito de implementar novas práticas no manejo, o uso de microrganismos, principalmente bactérias do gênero *Bacillus* e fungos do gênero *Trichoderma*, tem auxiliado no desenvolvimento de plantas tanto no aspecto nutricional pela solubilização e disponibilização de substâncias importantes para o desenvolvimento vegetal, quanto no combate a doenças, seja ele direto, pelo antagonismo ou indireto, pela indução de resistência (Bubici, 2019; Gasparotto et al, 2020; Moreira et al., 2020; Melo et al., 2021; PROMUSA, 2021)

Controle biológico

Para Cook & Baker (1983) o controle biológico é “a redução da soma de inoculo ou das atividades determinantes da doença, provocada por um patógeno, realizada por um ou mais organismos que não o homem.” Aplicado este conceito o controle biológico se dá pela utilização de microrganismos não patogênicos.

O controle biológico é um fenômeno que ocorre naturalmente e a utilização desta estratégia no controle de doenças plantas em diversas culturas e na cultura da banana tem apresentado resultados motivadores ao seu uso associado ao manejo integrado, reduzindo perdas na produção. A aplicação em plantações é realizada utilizando o microrganismo vivo ou seus metabólitos, e para que haja sucesso alguns fatores devem ser estudados antes de sua aplicação em campo (Dita, 2018; Bubici et. al, 2019; Tyszkiewicz et. al, 2022).

Para a seleção e regulação dos microrganismos deve ser levado em conta a sua eficiência, que consiste nos seus mecanismos de ação; a segurança, se realmente não é patogênico a planta e não trará danos ambientais e a saúde humana; e a sua produção, se é realizada em grandes quantidades e se é de baixo custo (Bettioli e Morandi, 2009).

Espécies consideradas como agentes de biocontrole, como *Bacillus subtilis*, *B. simplex*, *B. amyloliquefaciens*, *Trichoderma atrovirida*, *T. harzianum*, *T. virens* atuam por diferentes mecanismos de ação, demonstrando eficácia comparada a fungicidas químicos, realizando a supressão de fitopatógenos (Thangavelu et al., 2004; Cavero et al., 2015; Khan et al., 2018; Martín et al., 2020).

Espécies do gênero *Trichoderma*, durante o seu crescimento, liberam enzimas de interesses biotecnológicos e de biocontrole. Seus múltiplos mecanismos de ação que podem ser empregados e apresentam vantagens por agirem simultaneamente no controle de fitopatógenos, podendo destacar os mecanismos que agem diretamente sobre o patógeno como: o micoparasitismo, em que o *Trichoderma* é atraído por sinais químicos a parasitar outros fungos; e a antibiose, na liberação de metabólitos que desempenham efeito danoso as estruturas de outros fungos. Além destes mecanismos, espécies de *Trichoderma* podem apresentar a capacidade de agir indiretamente contra patógenos por meio da indução de resistência sistêmica, através da produção e liberação de metabólitos e fitormônios que desencadeiam cascatas de sinalizações e ativação de genes das plantas associados a resistência aos fitopatógenos e pela competição por recursos. Uma outra vantagem no uso de *Trichoderma* spp. é a sua capacidade de colonizar diferentes materiais em diferentes condições e também por sua capacidade em formar estrutura de resistência, os escleródios (Acosta et. al, 2013; Cavero et. al, 2015; Isaias et. al, 2014; Köhl et al., 2019; Monti et. al, 2020).

Cavero (2015), avaliou o potencial de biocontrole de isolados de *Trichoderma* spp. em condições de campo e verificou que um isolado da espécie *Trichoderma atrovirida* se apresentou tão eficaz no controle da Sigatoka Negra, quanto o fungicida Azoxystrobin. Arzate (2006) testou *in vitro* a ação de isolados de *Trichoderma* spp. e verificou que oito isolados diferentes apresentaram antagonismo contra *M. fijiensis*. Thangavelu (2004) utilizou formulação seca de *Trichoderma harzianum* e observou um controle efetivo na Murcha de Fusarium em bananeira.

Os mecanismos de ação de bactérias do gênero *Bacillus* contra agentes patogênicos de plantas, assim como o *Trichoderma*, podem ser divididos em ação direta e ação indireta. Os mecanismos de ação direta compreendem a antibiose, por meio da liberação de lipopeptídeos das famílias Iturina e Fengicina; e a competição por recursos. Já a ação indireta, compreende a indução de

resistência por meio da liberação de sinais químicos que desencadeiam na planta a ativação de genes de resistência para a produção de etileno, ácido jasmônico e proteínas associadas a patogênese (Bettiol e Morandi, 2009). Outra vantagem na utilização destas bactérias é a característica de sobreviver a diferentes condições climáticas, devido sua capacidade de formar endósporos, estrutura de resistência, e a promoção de crescimento da planta, por meio de fixação de nitrogênio, solubilização de nutrientes, sínteses de fitormônios (Bettiol e Morandi, 2009).

Martín (2020) observou em trabalhos *in vitro* que metabolitos obtidos de filtrados da estirpe CCIBP-M27 de *Bacillus subtilis* apresentou efeito antimicrobiano contra *P. fijiensis*, estes metabolitos com atividade antimicrobiana agiram causando deformidade em hifas e conídios acarretando na diminuição da germinação, conseqüentemente reduzindo a carga do patógeno. Kham (2018), em seu trabalho, pode observar que o antagonismo *in vitro* de *Bacillus simplex* e *Bacillus subtilis* apresentou a redução de 60 a 70% no crescimento micelilal de *Fusarium spp.*.

Fungicidas a base de *Trichoderma spp.* são amplamente utilizados no controle de doenças fúngicas, como exemplo o TRICHODERMIL® SC1306, composto por *Trichoderma harzianum* Rifai, cepa ESALQ-1306, que pode ser aplicado contra fungos e nematoides. A produção de fungicidas a partir de cepas de *Bacillus* também já vem sendo comercializados para o combate de doenças fúngicas, como exemplo o fungicida SERENADE® composto por *Bacillus subtilis* linhagem QST 713, regulamentados pelo MAPA para uso em cultivos orgânicos, agindo sobre uma ampla gama de patógenos.

Tendo visto que as doenças em pauta se tratam de doenças com alto poder destrutivo de uma cultura de interesse agrônômico, *Musa spp.*, o biocontrole se apresenta como uma alternativa sustentável tanto econômica, quanto ecologicamente, a ser adicionada ao manejo integrado das doenças causadas por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, *Mycosphaerella fijiensis* e *Mycosphaerella musicola*. Objetivando reduzir os efeitos destes fitopatógenos sobre *Musa spp.*, o segundo capítulo traz uma pesquisa inicial sobre os efeitos de alguns isolados de *Bacillus* e *Trichoderma* sobre o crescimento micelial dos fitopatógenos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIOS, GN (2005) Plant Pathology. Amsterdam: Elsevier Academic Press.

Aurore, G, Parfait, B, Fahrasmane, L (2009) Bananas, raw materials for making processed food products. Trends in Food Science & Technology, v. 20, n. 2, p. 78-91.

Arzanlou, M, Abeln, ECA, Kema GHJ, Waalwijk, C, Carlier, J, De Vries, I, Guzmán, M, Crous, PW (2007) Molecular diagnostics for the Sigatoka disease complex of banana. Phytopathology. v. 97, n. 9, p. 1112-1118.

Arzate, JV, Michel, ACA, Domínguez, VMM, Santos, OAE (2006) Antagonismo de *Trichoderma* spp. sobre *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, Agente Causal de la Sigatoka Negra del Plátano (*Musa* sp.) in vitro e Invernadero. Revista Mexicana de Fitopatología, v.24, p.98-104.

Bettiol, W, Morandi, MAB (2009) Biocontrole de doenças de plantas: usos e perspectivas, Embrapa: Jaguariuna-SP, Cap 3, p.30.

Bubici, G, Kaushal, M, Prigigallo, MI, Gómez-Lama Cabanás, C, Mercado-Blanco, J (2019) Biological Control Agents Against *Fusarium* Wilt of Banana. Front. Microbiol. 10:616

Cook, RJ, Baker, KF (1983) The nature and practice of biological control of plant pathogens. P. 539.

Cordeiro, ZJM, Matos AP, Meissner Filho, PE (2004) Doenças e métodos de controle. In: BORGES, A. L.; SOUZA, L. da S. O cultivo da bananeira. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical.

Cordeiro, ZJM, Rocha, HS, Araújo, AG, (2011) Metodologia para manuseio de *Mycosphaerella musicola* em laboratório. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura.

Costa, SN, Bragança, CAD, Ribeiro, LR, Amorim, EP, Oliveira, SAS, Dita, MA, Haddad, F (2015) Genetic structure of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ubense* in different regions from Brazil. Plant Pathology, Oxford, v .64, n.1, p.137-146.

Cavero, PAS, Hanada RE, Gasparotto, L, Coelho RA, Souza, JT (2015) Biological control of banana black Sigatoka disease with *Trichoderma*. *Ciência Rural*. v. 45, n. 6, p.951-957.

