

**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**

**POTENCIAL DE BACTÉRIAS EDÁFICAS ORIUNDAS DO
SEMIÁRIDO PARA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO,
TOLERÂNCIA À SECA E CONTROLE BIOLÓGICO EM
BANANEIRA**

DANILO ALMEIDA BRITO

CRUZ DAS ALMAS - BAHIA

JULHO DE 2021

**POTENCIAL DE BACTÉRIAS EDÁFICAS ORIUNDAS DO
SEMIÁRIDO PARA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO,
TOLERÂNCIA À SECA E CONTROLE BIOLÓGICO EM
BANANEIRA**

DANILO ALMEIDA BRITO

Biólogo

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2018

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 - BAHIA

JULHO DE 2021

FICHA CATALOGRAFICA

B862p	<p>Brito, Danilo Almeida. Potencial de bactérias edáficas oriundas do Semiárido para promoção de crescimento, tolerância à seca e controle biológico em bananeira / Danilo Almeida Brito. — Cruz das Almas, Bahia, 2021. 51f.; il.</p> <p>Orientador: Fernando Haddad. Coorientador: Harllen Sandro Alves Silva.</p> <p>Dissertação (Mestrado) — Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Mestrado em Microbiologia Agrícola.</p> <p>1. Banana — Murcha do fuséio — Controle biológico. 2. Banana — Estresse hídrico. 3. Semigrado — Análise. I. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II. Título.</p>
-------	---

ADD: 634.772

Ficha elaborada pela Biblioteca Central de Cruz das Almas - UFRB.
Responsável pela Elaboração - Antonio Marcos Sarmiento das Chagas (Biblioteckrio - CRB5 / 1615).
(os dados para catalogação foram enviados pelo usuário via formulário eletrônico).

Dedico a este trabalho a meu avô, Geremias Almeida Leal (*in memoriam*), que fez da agricultura seu meio de sobrevivência no campo e hoje estaria orgulhoso de ver o neto atuando na agricultura produzindo conhecimento científico.

AGRADECIMENTOS

À Embrapa Mandioca e Fruticultura, pelo fornecimento da estrutura necessária para realização dos experimentos.

À Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e a equipe da Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola (corpo docente, administrativo e coordenação), pelo apoio durante a trajetória do mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB), pela concessão da bolsa.

Ao meu orientador Dr. Fernando Haddad e meu coorientador Dr. Harllen Sandro Alves Silva, pelas orientações e confiança depositada.

Ao analista do Laboratório de Fitopatologia Dr. Leandro Rocha pela disponibilidade e paciência ao colaborar durante a execução dos trabalhos.

À minha família por representar meu porto seguro, sobretudo nas condições incertas com a Pandemia que estamos passando.

Aos meus amigos Rogério Lima e Élzio Júnior pelo apoio em todas as situações de estresse e preocupação,

Por fim, aos meus colegas do laboratório de Fitopatologia da Embrapa e da Pós-graduação, em especial Mariana, Marília e Flávia por tantos momentos de apoio, amizade e descontração.

A TODOS OS MEUS SINCEROS AGRADECIMENTOS!

ÍNDICE

RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	9
INTRODUÇÃO GERAL.....	10
CAPÍTULO I	
Revisão de Literatura.....	12
1. Região do semiárido brasileiro	13
2. Efeito de microrganismos do semiárido na tolerância à seca	14
3. Aspectos gerais da bananeira	16
4. Bananeira e estresse hídrico	17
5. Murcha de <i>Fusarium</i>	19
6. Controle biológico de doenças de planta.....	21
Referências.....	24
CAPÍTULO II	
Resumo	34
1. Introdução	35
2. Material e Métodos.....	36
2.1 Coleta de amostras de solo.....	36
2.2 Isolamento de microrganismos	36
2.3 Seleção de microrganismos fixadores de nitrogênio e produtores de sideróforos	37
2.4 Seleção de microrganismos tolerante ao estresse térmico e hídrico	37
2.5 Seleção de microrganismos produtores de exopolissacarídeos (EPS) ...	38
2.6 Seleção de isolados solubilizadores de potássio e fosfato.....	38
2.7 Teste de produção de ácido idol-acético (AIA).....	39
2.8 Avaliação do potencial de controle biológico dos isolados em teste de compostos voláteis, de não-voláteis e pareamento direto com <i>Foc</i> e <i>T. asperillum</i>	39
2.9 Teste de antibiose recíproca	40
3. Resultados	41
4. Discussão.....	44
5. Conclusões	47
6. Referências	48