Dita M, Barquero M, Heck D, Mizubuti ESG and Staver CP (2018) Fusarium Wilt of Banana: Current Knowledge on Epidemiology and Research Needs Toward Sustainable Disease Management. *Front. Plant Sci.* 9:1468.

Donato, SLR, Arantes, AM, Marques, PRR, Rodrigues, MG (2015) Considerações ecofisiológicas e estratégias de manejo da bananeira. *Informe Agropecuário*, v.36, n.288, p.13-26.

FAO Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2021. Agricultural Database.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Produção brasileira de banana 2017. 2018.

Ferrari, JT, Nogueira, EMC (2013) Principais Doenças Fungicas da Bananeira. In: Nogueira, EMC, Gatti, IM Ferrari, JT, Beriam, OS (Org.). *anicultura: manejo fitossanitário e aspectos econômicos e sociais da cultura*. 1ªed.

Gasparotto, L, Dita, M, Alexandre, JR, Schurt, DA, Leite, RSV (2020) *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* raça 4 tropical: Perigo para a bananicultura nacional.

Gonçalves, ZS, Haddad, F, Amorim, VBO, Ferreira, CF, Oliveira, SAS, Amorim, EP (2019) Agronomic characterization and identification of banana genotypes resistant to *Fusarium* wilt race 1. *Eur J Plant Pathol* 155, 1093–1103.

Isaias, CO, Martins, I, Silva, JBT, Silva, JP, Mello, SCM (2014) Ação antagônica e de metabólitos bioativos de *Trichoderma* spp. contra os patógenos *Sclerotium rolfsii* e *Verticillium dahliae*. *Summa Phytopathologica*, v.40, n.1, p.34-41.

Khan, N, Martínez, P, Ice TA (2018) Antifungal Activity of Bacillus Species Against *Fusarium* and Analysis of the Potential Mechanisms Used in Biocontrol. *Front Microbiol.* v. 9, p. 2363.

Köhl, J., Kolnaar, R., & Ravensberg, W. J. (2019). Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: relevance beyond efficacy. *Frontiers in plant science*, 845.

Leslie, JF, Summerell, BA (2006) *The Fusarium Laboratory Manual*. USA. Blackwell Publishing. p. 388.

Leão, EU, Silva, JC, Medeiros, FR, Macêdo, GSSR, Adorian, GC, Maringoni, AC, (2016) Potencial in vitro de *Bacillus* spp. no controle de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em feijoeiro-comum. Summa Phytopathologica. v. 42, n. 4, p.360-362

Machado, DFM, Parzianello, FR, Silva, ACF, Antonioli, Z.I. *Trichoderma* no Brasil: O fungo e o bioagente. Revista de Ciências Agrárias, v. 35, n. 1, p. 274-288, 2009.

Martín, CM, Mena, E, Suaréz, MA, Pichardo, T, Rodriguez, E, Capó, YA (2020) Protein compounds of *Bacillus subtilis* with in vitro antifungal activity against *Pseudocercospora fijiensis* (Morelete). Brazilian Journal of Microbiology.

Moreira, FM, Cairo, PAR, Borges, AL, Silva, LD, Haddad, F (2021). Investigating the ideal mixture of soil and organic compound with *Bacillus* sp. and *Trichoderma asperellum* inoculations for optimal growth and nutrient content of banana seedlings. South African Journal Of Botany, 137, 249-256.

Melo, TA, Nascimento, ITVS e Serra, IMRS (2021). The *Bacillus* genus applied to the biological control of plant diseases. Research, Society and Development, 10-9.

Monti MM, Pedata PA, Gualtieri L., Ruocco M. (2020) The Vocabulary of Trichoderma-Plant Interactions. In: Sharma A., Sharma P. (eds) Trichoderma. Biologia da Rizosfera. Springer, Singapura, 19-33.

Olivares, B, Luján, DL, Cortés, JN, Landa, BL, Rey, JC, Gómez, JA (2021). Fusarium Wilt of Bananas: A Review of Agro-Environmental Factors in the Venezuelan Production System Affecting Its Development. Agronomy, 11. 1-24.

Orozco, MS, Orozco, JR, Pérez, OZ, Manzo, GS, Farías JL, Moraes, WS (2008) Prácticas culturales para el manejo de la Sigatoka negra en bananos y plátanos. Tropical Plant Pathology, v. 33, n. 3, p. 189-196.

Ploetz, RC (2006) 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.

PROMUSA. Tropical race 4. Disponível em: <https://www.promusa.org/Tropical+race+4+-+TR4>. Acesso em: 05 nov. 2021.

Ramos, JB, Bragança, CAD, Rocça, LS, Oliveira, AS, Cordeiro, ZJM. Haddad, F (2018) First Report of Black Sigatoka of Banana Caused by *Mycosphaerella fijiensis* in Bahia Brazil. Plant Disease.

Simmonds, NW, Shepherd, K (1955) The taxonomy and origins of the cultivated bananas. Jornal da Sociedade Linnean de Londres, Botany, 55 (359), p. 302-312.

Thangavelu, R, Palaniswami, A, Velazhahan, R (2004) Mass production of *Trichoderma harzianum* for managing fusarium wilt of banana. Agriculture, Ecosystems & Environment, v. 103, n. 1, p.259-263.

Tyśkiewicz, R., Nowak, A., Ozimek, E., & Jaroszek-Ścisła, J. (2022). Trichoderma: The Current Status of Its Application in Agriculture for the Biocontrol of Fungal Phytopathogens and Stimulation of Plant Growth. International journal of molecular sciences, 23(4), 2329.

CAPUTULO II

**Controle Biológico de *Mycosphaerella musicola* e
Mycosphaerella fijiensis por *Trichoderma Asperellum* e *Bacillus*
spp. e seu uso de forma combinada no controle do *Fusarium*
oxysporum f. sp. *cubense***

Controle Biológico de *Mycosphaerella musicola* e *Mycosphaerella fijiensis* por *Trichoderma Asperellum* e *Bacillus* spp. e seu uso de forma combinada no controle do *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*

Mariana Pereira Santana¹, Harllen Sandro Alves Silva², Fernando Haddad²

RESUMO: Doenças fúngicas têm causado perdas na produtividade de *Musa* spp.. A busca por métodos de controle seguros e sustentáveis abre espaço ao uso de microrganismos como agentes de biocontrole destas doenças. Este trabalho objetivou testar a cepa CMF1007 de *Trichoderma asperellum* e selecionar entre 10 isolados do gênero *Bacillus* cepas com potencial para biocontrole dos patógenos *Mycosphaerella musicola* (MM) e *Mycosphaerella fijiensis* (MF) e testar o uso dos isolados bacterianos de maneira combinada no biocontrole de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (FOC). Os patógenos MM e MF foram submetidos a 3 testes: 1- Teste de biocontrole por pareamento de culturas, para verificação da formação de halos de inibição dos fitopatógenos; 2- Teste de placas invertidas, para avaliação do efeito dos compostos voláteis produzidos por CMF1007 e *Bacillus* spp. sobre os isolados de MM e MF; e 3- Teste de compostos difusíveis produzidos *Bacillus* spp. sobre os isolados de MM e MF. Já FOC, foi submetido ao teste de pareamento direto com 5 combinados bacterianos obtidos a partir do teste de antibiose recíproca. Dos isolados testados, o 399 e o APC51 do gênero *Bacillus* e o isolado fúngico CMF1007 apresentaram maior efeito inibitório no crescimento dos agentes causais das Sigatokas pelo método *in vitro*, também se destacaram por modular crescimento dos fitopatógenos pela liberação de compostos voláteis. No teste de biocontrole de FOC, todos os tratamentos apresentaram inibição maior que 50%, sendo que assim como os combinados bacterianos M1, M2, M3 e M5, os tratamentos usando APC51, 399, BAC2, BAC4, 01C e APC07 apresentaram os maiores percentuais de inibição micelial contra FOC, se diferenciando estatisticamente das demais. Testes em plantas devem ser realizados a fim de verificar a eficácia dos agentes de biocontrole na supressão das doenças fúngicas.

Palavras-chave: Antibiose; Biocontrole; Manchas foliares; *Musa* spp.; Fusariose; Murcha de *Fusarium*.

¹Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, R. Rui Barbosa, Cruz das Almas - BA, 44380-000. ²EMBRAPA Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, Bahia, Brasil. *E-mail: malytay@gmail.com

Biological control of *Mycosphaerella musicola* and *Mycosphaerella fijiensis* by *Trichoderma Asperellum* and *Bacillus* spp. and their combined use in the control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense*

Mariana Pereira Santana¹, Harllen Sandro Alves Silva², Fernando Haddad²

ABSTRACT: Fungal diseases have caused losses in the productivity of *Musa* spp. The search for safe and sustainable control methods opens space for the use of microorganisms as biocontrol agents for these diseases. This study aimed to test the *Trichoderma asperellum* strain CMF1007 and select among 10 isolates of the genus *Bacillus* strains with potential for biocontrol of the pathogens *Mycosphaerella musicola* (MM) and *Mycosphaerella fijiensis* (MF) and to test the use of bacterial isolates in a combined way in the biocontrol of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* (FOC). The MM and MF pathogens were submitted to 3 tests: 1- Biocontrol test by pairing of cultures, to verify the formation of halos of inhibition of phytopathogens; 2- Inverted plate test, to evaluate the effect of volatile compounds produced by CMF1007 and *Bacillus* spp. on MM and MF isolates; and 3- Test of diffusible compounds produced *Bacillus* spp. on MM and MF isolates. On the other hand, FOC was submitted to the direct pairing test with 5 bacterial combinations obtained from the reciprocal antibiosis test. Of the isolates tested, 399 and APC51 of the genus *Bacillus* and the fungal isolate CMF1007 showed the greatest inhibitory effect on the growth of Sigatoka causal agents by the in vitro method, they also stood out for modulating the growth of phytopathogens through the release of volatile compounds. In the FOC biocontrol test, all treatments showed inhibition greater than 50%, and just like the bacterial combinations M1, M2, M3 and M5, treatments using APC51, 399, BAC2, BAC4, 01C and APC07 showed the highest percentages of mycelial inhibition against FOC, differing statistically from the others. Plant tests should be carried out to verify the effectiveness of biocontrol agents in suppressing fungal diseases.

Key-words: Antibiosis; Biocontrol; Leaf spot; *Musa* spp.; *Fusarium*; *Fusarium* wilt.

INTRODUÇÃO

A bananeira é uma cultura de grande importância econômica e social em diversos países, como a Índia, a China, a Indonésia, o Brasil e alguns países da África, servindo como alimento para famílias com diferentes poderes aquisitivos e renda para pequenos e grandes produtores. Ocupando o quarto lugar na produção mundial, o Brasil produziu em 2019 aproximadamente 7 milhões de toneladas de banana, destacando os estados de São Paulo (15%), Bahia (12,16%) e Minas Gerais (12,11%) (IBGE 2019; FAO 2021).

O desenvolvimento e a produtividade da bananeira são dependentes das condições de solo, clima, adubação adequada, manejo da cultura e da fitossanidade. A incidência de doenças na cultura causa perdas produtivas, podendo destacar as Sigatoka Amarela, a Sigatoka Negra e a Fusariose como um dos principais problemas fitossanitários da bananeira (Arzanlou et al., 2007).

As Sigatokas são doenças caracterizadas pelo aparecimento de manchas necróticas em forma de estrias paralelas as nervuras secundárias do limbo foliar, reduzindo a área fotossintética, refletindo na redução do rendimento e na qualidade de frutos. Apesar dessas doenças apresentarem sintomatologia foliares semelhantes, o agente patogênico *Mycosphaerella musicola* causador da Sigatoka Amarela, promove o aparecimento de estrias necróticas com halo amarelado, enquanto o agente patogênico *Mycosphaerella fijiensis*, causador da Sigatoka Negra, promove o aparecimento de estrias pretas, apresentando maior grau de severidade com relação a Sigatoka Amarela (Cordeiro et al., 2004; Arzanlou et al., 2007; PLOETZ, 2015; Dita et al., 2018). A principal prática de manejo para o controle destas doenças consiste no uso de fungicidas químicos (Nogueira et al., 2009; De Bellaire et al, 2010; FRAC, 2021).

O fungo de solo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (FOC), agente causal da Fusariose, penetra as raízes da planta, colonizando o xilema causando o entupimento de vasos, promove respostas de defesa da planta como a formação de tiloses, interrompendo a passagem de água para as partes superiores da planta e em decorrência, rachaduras no pseudocaule, amarelecimento das folhas, murcha foliar e morte da planta. Devido à alta variabilidade genética do patógeno refletindo em seus mecanismos de adaptação a diversas condições, a utilização de genótipos

resistentes de bananeira tem sido a maneira mais eficiente no manejo da doença (REBOUÇAS et al., 2018).

A práticas mais utilizadas no manejo das doenças são limitadas, a pratica mais eficaz no controle das Sigatokas é o uso de fungicidas químicos que por sua vez apresenta riscos ao meio ambiente e ao homem, além de selecionar cepas mutantes resistentes do patógeno aos seus mecanismos inviabilizando o uso por tempo prolongado. Já no caso de FOC, o uso de variedades resistentes é uma prática ecologicamente correta, porém a ocorrência de da Raça 4 tem preocupado produtores por todo o mundo por ainda não haver uma cultivar resistente. Devido isto, tem se tornando importante agregar novas estratégias ao manejo destas doenças e o uso de microrganismos com capacidade de impedir o estabelecimento dos patógenos tem mostrado resultados satisfatórios e por se tratar de uma prática ecologicamente e economicamente sustentável, permite sua inserção no manejo integrado da cultura em cultivos orgânicos (Kachhawa, 2017; O'BRIEN, 2017; IBAMA, 2020).

Espécies de microrganismos dos gêneros *Trichoderma* e *Bacillus*, apresentam uma serie de vantagens ao seu uso como biocontroladores, devido seus múltiplos mecanismos de ação como liberação de compostos capazes de modular o desenvolvimento de fitopatógenos e induzir a resistência sistêmica em plantas, o micoparasitismo, a competição por nicho e por nutrientes, a solubilização e disponibilização de nutrientes que auxiliam no desenvolvimento da planta, e somado os mecanismos listados a capacidade de formação de estrutura de resistência, escleródio (por *Trichoderma*) e endósporo (por *Bacillus*), que permite ao microrganismo sobreviver em diferentes condições, os torna bons candidatos ao controle biológico das doenças fúngicas da bananeira (Acosta et. al, 2013; Caveró et. al, 2015; Isaias et. al, 2014; Köhl et al., 2019; Martin et al., 2020; Monti et. al, 2020).

Deste modo, este trabalho objetivou-se testar a cepa CMF1007 de *Trichoderma asperellum* no controle de isolados de *Mycosphaerella musicola* e *Mycosphaerella fijiensis*, selecionar entre isolados do gênero *Bacillus* cepas com potencial para o controle biológico dos patógenos *Mycosphaerella musicola* e *Mycosphaerella fijiensis* por testes e testar a possibilidade do uso de combinados bacterianos no biocontrole de *Fusarium oxysporum f. sp. cubense*.

MATERIAL E MÉTODOS

Os testes *in vitro* foram conduzidos no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, Bahia, Brasil. Os isolados *Trichoderma asperellum*, as cepas de *Bacillus* spp. e os isolados CMF01708 de *Mycosphaerella musicola*, um isolado sem identificação molecular de *Mycosphaerella fijiensis* e o isolado 218A de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* são pertencentes a coleção de microrganismos do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa e da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (Tabela 1).

Tabela 1 Isolados dos microrganismos fitopatogênicos e de biocontrole, com respectivos códigos, espécie, hospedeiro, substrato e local de origem.

CÓDIGO	ESPÉCIE	HOSPEDEIRO	SUBSTRATO	LOCAL
CMF1007*	<i>Trichoderma asperellum</i>	Plantio Sisal	Solo	X
399*	<i>Bacillus</i> sp.	X	X	X
APC 51*	<i>Bacillus</i> sp.	'Prata Anã'	Pseudocaule	Cruz das Almas- BA
PA 05*	<i>Bacillus</i> sp.	'Prata Anã'	Pseudocaule	Cruz das Almas- BA
APC07*	<i>Bacillus</i> sp.	'Prata Anã'	Rizosfera	Cruz das Almas- BA
01C **	<i>Bacillus</i> sp.	Feijão	X	Cruz das Almas- BA
BAC 2 **	<i>Bacillus</i> sp.	X	X	Cruz das Almas- BA
BAC 3 **	<i>Bacillus</i> sp.	X	X	Cruz das Almas- BA
BAC 4 **	<i>Bacillus</i> sp.	X	X	Cruz das Almas- BA
BAC 5 **	<i>Bacillus</i> sp.	X	X	Cruz das Almas- BA
BAC 6 **	<i>Bacillus</i> sp.	X	X	Cruz das Almas- BA
CMF-01708 *	<i>Mycosphaerella musicola</i>	Banana 'Prata'	Filoplano	Jaíba-MG
MF-CRUZ*	<i>Mycosphaerella fijiensis</i>	Banana 'Grande Naine'	Filoplano	Cruz das Almas- BA
218A*	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	Nanica	Pseudocaule	Eldorado- SP

* Coleção Microbiológica do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa-Mandioca e Fruticultura.