RESUMO

BRITO, D. B. Potencial de bactérias edáficas oriundas do semiárido para promoção de crescimento, tolerância à seca e controle biológico em bananeira

A banana (*Musa* spp.) é uma das frutas mais consumidas e cultivadas nas regiões tropicais e subtropicais, porém sua produção pode ser comprometida pela suscetibilidade da cultura ao estresse hídrico e incidência de fitopatógenos como *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc), fungo causador da doença da murcha de *Fusarium*. O presente trabalho selecionou bactérias edáficas do semiárido e verificou o potencial de antagonismo ao Foc, promoção de crescimento e de tolerância a seca. Para tanto foram realizados isolamentos à partir do solo do semiárido, coletado em rizosfera de plantas nativas e de cactáceas. Posteriormente foram realizados testes de produção de sideróforos, fixação de nitrogênio, tolerância ao estresse hídrico e térmico, solubilização de potássio e fosfato, produção de exopolissacarídeos (EPS), antagonismo com pareamento direto com isolado de Foc (raça 1) e *Trichoderma asperellum* (T-81). Foram selecionados 15 isolados bacterianos produtores de EPS, que cresceram em meio com atividade de água reduzida e sob temperaturas de até 55°C, cinco testaram positivo para fixação de N, dois apresentaram solubilização de potássio e seis com capacidade de produzir sideróforos. Todos os isolados apresentaram índice de baixa solubilização de fosfato e antagonismo ao Foc e três isolados não inibiram crescimento do *T. asperellum*. Portanto, os resultados deste trabalho indicam potencial dos isolados selecionados para promoção de crescimento vegetal, tolerância a seca e manejo de murcha de *Fusarium*.

Palavras-chave: Estresse hídrico, Biocontrole, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*.

ABSTRACT

BRITO, D. B. Potential of edaphic bacteria from the semi-arid region for growth promotion, drought tolerance and biological control in banana

The banana (*Musa* spp.) is one of the most consumed and cultivated fruits in tropical and subtropical regions, but its production could be compromised by the susceptibility of the crop to water stress and the incidence of phytopathogens such as *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (*Foc*), the fungus that causes Fusarium wilt disease. The present work selected edaphic bacteria from the semiarid region and verified their potential for antagonism to *Foc*, growth promotion and drought tolerance. Isolations were realized from semi-arid soil collected from the rhizosphere of native and cactaceous plants. Subsequently, tests of siderophore production, nitrogen fixation, tolerance to hydric and thermal stress, potassium and phosphate solubilization, production of exopolysaccharides (EPS), antagonism with direct pairing with isolates of *Foc* (race 1) and *Trichoderma asperellum* (T-81) were performed. Fifteen EPS-producing bacterial isolates were selected, which grew on medium with reduced water activity and under temperatures up to 55°C, five tested positive for N fixation, two showed potassium solubilization, and six with ability to produce siderophores. All isolates showed low phosphate solubilization index and antagonism to *Foc* and three isolates did not inhibit growth of *T. asperellum*. Therefore, the results of this work indicate potential of the selected isolates for plant growth promotion, drought tolerance and management of *Fusarium* wilt.

Keywords: Water stress, Biocontrol, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*.

INTRODUÇÃO GERAL

A banana é um alimento importante na dieta básica de 400 milhões de pessoas, representa uma importante fonte de renda para países em desenvolvimento na África, Ásia, América Latina e Caribe. A produção global corresponde a 114 milhões de toneladas, em uma área plantada de 5,4 milhões de hectares. Da produção Mundial, a Ásia contribui com 55,8%, seguido pelas Américas 24,7% e a África, com 17,9% (FAO, 2018). O Brasil destaca-se como o quarto maior produtor mundial, com produção de 6,7 milhões de toneladas, representando 6% de toda produção mundial (LSPA, 2018).

As regiões produtoras localizam-se nas zonas tropicais e subtropicais, caracterizadas por apresentarem altas temperaturas e constância em precipitação. Essas condições ambientais que beneficiam a bananicultura, também favorecem a incidência de doenças, como a murcha do *Fusarium*, causado pelo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (*Foc*) (PLOETZ, 2015). O agente causal é habitante do solo e sua ação interfere em processos metabólicos importantes da planta e resulta em perdas expressivas na produção.