**Coleção Microbiológica do Laboratório de Fitopatologia UFRB.

Teste de biocontrole por pareamento de culturas

Para o teste utilizando as bactérias como agentes de biocontrole foram feitas adaptações na metodologia descrita por Cruz-Martín (2016). No centro de cada placa de Petri contendo meio Ágar Nutriente (NA), utilizando hastes flexíveis com pontas de algodão estéreis, foi carimbado cada isolado bacteriano, formando colônias com 5mm de diâmetro no centro de cada placa, incubadas em B.O.D. à 28 °C, fotoperíodo de 12 h durante 24 h. Após este período foi feita a inserção dos isolados do patógeno, para qual foi preparada a suspensão de fragmentos de micélio dos isolados e uma alíquota de 1 mL foi adicionada à 9 mL de meio Batata Dextrose Ágar (BDA) em estado semi-fundente, acrescido de antibiótico e vertido sob as colônias bacterianas formando uma dupla camada, as placas foram seladas e mantidas a 28°C com fotoperíodo de 12h por 15 dias. Para o teste utilizando o *Trichoderma asperellum* como agente de biocontrole, primeiramente foi preparada a suspensão de fragmentos de micélio dos isolados dos patógenos, uma alíquota de 1 mL foi adicionada à 9 mL de meio Batata Dextrose Ágar (BDA) em estado semi-fundente e vertido em placa de Petri, após solidificação do meio de cultivo um disco de micélio do *T. asperellum* com 5 mm de diâmetro foi disposto no centro de cada placa, que foram seladas e incubadas em B.O.D. por 15 dias à 28 °C. O experimento foi feito em delineamento inteiramente casualizado, consistindo em 11 tratamentos e 4 repetições. A avaliação consistiu na observação do aparecimento de halo de inibição do crescimento fúngico, as placas foram fotografadas e as imagens foram submetidas ao software Image J, para mensuração da área de inibição, levando em conta que não houve aparecimento de halo de inibição nas amostras do Tratamento Controle.

Os dados foram submetidos o teste F, e as médias agrupadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), conduzidas por meio do software estatístico SISVAR (FERREIRA et al. 2011).

Efeito dos compostos voláteis produzidos por CMF1007 e *Bacillus* spp. sobre isolados CMF-01708 (*Mycosphaerella musicola*) e MF-CRUZ (*Mycosphaerella fijiensis*)

Para o teste, foi utilizada a metodologia por Lima Jr. (2017) com adaptações. Foram posicionados fundos de placas de Petri, um sobre o outro. Foi preparada a suspensão de fragmentos de micélio dos isolados fitopatogênicos e uma alíquota de 1 mL foi acrescida em 9 mL meio BDA em estado semi-fundente, vertido no fundo das placas de Petri que ficaram por cima, cada um separadamente, já no fundo que ficou por baixo foram repicados os isolados dos antagonistas (CMF1007 e *Bacillus* spp.) separadamente, as placas foram mantidas a 28°C com fotoperíodo de 12h por 15 dias. O teste consistiu em um delineamento inteiramente casualizado em 11 tratamentos e 4 repetições. As avaliações foram feitas por meio da observação do crescimento dos fitopatógenos sob influência dos tratamentos com os agentes de biocontrole em comparação ao Tratamento Controle (que não foi acrescido os agentes de biocontrole).

Efeito dos compostos difusíveis produzidos *Bacillus* spp. sobre isolados CMF-01708 (*Mycosphaerella musicola*) e MF-CRUZ (*Mycosphaerella fijiensis*)

Para o teste, foi utilizada a metodologia por Lima Jr. (2017) com adaptações. Os isolados de *Bacillus* spp. foram cultivados separadamente em frascos Erlenmeyer contendo meio Caldo Nutriente (CN), sob agitação por 7 dias. Posteriormente, as suspensões bacterianas foram filtradas em membrana de 20 µm separando as células do meio de cultivo com os metabolitos liberados no crescimento bacteriano. Posteriormente, foi preparada a suspensão de fragmentos de micélio dos isolados patogênicos e uma alíquota de 2 mL foi acrescida em 15mL meio BDA em estado semi-fundente, acrescido de 5 ml de filtrado de cada agente de biocontrole, a mistura foi vertida em placas de Petri e incubadas em B.O.D. à 28°C com fotoperíodo de 12h por 15 dias. O teste consistiu em um delineamento inteiramente casualizado em 10 tratamentos e 4 repetições. As avaliações foram feitas por meio da observação do crescimento dos fitopatógenos sob influência dos

tratamentos com os agentes de biocontrole em comparação ao Tratamento Controle (que não foi acrescido nenhum agente de biocontrole).

Teste de antibiose recíproca e preparo dos combinados bacterianos

Com o objetivo de potencializar o biocontrole pelo uso de combinações entre isolados bacterianos, foi realizado o teste de antibiose recíproca entre as 10 bactérias listadas na Tabela 1. Foi realizado o teste da dupla camada, de acordo com a metodologia descrita por Romeiro (2001). Os isolados foram multiplicados em Erlenmeyer contendo Caldo Nutritivo (CN) e postos sob agitação por 24h. As 10 bactérias foram divididas em 2 grupos a fim de facilitar o manuseio, cada grupo contendo 5 isolados, foram distribuídos em 5 pontos equidistantes na superfície do meio Ágar Nutriente, em placas de Petri, 5 µL de suspensão bacteriana, seguido de incubação a 28 °C por 24 h. Após, foi adicionado 1,0 mL de clorofórmio na tampa de cada placa por 20 minutos com as mesmas invertidas, as placas foram deixadas entreabertas em por 30 minutos para evaporação de resíduos de clorofórmio. Sobre as colônias mortas 5 mL de meio NA semissólido, contendo 0,1 mL de suspensão de células do isolado foram adicionados. As placas foram incubadas a 28 °C e examinadas após 48h horas para verificação da presença de halos de inibição. A presença de halos de inibição do crescimento bacteriano foi caracterizada como incompatibilidade entre os isolados, impossibilitando as combinações entre eles, já o não aparecimento do halo de inibição permitiu a formulação das combinações.

Efeito dos combinados bacterianos sobre o isolado 208A de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*

Para o preparo dos combinados bacterianos, os isolados bacterianos (tabela 1) foram multiplicados em meio CN e deixados sob agitação por 24h. Após o período de crescimento, as suspensões bacterianas foram ajustadas para o padrão de absorbância de 0,7 nm, e em tubos de ensaio, cada combinado bacteriano pode ser preparado unindo uma alíquota de valor igual para todos os integrantes. Cada combinado bacteriano foi pipetado a alíquota de 5 µl em discos de papel com 5mm de diâmetro posicionados em 4 pontos equidistantes, a 1 cm de distância das bordas da placa de petri, e um disco de micélio de FOC com ± 5 mm

de diâmetro foi disposto no centro da placa, as placas foram seladas e mantidas em B.O.D. por 10 dias à 28°C, a metodologia de pareamento foi baseada na descrita por Lima Jr. (2017) com adaptações. Os. O delineamento foi inteiramente casualizado, consistindo em 6 tratamentos X 1 Isolado fitopatogênico X 4 placas (cada placa contendo 4 repetições). Com o objetivo de verificar a relevância dos resultados alcançados com o uso dos combinados, as bactérias também foram utilizadas de forma separada para que fosse feita uma comparação entre os tratamentos. A avaliação foi realizada quando o tratamento controle atingiu a borda da placa e consistiu em medições do crescimento micelial de FOC, partindo do centro da colônia em direção ao local de inserção do tratamento utilizado (combinados bacterianos ou bactérias utilizadas separadamente) com auxílio de uma régua milimetrada. A partir dos dados, determinou-se a porcentagem de inibição do crescimento micelial (PICM) (Menten et al., 1976):

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

Os dados foram submetidos a análise de variância (ANAVA), e as médias agrupadas pelo teste Scott-Knott a 5%, ambas conduzidas por meio do software estatístico SISVAR (FERREIRA et al. 2011).

RESULTADOS

Testes de antagonismo *in vitro*: Pareamento direto de culturas, Efeito dos compostos difusíveis; e Efeito dos compostos voláteis

Os resultados apontaram que o crescimento micelial dos isolados fúngicos de *Mycosphaerella musicola* e *Mycosphaerella fijiensis* foi afetado pela interação com todas as 10 cepas bacterianas do gênero *Bacillus* spp. e com o isolado CMF1017 de *Trichoderma asperellum*. Os metabólitos secretados pelos agentes de biocontrole, durante o crescimento da colônia, apresentaram grande impacto na redução do desenvolvimento micelial dos fitopatógenos, variando o grau de inibição por isolado.

Nos testes de pareamento direto entre as 10 cepas bacterianas do gênero *Bacillus* spp. e os isolados fitopatogênicos, CMF1708 e MF-CRUZ, foi observado que todas as cepas apresentaram atividade antifúngica aos fitopatógenos. A inibição dos fitopatógenos pelo antagonista foi observada pela formação do halo de inibição (Fig01 e Fig02). Também foi observado que a medida dos halos de inibição não se restringe apenas ao local onde há o crescimento bacteriano, apontando que os metabólitos sintetizados e liberados no meio de cultivo são efetivos na inibição do crescimento *in vitro* dos fitopatógenos, e esta redução no crescimento pode ser mais bem observada nos testes de compostos voláteis e no teste de compostos difusíveis (Fig01 e Fig02).