A Bahia é o principal produtor de banana da região nordeste, pertence ao semiárido com um total de 226 municípios e o estado sofre com impactos na produção devido as condições ambientais que são definidas por períodos com baixa precipitação e altas temperaturas (BAHIA, 2014; IBGE, 2019). Essas características climáticas propiciam às culturas uma maior possibilidade de estresse hídrico, desencadeiam problemas nos processos bioquímicos, fisiológicos e morfológicos da planta (VAN ASTEN et al., 2012). Diante disso, a região possui grandes desafios para manutenção da sanidade da produção de bananeira, que consistem em desenvolver estratégias para promover tolerância a seca e o controle de doenças.

A condição de estresse hídrico impacta na produção da bananeira por comprometer a absorção de água e nutrientes, conseqüentemente, ocorre redução da abertura estomática, da atividade fotossintética, da transpiração, da atividade enzimática, e vários outros processos fisiológicos e metabólicos (LISAR et al., 2012). Segundo Santos et al. (2014), o uso de microrganismos com atividades benéficas a agricultura podem melhorar o desempenho de

plantas sob condições de estresse. Dentre as principais atividades benéficas à bananicultura são destacadas a ação de promoção de crescimento vegetal direto e indireto, dentre os diretos: a síntese de hormônios (GLICK, 2014), a solubilização de nutrientes (SANTOYO et al., 2016) e a fixação de nitrogênio (HUNGRIA et al., 2010). Entre os mecanismo indiretos: as interações entre biocontroladores-fitopatógenos, como competição por nutrientes, predação, antibiose; e na interação microrganismo-planta, como a indução de resistência sistêmica (KIMATI et al., 1995; COMPANT et al., 2005).

Além disso, alguns microrganismos dispõem de mecanismos eficazes na mitigação dos efeitos do estresse hídrico, como por exemplo, a produção de exopolissacarídeos (EPS). A interação entre bactérias produtoras de EPS e as raízes, podem constituir um biofilme térmico, propiciando ambiente favorável à colonização de outros microrganismos benéficos. Dentre as atividades que podem beneficiar a planta destacam-se a promoção crescimento e/ou na indução de resposta de forma conjunta com a planta à condição de estresse, resultando assim na sobrevivência do vegetal diante da escassez hídrica.(ARAÚJO et al., 2012; CASÁN et al., 2013; COHEN et al., 2009; DANHORN; FUQUA, 2007)

O presente trabalho avaliou o efeito de microrganismos oriundos do solo do semiárido, coletados a partir de rizosfera de plantas nativas da região, principalmente de cactáceas, quanto ao potencial de promoção de crescimento, à tolerância ao estresse hídrico e na ação antagonista ao *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. Esta pesquisa está organizada em dois capítulos, no primeiro consta uma revisão de literatura com os principais tópicos relevantes sobre o foco do estudo e o segundo capítulo traz o artigo que será submetido a Revista Brasileira de Ciência do Solo.

CAPÍTULO I

Revisão de Literatura

dos estudos desenvolvidos utilizam técnicas moleculares com foco na avaliação da diversidade microbiana de regiões áridas e semiáridas (BACHAR et al, 2010). Porém, ainda há poucos relatos em relação aos mecanismos de sobrevivência, a capacidade de interação com culturas agrícolas e a possibilidade de aplicar as vantagens adaptativas desses microrganismos na agricultura.

A atividade agrícola no semiárido possui como fator limitante a escassez hídrica, sobretudo para algumas culturas que são suscetíveis à seca, como é o caso da bananeira. A exemplo da produção de banana na região do norte de Minas Gerais e Sudoeste baiano é desenvolvida com estratégias de irrigação compensar os baixos índices de precipitação. Entretanto, a ocorrência de temperaturas superiores a 34 °C, entre os meses de setembro e fevereiro, representa um impacto direto na produtividade (MARQUES et al, 2011).

2. Efeito de microrganismos do semiárido na tolerância à seca

O Semiárido brasileiro inclui os Estados do Ceará, Rio Grande do Norte, a maior parte da Paraíba, Pernambuco, Sudeste do Piauí, Oeste de Alagoas, Sergipe, região central da Bahia e uma faixa que se estende em Minas Gerais, seguindo o Rio São Francisco (BRASIL, 2005). Essa região é um dos polos de grande produção de banana e apresentam precipitação média anual de até 800 mm e índice de aridez entre 0,2 e 0,5 calculado pelo balanço hídrico (DONATO et al., 2015).

A cultura da bananeira no semiárido está exposta a condições climáticas favorecem a ocorrência de estresse hídrico. No entanto, novas estratégias biotecnológicas surgem como alternativa para mitigar os danos causados pela seca. A interação entre planta e microrganismos apresentam diferentes estratégias que tem potencial de promover a tolerância à escassez hídrica (FERREIRA et al., 2014). Dentre as principais atividades microbianas que tem potencial de promoção de tolerância à seca estão: a produção de exopolissacarídeos (EPS) (NOCKER et al., 2012); a formação de biofilme (CHANG et al., 2007); a liberação de osmólitos (MCNEIL et al., 1999); e a produção de substâncias que atuam na promoção de crescimento direto e indireto de plantas (SARAF et al., 2011).

Os exopolissacarídeos (EPS) são produzidos por uma grande variedade de microrganismos (SOUZA; GARCIA-CRUZ, 2004). Esses biopolímeros são associados a hidratação radicular diante de uma grande variedade de condições estressantes ambientais como solos salinos, variações de temperatura e estresse hídrico. Além disso, participam da sinalização molecular no processo de simbiose com plantas e na formação do biofilme (RINAUDI; GIORDANO, 2010).

Os EPS bacterianos também desempenham um importante papel na ecologia rizosférica, por fornecer condições de temperatura e umidade favoráveis aos demais microrganismos termossensíveis, como ocorre com o *Trichoderma* spp., que em condições extremas têm a sua eficiência reduzida ou até mesmo anulada (HALFELD-VIEIRA et al., 2006). Alguns microrganismos são capazes de desenvolver outra estratégia que consiste no acúmulo de pequenas moléculas orgânicas que são denominadas de osmólitos ou extremólitos, no caso de organismos extremófilos que balanceiam a concentração salina do ambiente (LENTZEN; SCHWARZ, 2006).

Os mecanismos microbianos de promoção de crescimento podem ser classificados como direto e indireto, os diretos são os que afetam diretamente o metabolismo da planta, dentre eles pode-se citar: produção de hormônios como ácido indol-acético (AIA), giberelina, citocinina e etileno; promovem solubilização de fosfatos; fixação de nitrogênio atmosférico; produção de sideróforos. À medida que os mecanismos indiretos são dependentes da participação de processos metabólicos de defesa vegetal. Podemos citar a antibiose pela produção de cianeto de hidrogênio (HCN), amônia (NH₃) e outros voláteis, o processo de competição, parasitismo com a produção de enzimas quitinases, glucanases e celulasas; e indução de resistência (PODILE; KISHORE, 2007; CASÁN et al., 2013).

A região rizosférica de plantas nativas e cultivadas no semiárido possuem diversidade microbiana adaptada às condições de salinidade, temperatura e disponibilidade de recursos hídricos (KAVAMURA et al., 2013). Logo, a obtenção de isolados do semiárido para testes de promoção a tolerância a seca em bananeira, amplia o campo de pesquisa em ferramentas biotecnológicas para aplicação na bananicultura, visando o aumento da produção, da ampliação de áreas de cultivo e redução dos custos com irrigação.

3. Aspectos gerais da bananeira

A bananeira (*Musa* sp.) é uma das fruteiras mais cultivadas e consumidas no mundo. A banana é rica em vitaminas, fibras, potássio, carboidratos, o que a classifica como fonte alimentar importante na dieta humana. O gênero pertence à Ordem *Zingiberales* e Família *Musaceae*. Apesar da origem asiática, a cultura foi disseminada e é cultivada praticamente em todas as regiões tropicais do planeta (COSTA; REGO, 2015). É uma planta monocotiledônea, herbácea e perene. Apresenta o tronco curto e subterrâneo, denominado rizoma, de onde surgem as raízes adventícias e fibrosas. Logo em seguida, surge o pseudocaulé, que é formado por várias bainhas foliares unidas, culminando na copa com folhas longas e largas. A inflorescência da bananeira é de cor roxo-avermelhada e surge do centro da copa. Das flores formam uma penca, surgem determinado número de frutos, que varia a depender da cultivar (DANTAS et al., 2000).