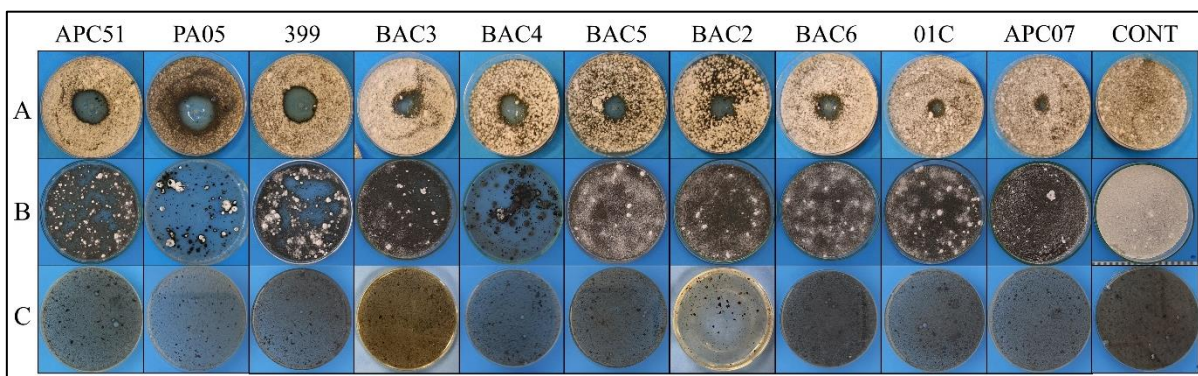


Fig. 1 Testes de biocontrole utilizando cepas de *Bacillus* sp. ou seus metabólitos na redução do crescimento micelial do isolado CMF1708 (*Mycosphaerella musicola*). As linhas correspondem as fotos dos resultados dos testes realizados, onde A: Pareamento direto de culturas; B: Efeito dos compostos difusíveis; e C: Efeito dos compostos voláteis. As colunas indicam os tratamentos utilizados, no qual encontra-se em ordem decrescente, ou seja, do tratamento que apresentou maior halo de inibição para o que apresentou o menor halo de inibição do crescimento micelial do isolado CMF1708. CONT: tratamento controle.

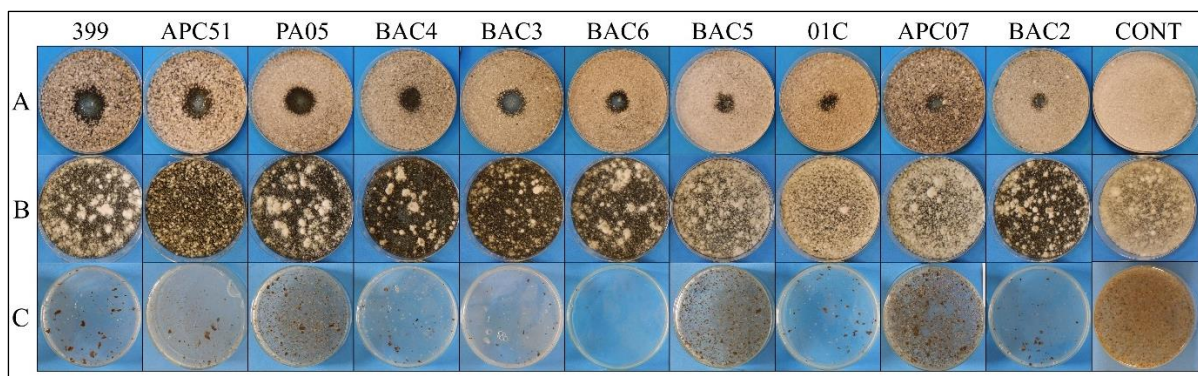


Fig. 2 Testes de biocontrole utilizando bactérias ou seus metabolitos na redução do crescimento micelial do isolado MF-CRUZ (*Mycosphaerella fijiensis*). As linhas correspondem as fotos dos resultados dos testes realizados, onde A: Pareamento direto de culturas; B: Efeito dos compostos difusíveis; e C: Efeito dos compostos voláteis. As colunas indicam os tratamentos utilizados, no qual encontra-se em ordem decrescente, ou seja, do tratamento que apresentou maior halo de inibição para o que apresentou o menor halo de inibição do crescimento micelial do isolado MF-CRUZ CONT: tratamento controle.

Em confronto direto com o isolado CMF1708 (*M. musicola*), todas as bactérias testadas apresentaram o halo de inibição do crescimento micelial. A partir dos valores de área obtido foi possível selecionar 4 cepas bacterianas que se diferenciaram estatisticamente das demais, sendo elas APC51, PA05, 399 e BAC3, com maiores percentuais de inibição micelial, 15,5%, 14,9%, 13,5% e 12,8% respectivamente (Gráfico 1), as elegendo como potenciais candidatas ao uso no controle biológico da Sigatoka Amarela.

Em confronto com o isolado MF-CRUZ (*M. fijiensis*), foi possível selecionar 2 bactérias por se destacarem com maior percentual de inibição micelial, são estas APC51 com 10,27% e 399 com 10,85% de inibição micelial (Gráfico 1), se diferenciando estatisticamente das demais, as elegendo como potenciais candidatas ao uso no controle biológico da Sigatoka Negra.

Os isolados 399 e APC51 se destacaram por se apresentarem como as bactérias mais eficazes na redução do crescimento micelial de ambos isolados fitopatogênicos, atuando contra uma maior gama de patógenos, apresentando-se como potenciais agentes de biocontrole em comum contra a Sigatoka Amarela e Sigatoka Negra.

O isolado CMF1007 (*T. asperellum*) apresentou atividade antifúngica aos isolados de *Mycosphaerella musicola* e *Mycosphaerella fijiensis*, os inibindo completamente, este efeito foi observado tanto no teste de pareamento direto de culturas, quanto no teste dos efeitos dos compostos voláteis sobre o crescimento micelial (Fig 3), tornando um potencial agente de biocontrole das Sigatokas.

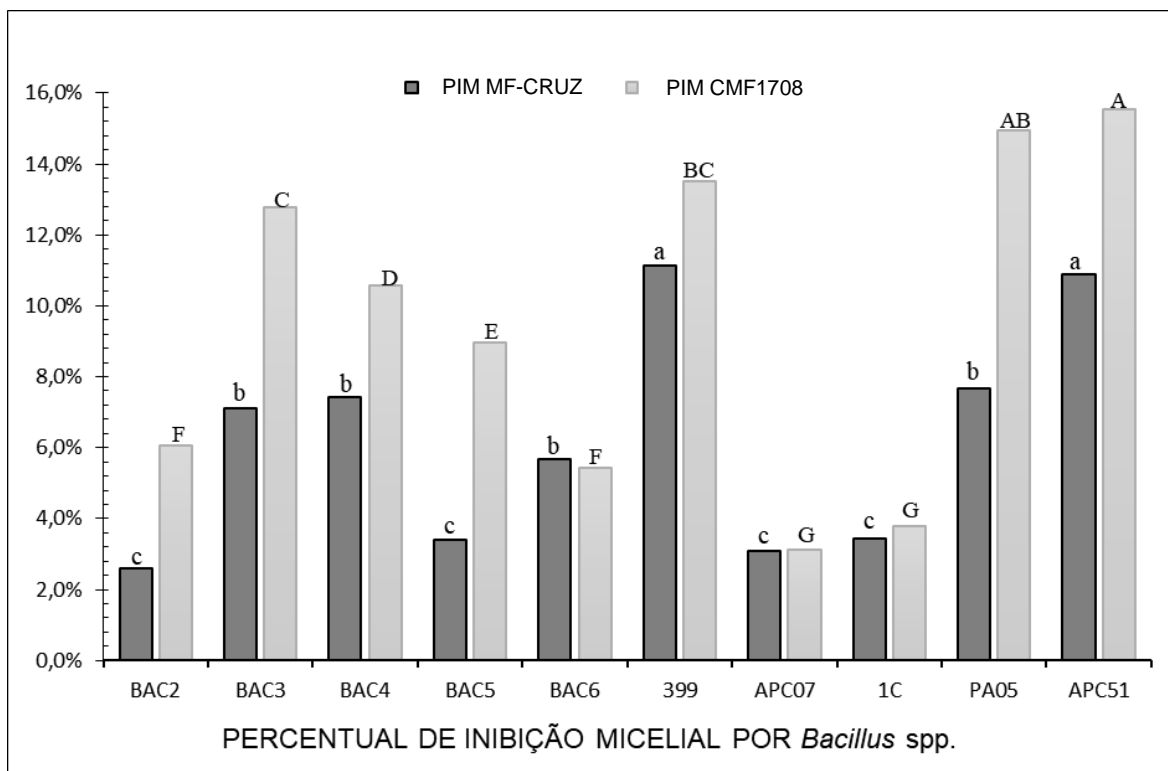


Gráfico 1. Percentual de Inibição Micelial por isolados bacterianos do gênero *Bacillus* em confronto com isolado de *Mycosphaerella fijiensis* (PIM MF-CRUZ) (Fig.2, linha A) e *Mycosphaerella musicola* (PIM CMF1708) (Fig.1, linha A), pelo teste de pareamento direto. As letras maiúsculas indicam os resultados de diferenças estatísticas entre os tratamentos aplicados ao isolado de *Mycosphaerella musicola*, enquanto as letras minúsculas indicam resultados de diferenças estatísticas entre os tratamentos aplicados ao isolado de *Mycosphaerella fijiensis*, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Os tratamentos aplicados estão descritos no eixo X e o percentual de inibição micelial respectivos estão indicados no eixo Y do gráfico.

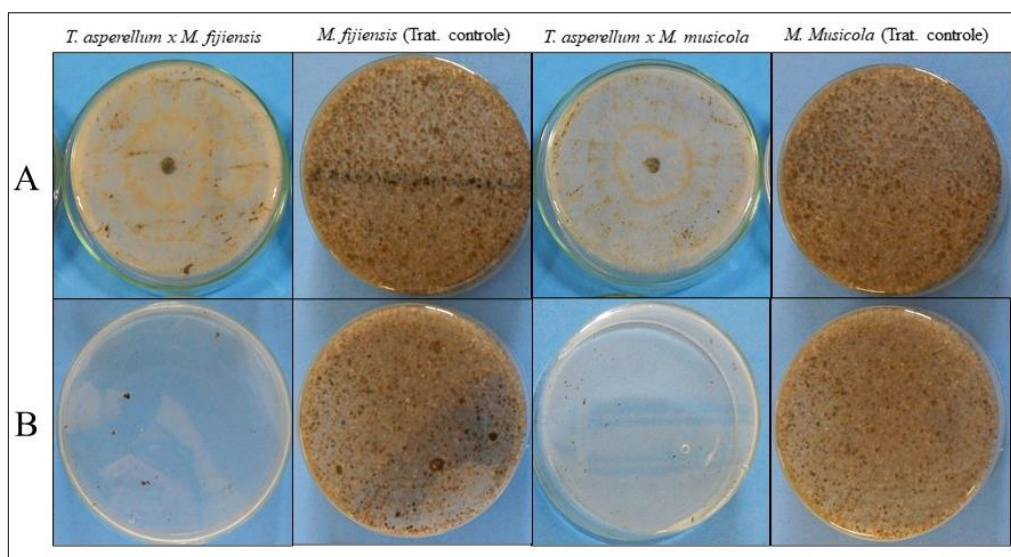


Fig. 3 Testes de biocontrole utilizando *Trichoderma asperellum* ou seus metabolitos na redução do crescimento micelial do isolado MF-CRUZ (*Mycosphaerella fijiensis*) e do isolado CMF1708 (*Mycosphaerella musicola*). As linhas correspondem as fotos dos resultados dos testes realizados, onde A: Pareamento direto de culturas; e B: Efeito dos compostos voláteis. As colunas indicam os tratamentos utilizados.

Combinados de bacterianos e Pareamento direto de culturas

O Teste de antibiose recíproca resultou na possibilidade de combinação e formulação de cinco Combinados bacterianos, tomando como base a compatibilidade entre um maior número de isolados combinados, possibilitando aumentar ainda mais a probabilidade de abranger um maior número de mecanismos de ação contra os fitopatógenos, sendo estes:

M1= 399 + APC51 + PA05 + APC07

M2= BAC2 + PA05; M3= BAC2 + 01C

M4= BAC3 + BAC4

M5= BAC 5 + BAC 6

A partir das médias obtidas no teste de pareamento direto entre o isolado 218A (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*) e os tratamentos, quer sejam os combinados bacterianos ou as bactérias utilizadas separadamente, foi verificado que todos apresentaram um alto percentual de inibição do crescimento micelial de FOC, proporcionando percentuais de inibição superiores a 50% (Gráfico 2).

Em comparação entre os Combinados Bacterianos, o M1 apresentou maior percentual de inibição, 62,2%, porém não se diferiu estatisticamente do M2 (60,4%), M5 (59,3%) e M3 (59%), diferenciando-se apenas do M4, com 52,7% de inibição do crescimento micelial de FOC (Gráfico 2, Fig4). Se comparados os combinados bacterianos com as bactérias utilizadas separadamente, a maior inibição foi alcançada pelo tratamento com o isolado APC51, com 66,8% de PICM, porém não diferiu estatisticamente dos combinados bacterianos com as maiores medias (Gráfico 2).

Também pode-se observar outros isolados bacterianos que se diferenciaram estatisticamente, além do APC51 (66,8%), os tratamentos com as cepas 399 (62,3%), BAC2 (61,4%), BAC4 (61,2%), 01C (60,1%) E APC07 (59,1%), podem ser comparados ao uso dos tratamentos M1, M2, M5 e M3. Já os isolados BAC5 (57,2%), BAC6 (56,5%), PA05 (54,3%) foram agrupados com as menores médias juntamente com o tratamento M4, que apresentou 52,7% de inibição do crescimento micelial de FOC (Gráfico 2).

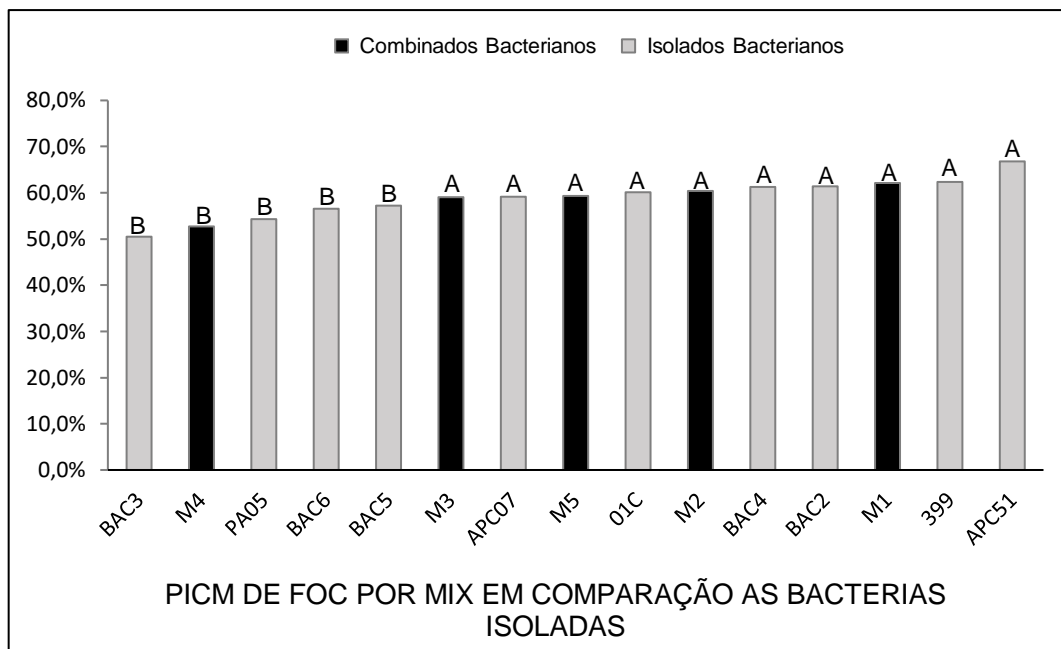


Gráfico 2. Percentual de Inibição do Crescimento Micelial de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* por Combinados bacterianos em comparação com as bactérias utilizadas separadamente, pelo teste de pareamento direto. As letras A e B indicam a diferenças estatísticas entre os tratamentos impostos no controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. Os tratamentos aplicados estão descritos no eixo X e o percentual de inibição micelial respectivos estão indicados no eixo Y do gráfico. As barras pretas representam os combinados bacterianos e as barras em cinza representam as cepas bacterianas.

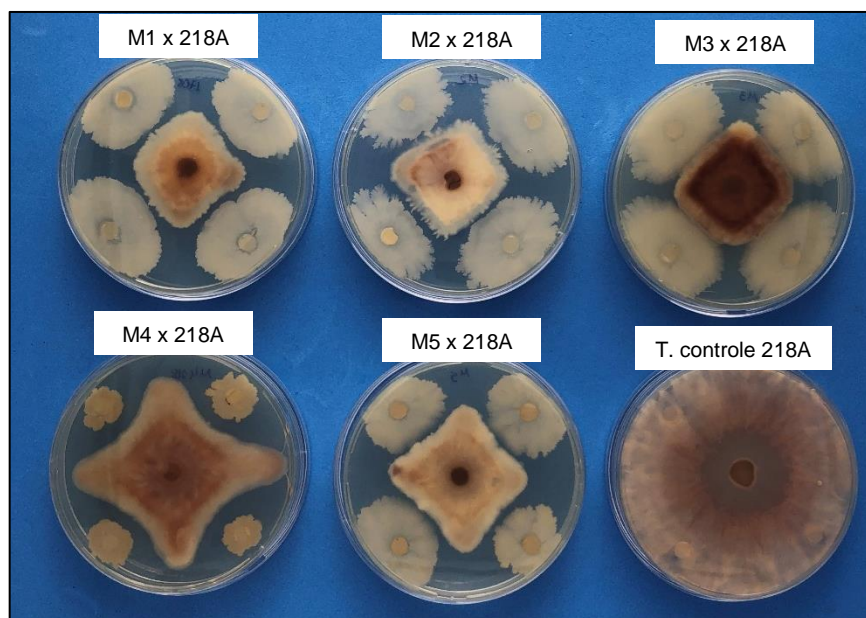


Fig. 3 Resultado do Teste de pareamento direto, onde pode-se observar a influência dos Combinados bacterianos no crescimento micelial do isolado 218A de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*.