As variedades de bananeiras existentes são derivadas de uma ou duas espécies diploides *Musa acuminata* (grupo A) e *Musa balbisiana* (grupo B). As principais cultivadas no Brasil pertencem aos grupos genômico AA (Ouro, Malbut, NBA), AAA (Nanica, Nanicão, Grande Naine, Gros Michel, Caipira), AAB (Prata, Pacovan, Prata Anã, Mysore, Maçã, Terra, D'Angola, Thap Maeo), ABB (Figo) e AAAB (Fhia 18, Pacovan Ken, Prata Graúda, Tropical, Preciosa, Maravilha) (LIMA et. al., 2013; AQUINO et al., 2014).

A bananeira possui seu ciclo de vida dividido basicamente em três fases de desenvolvimento a infantil, a juvenil e a reprodutiva. A fase infantil caracteriza-se pela intensa atividade de crescimento meristemáticos da gema para formação da estrutura vegetal, neste estágio denominamos de filho, a fase juvenil inicia com a emissão da primeira folha com 10 cm de largura e a fase reprodutiva com a primeira folha adulta característica da cultivar, emissão de inflorescência e emissão de cachos (BALLESTERO, 2008). No entanto, o tempo de cada fase varia de acordo com a interferência de condicionantes bióticos e abióticos, que pode ocasionar tanto o avanço, como o atraso nas etapas do ciclo fenológico.

Os fatores que influenciam o crescimento e a produção das bananeiras classificam-se em fatores internos e externos. Os fatores internos estão relacionados com as características genéticas da variedade utilizada, já os fatores externos referem-se às condições do solo, do clima, da ação de pragas

e doenças e a ação antrópica que interfere nos fatores edáficos, climáticos e bióticos. Sendo assim, para obtenção de resultados de produção satisfatórios na produção de banana são necessárias condições de temperatura em torno dos 28°C, oferta de irrigação aplicação de lâminas entre 100 e 180 mm/mês, além de oferta nutricional de macro e micronutrientes e etc (BORGES et al., 2004).

De modo geral, todas as variedades de bananeira são exigentes a oferta hídrica e sua produtividade tende a aumentar com a atividade transpiratória, que está diretamente ligada a oferta de água no solo (RUKUNDO et al., 2012). Quando a bananeira é submetida a fatores que favorecem a ocorrência de transpiração em atividade intensa, típica dos meses mais quentes no semiárido, a taxa evapotranspiratória excede a capacidade de absorção de água pelas raízes e a planta murcha temporariamente, mesmo com solo úmido (DONATO et al., 2015).

Portanto, o cultivo da banana na região do semiárido possui grandes desafios, devido aos períodos que as temperaturas ultrapassam os 35°C, considerado como limite térmico para esta cultura, além das estações secas apresentarem altas taxas de radiação e redução da umidade relativa, que afetam a estrutura do limbo foliar, as taxas de evapotranspiração, conseqüentemente, os ciclos de floração (PIRKNERET et al., 2014; ROBINSON; GALÁN SAÚCO, 2010).

4. Bananeira e estresse hídrico

A bananeira é extremamente exigente de água devido consumo elevado e contínuo, em virtude da alta demanda hídrica dos tecidos (SILVA et al., 2012). A fase de diferenciação floral (período floral) e o início da frutificação corresponde ao período de maior exigência quantitativa de água. Deste modo, estresses hídricos nesse estágios são mais graves à cultura, pois mediante a condição de escassez severa, acarretará significativa redução na produção (DONATO, 2015).

Dentre as cultivares de banana mais importantes do Brasil, as que são utilizadas para o mercado interno (Prata Anã, Pacovan, Maçã, Terra e D'Angola) pertencem ao grupo genômico AAB e para exportação (Nanica, Nanicão e Grande Naine) pertencem ao grupo genômico AAA (SILVA et al., 2016). A Prata

Anã é uma das cultivares mais plantadas e comercializadas no Brasil, sendo que no semiárido nordestino aproximadamente 95% das áreas estão sendo cultivadas com essa variedade (DONATO, 2009). Em relação a tolerância ao estresse hídrico, as cultivares de bananeira que contém somente o genoma A são menos tolerantes aos estresses abióticos do que aquelas que apresentam em sua constituição o genoma B (ROBINSON; GALÁN SAÚCO, 2010; RAVI et al., 2013).