DISCUSSÃO

A partir dos testes *in vitro* realizados neste trabalho, foi possível verificar a sensibilidade dos fitopatógenos de *M. fijiensis* e *M. musicola* aos mecanismos de ação dos agentes de biocontrole, isolados do gênero *Bacillus* e o isolado CMF1017 de *Trichoderma asperellum*.

Todas as bactérias do gênero *Bacillus* testadas, foram capazes reduzir o crescimento micelial dos patógenos em diferentes proporções nos diferentes testes realizados (Fig. 1 e Fig2).

No teste de pareamento entre as culturas, pode-se observar que o halo de inibição ultrapassou o local de crescimento bacteriano, podemos correlacionar este resultado ao fato de que diferentes espécies do gênero podem atuar no biocontrole pela liberação de substâncias tóxicas com propriedades antifúngicas. Esta redução do crescimento do fungo pode ser principalmente por meio da liberação de lipopeptídeos das famílias Iturina e Fengicina, e também das surfactinas quando associadas e enzimas que degradam polissacarídeos como quitinases, glucanases, proteases e celulases, atuando no rompimento da parede celular (O'BRIEN, 2017; Melo et al., 2021). Das bactérias testadas, o isolado 399 foi descrito por Moreira (2020) como produtor das enzimas celulase e amilase, e apresentou atividade antifúngica a isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (FOC) e *T. asperellum*, agregando aos dados obtidos neste trabalho, reforçando que seu uso pode ser efetivo no controle das doenças fúngicas Sigatoka Negra e Amarela.

Bactérias do gênero *Bacillus* apresentam uma versatilidade nos mecanismos de ação, podendo também modular o crescimento fúngico a partir da liberação de metabolitos lipofílicos de baixo peso molecular, os compostos voláteis, dentro deste grupo algumas substâncias podem ser listadas como eficientes na atividade antifúngica contra FOC, como o Benzaldeído; Benzisotiazolinona; 1,3-Butadieno; Benzotiazol fenol; 2,3,6-Trimetil fenol, apresentando vantagem em poder alcançar estruturas do patógeno a longas distâncias. Neste trabalho pode-se observar que substâncias que provavelmente são associadas a este mecanismo de ação são secretadas pelos agentes de biocontrole testados, pesquisas mais aprofundadas sobre os isolados bacterianos são necessárias para identificar quais substâncias

fazem parte desta interação. Além de atuarem na modulação do crescimento do fitopatógeno, algumas destas substâncias ainda podem atuar na indução de resistência sistêmica e também promoção do crescimento vegetal (Yuan et al., 2012; Tahir et al, 2017; Saxena et al., 2019). Martín (2020) observou em trabalhos *in vitro* que metabolitos obtidos de filtrados da estirpe CCIBP-M27 de *Bacillus subtilis* apresentou efeito antimicrobiano contra *P. fijiensis*, estes metabolitos com atividade antimicrobiana agiram diretamente sobre o patógeno causando deformidade em hifas e conídios acarretando na diminuição da germinação, conseqüentemente reduzindo a carga do patógeno, e assim como no trabalho de Martin, neste trabalho o teste utilizando filtrados bacterianos apresentou uma redução no crescimento micelial, desta maneira, estas bactérias se apresentam como prováveis candidatas ao uso na proteção vegetal, agindo no patógeno antes do processo de infecção, pois os esporos que venham a ser disseminados ao repousarem em plantas protegidas haverá uma redução da incidência da doença, pois os metabólitos bacterianos provavelmente tem a capacidade de tornar os esporos inviáveis.

O isolado CMF1007 de *Trichoderma asperellum* apresentou uma grande efetividade nos testes de biocontrole, em todos os testes realizados houve o controle total do crescimento micelial dos fitopatógenos, apesar de não ter isto bem claro, devido a necessidade de testes bioquímicos para identificar quais são as substâncias envolvidas nas interações, pode se os resultados do biocontrole de *M. fijiensis* e *M. musicola* apresentado nos testes pode estar relacionado a liberação de substâncias de baixo peso molecular com potencial fungitóxico. Isto unido a sua capacidade em formar estruturas de resistência, os escleródios, provavelmente implica na eficácia do isolado em atuar como agente de biocontrole (Isaias et al, 2014; Kottb et al., 2015; Salwan et al., 2019).

Pode-se associar os resultados obtidos no teste de placas sobrepostas a provável capacidade de produção dos compostos voláteis por isolados da espécie *Trichoderma asperellum*, mostrando-se como um potencial candidato para aplicação biotecnológica no controle de *M. fijiensis* e *M. musicola*. Os compostos voláteis secretados por *Trichoderma* spp. pertence a diferentes classes de hidrocarbonetos, como aldeídos, ésteres, cetonas, aromáticos, aminas, tióis e terpenos (Salwan et al., 2019). Um dos metabólitos voláteis secretado por *Trichoderma asperellum* é o 6-pentil-alfa-pirona, apontado como eficiente na

indução de resistência em *Arabidopsis*, ativando defesas que atuam na redução de sintomas de doenças fúngicas em causadas por *Botrytis cinerea* e *Alternaria brassicicola* (Kottb et al., 2015).

Espécies de *Trichoderma*, são comumente conhecidas por apresentarem como principal mecanismo de ação o micoparasitismo, durante este processo o agente parasita a hifa hospedeira e libera substâncias que o auxiliam na penetração por meio da quebra dos polissacarídeos, fazendo-se essencial a produção de enzimas como quitinases e glucanases, a fim de garantir o sucesso do parasitismo, por meio da lise e dissolução celular acarretando a morte do hospedeiro. Também a produção de antibióticos e a competição por nutrientes são mecanismos que podem atuar no biocontrole (Howell, 2003). Ainda, Moreira (2020) relata o potencial do isolado CMF1007 como biocontrolador de FOC e a secreção de substâncias que podem auxiliar na promoção de crescimento de *Musa* sp., o que atua como um reforço ao bom desenvolvimento da planta permitindo que esta venha a superar infecções e perdas causadas pelo patógeno.

O teste envolvendo o biocontrole de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, apresentou um resultado satisfatório de redução do crescimento do fitopatógeno, tanto pelo uso das bactérias de forma isolada, quanto ao seu uso de forma combinada, todos os tratamentos apresentando mais de 50% de inibição do crescimento micelial do fitopatógeno. Esperava-se que os efeitos dos combinados bacterianos sobre a colônia do fitopatógeno sobressaísse os efeitos da inibição pelas bactérias em seu uso individual devido a possível soma de mecanismos de ação dos combinados bacterianos.

No uso das bactérias de forma isolada em pareamento com FOC, pode-se observar resultados distintos os obtidos por Lima Jr. (2017) quando testados em confronto direto, o isolado APC51 não apresentou destaque em relação aos outros, diferentemente do que foi observado neste trabalho, que a cepa APC51 obteve o maior valor de média, já a cepa APC07 apresentada por Lima Jr. (2017) como uma das melhores inibidoras, neste trabalho foi observado um resultado contrário, apresentando a média mais baixa, provavelmente pela metodologia empregada apresentar diferenças ou pelo melhor desenvolvimento de algumas cepas com relação a outras nos dados momentos. Mesmo apresentando resultados estatísticos distintos, até os isolados com as menores medias deste trabalho

apresentaram medias de PICM superiores que as encontradas nos testes realizados por Lima Jr. (2017).

Devido a observação de formação de halo de inibição de crescimento fúngico ao redor da cepa bacteriana e a redução no crescimento do patógeno que provavelmente foi promovido por compostos secretados pelos agentes de biocontrole, nos leva a acreditar que a atividade antifúngica observada nos testes *in vitro* podem estar relacionadas a produção de antibióticos, metabolitos voláteis, micoparasitismo, competição por nutrientes.

Os testes realizados, embora tenham apresentado bons resultados, servem como seleção preliminar, fazendo-se necessários tentes *in vivo* para que os efeitos durante as interações entre antagonista, patógeno, planta e ambiente sejam evidenciados e os resultados obtidos neste trabalho sejam mais bem elucidados. Também deve-se diagnosticar as possibilidades de indução de resistência sistêmica no hospedeiro por meio destes microrganismos (Howell, 2003; Lima Jr., 2017; O'Brien, 2017; Kamle et. al, 2020).

CONCLUSÕES

- Os isolados bacterianos 399 e APC51 do gênero *Bacillus* e o isolado fúngico CMF1007 (*Trichoderma asperellum*) possuem potencial como agentes de biocontrole em comum das Sigatoka Amarela e Sigatoka Negra, por apresentarem maiores percentuais de inibição do crescimento micelial de seus agentes causais pelo método *in vitro*.
- Os compostos voláteis dos agentes de biocontrole devem ser estudados para melhor entendimento da influência na redução do crescimento micelial dos isolados fitopatogênicos, CMF1708 (*M. musicola*) e MF-CRUZ (*M. fijiensis*).
- Não foi observado efeito aditivo na inibição do crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* promovido pelos combinados bacterianos testados *in vitro*.
- Testes em plantas devem ser realizados a fim de verificar a eficácia dos agentes de biocontrole na supressão das doenças fúngicas, Sigatoka Amarela, Sigatoka Negra e a Fusariose.

REFERÊNCIAS

Arzanlou, M, Abeln, ECA, Kema GHJ, Waalwijk, C, Carlier, J, De Vries, I, Guzmán, M e Crous, PW (2007). Molecular diagnostics for the Sigatoka disease complex of banana. *Phytopathology*. 97:9, 1112-1118.

Brent, KJ (1995) Resistencia a fungicidas em patógenos de plantas cultivadas: como maneja-la? In: FRAC.

Cavero, PAS, Hanada RE, Gasparotto, L, Coelho RA e Souza JT (2015). Biological control of banana black Sigatoka disease with *Trichoderma*. *Ciência Rural*. 45:6, 951-957.

Cordeiro, ZJM, Matos, AP e Meissner Filho, PE (2004). Doenças e métodos de controle. In: O cultivo da bananeira. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical (BORGES, AL e Souza, LS).

Cook, RJ e Baker, KF (1983). The nature and practice of biological control of plant pathogens. 539.

Cruz-Martín, M, Acosta-Suárez, M, Roque, B, Pichardo, T, Castro, R, Alvarado-Capó, Y. (2016). Diversidad de cepas bacterianas de la filosfera de *Musa* spp. con actividad antifúngica frente a *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. *Biología Vegetal*, 16.

Cuellar-Gaviria TZ, González-Jaramillo LM, Villegas-Escobar, V (2021). Role of *Bacillus tequilensis* EA-CB0015 cells and lipopeptides in the biological control of black Sigatoka disease. *Biological Control*, 155, 104523.

De Bellaire, LDL, Fouré, E, Abadie, C e Carlier, J (2010). Black Leaf Streak Disease Is Challenging the Banana Industry. *Frutas*, 65, 327–42.

Dita, M, Barquero, M, Heck, D, Mizubuti, ES e Staver, CP (2018). *Fusarium* wilt of banana: current knowledge on epidemiology and research needs toward sustainable disease management. *Frontiers in Plant Science*, Lausanne, 9, 1468.

FAO Food and Agriculture Organization of the United Nations (2021). Agricultural Database

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia (UFLA)*, v. 35, n.6, 1039-1042, 2011.

FRAC- COMITÊ BRASILEIRO DE AÇÃO À RESISTENCIA A FUNGICIDAS. Modo de ação de fungicidas. **Brasil**- 2021. Disponível em: < <https://www.frac-br.org/modo-de-acao>>. Acesso em: 13 mar. 2021.

Gonzalez, CR, Salinas, DGC e Castillo, JJM (2012). Effect of number of functional leaves at flowering on yield of banana Grand Naine (*Musa* AAA Simmonds). *Rev. Fac. Nac. Agron. Medellín*, Medellín, 65:2, 6585-6591.

Howell, CR (2003). Mechanisms Employed by *Trichoderma* Species in the Biological Control of Plant Diseases: The History and Evolution of Current Concepts. *Plant Disease*, 87, 4-10.

IBAMA- INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. Relatórios de comercialização de agrotóxicos. **Brasil**. Out. de 2020. Disponível em: < <https://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#boletinsanuais>>. Acesso em: 18 de mar de 2021.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Indicadores. Produção Agrícola Municipal, **Rio de Janeiro**, v. 46, p.1-8, 2019. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/66/pam_2019_v46_br_informativo.pdf>. Acesso em: 12 mar. 2021.

Isaias, CO, Martins, I, Silva, JBT, Silva, JP e Mello, SCM (2014). Ação antagônica e de metabólitos bioativos de *Trichoderma* spp. contra os patógenos *Sclerotium rolfii* e *Verticillium dahliae*. *Summa Phytopathologica*, 40:1, 34-41.

Kamle M., Borah R., Bora H., Jaiswal AK, Singh RK, Kumar P. (2020) Systemic Acquired Resistance (SAR) e Induced Systemic Resistance (ISR): Role and Mechanism of Action Against Phytopathogens. Em: Hesham AL., Upadhyay R., Sharma G., Manoharachary C., Gupta V. (eds) *Fungal Biotechnology and Bioengineering*. *Biologia Fúngica*. Springer, Cham., 468–473.

Khan, N, Martínez-Hidalgo, P, Ice, TA et al. (2018). Antifungal Activity of *Bacillus* Species Against *Fusarium* and Analysis of the Potential Mechanisms Used in Biocontrol. *Front Microbiol*, 9, 2363.

Kottb, M, Gigolashvili, T, Grosskinsky, DK e Piechulla, B (2015). *Trichoderma* volatiles effecting Arabidopsis: from inhibition to protection against phytopathogenic fungi. *Front Microbiol*, 6, 995.

Lima Júnior, JA de. (2017) Eficiência de *Bacillus* spp. e *Trichoderma harzianum* no controle de *Fusarium* spp. [Dissertação de mestrado]. [Cruz das Almas, BA] Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

Martín, CM, Mena, E, Suárez, MA, Pichardo, T, Rodriguez, E e Capó, YA (2020). Protein compounds of *Bacillus subtilis* with in vitro antifungal activity against *Pseudocercospora fijiensis* (Morelete). *Brazilian Journal of Microbiology*.

Moreira, FM, Cairo, PAR, Borges, AL, Silva, LD, Haddad, F (2021). Investigating the ideal mixture of soil and organic compound with *Bacillus* sp. and *Trichoderma asperellum* inoculations for optimal growth and nutrient content of banana seedlings. *South African Journal Of Botany*, 137, 249-256.

Melo, TA, Nascimento, ITVS e Serra, IMRS (2021). The *Bacillus* genus applied to the biological control of plant diseases. *Research, Society and Development*, 10:9, 18110917817.

Nogueira, EMC, Ferrari JT e Santos, AJT (2009). Sigatoka-Negra - Métodos De Controle Com Fungicidas Aplicados Em Pulverização E Na Axila Da Folha. *Biológico*, São Paulo, 71:1, 53-57.

Orozco, MS, Orozco, JR, Pérez, OZ, Manzo, GS, Farías JL e Moraes, WS (2008). Prácticas culturales para el manejo de la Sigatoka negra en bananos y plátanos. *Tropical Plant Pathology*, 33:3, 189-196.

O'Brien, PA (2017). Biological control of plant diseases. *Australasian Plant Pathol*, 46, 293–304.

Pal, KK e Gardener, BM (2006). Biological control of plant pathogens. *Plant Health Instruct.* 2, 1117–1142.

Pimentel, MF, Arnao, E, Warner, AJ, Subedi, A, Rocha, LF, Srour, AY e Fakhoury, A (2020). *Trichoderma* isolates inhibit *Fusarium virguliforme* growth, reduce root rot, and induce defense-related genes on soybean seedlings. *Plant Disease*, 1-48.

Romeiro, R.S (2001). Métodos em Bacteriologia de Plantas Viçosa: UFV, 279.

Saxena, AK, Kumar, M, Chakdar, H, Anuroopa, N e Bagyaraj, DJ (2019). *Bacillus* species in soil as a natural resource for plant health and nutrition. *Journal of Applied Microbiology*, p. 1–12.

Salwan, R, Rialch N e Sharma V (2019). Bioactive Volatile Metabolites of *Trichoderma*: An overview. In: Singh H., Keswani C., Reddy M., Sansinenea E., García-Estrada C. (eds) *Secondary Metabolites of Plant Growth Promoting Rhizomicroorganisms*. Springer, Singapore.

Tahir, HAS, Gu, Q, Wu, H, Raza, W, Hanif, A, Wu, L e COLMAN, MV e GAO, X (2017). Plant growth promotion by volatile organic compounds produced by *Bacillus subtilis* SYST2. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1–11.

Thangavelu, R, Palaniswami, A e Velazhahan, R (2004). Mass production of *Trichoderma harzianum* for managing *Fusarium* wilt of banana. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 103:1, 259-263.

Yuan, J, Raza, W, Shen, Q e Huang, Q (2012). Antifungal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 volatile compounds against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Applied and Environmental Microbiology*, 78:16, 5942–5944.