O estresse diante da condição de seca na bananeira a nível celular é a diminuição da turgescência, logo, redução da expansão celular (TAIZ; ZEIGER, 2009). A reação externa ao estresse hídrico pode ser visualizado pela murcha e amarelecimento das folhas, necrose na borda do limbo e sintomas de queima. A exposição a déficit hídrico por longo período resultará na redução do tamanho e do número de folhas vivas, ocorrência de plantas menores, diminuição na emissão de folhas, de órgãos florais e no tamanho do cacho (ROBINSON; GALÁN SAÚCO, 2010). Sendo assim, o decréscimo na capacidade de produção de fotoassimilados, amarelecimento e redução da área foliar ocasiona queda prematura de folhas e danos ao tecido do pseudocaule (RUKUNDO et al., 2012).

A tolerância à seca em bananeira pode ser observada pela capacidade de manter seu status hídrico interno durante os períodos secos. Um dos mecanismos de tolerância é a sinalização das raízes, pela produção de ácido abscísico (ABA), para o fechamento estomático para evitar a perda de vapor d'água. Além disso, ocorre concentração de minerais e solutos orgânicos na folha, afim de realizar ajuste osmótico e manter o potencial de água na parte aérea, assim a planta garante a hidratação das folhas da bananeira mesmo com o solo seco (MAHOUACHI, 2009; VAN ASTEN et al., 2011).

A condição de escassez hídrica promove a redução da produtividade da bananeira por expor a planta a diferentes vulnerabilidades abióticas e bióticas. Segundo o estudo na região Central e Sudoeste de Uganda realizado por Asten et al. (2011), com variedades de banana tetraploide (AAAA) durante seis ciclos de produção em condições de seca, concluiu que o estresse hídrico reduz significativamente a produção de bananas. Esses dados indicam variação de 8,0 a 21,9 kg no peso de cacho, sendo 8 a 28% menos nas condições de

precipitação anual menor que 900 mm que nos períodos normais de precipitação (900 a 1.360 mm).

Além disso, o efeito da seca sob a fisiologia da bananeira no prolongamento dos períodos de seca pode desencadear desequilíbrio nutricional, pois a absorção de alguns nutrientes dependem do equilíbrio osmótico, como ocorre com o potássio, que 50% do transporte é atribuído a difusão (TAIZ, ZEIGER, 2009; SILVA et al. 2012). A alteração nos drenos preferenciais ocasiona maior aprofundamento das raízes no solo, logo, exibe maior zona de alongamento e surgimento de raízes secundárias, fato que expõe regiões suscetíveis a infecção de fitopatógenos, principalmente pelo *Foc* (LI et al., 2011).

5. Murcha de *Fusarium*

A murcha de *Fusarium* também conhecido como fusariose, tem como agente causal o fungo de solo *Fusarium oxysporum* Schlechtend.: Fr. *F. sp. cubense* (E.F. Smith) W. C. Snyder & Hansen (*Foc*) pertence à classe dos Ascomicetos, na forma anamórfica e apresenta alta capacidade de sobrevivência na ausência do hospedeiro principal. (MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2015). Esse fitopatógeno possui capacidade de viver saprofiticamente na matéria orgânica e em restos culturais, devido à formação de estruturas de resistência denominadas clamidósporos, que podem sobreviver por 20 anos. Além disso, o fungo é capaz de produzir outros tipos de esporos assexuais, como os microconídios e os macroconídios (AGRIOS, 2004).

A infecção do *Foc* pode ocorrer em qualquer época do ciclo da planta (LI et al., 2011), as hifas do patógeno penetram as raízes pelas regiões apicais ou zonas de alongamento, bem como, por penetração direta, por fissuras naturais causados pela emissão de raízes secundárias ou causadas por nematoides (BRASIL, 2018). Após a penetração, o *Foc* movimenta-se pelos vasos do xilema e coloniza o rizoma da bananeira, inicia a infecção na região periférica e segue direção ao centro da bainha. Essa infecção apresenta sintoma característico na região interna com coloração pardo-avermelhada, em virtude da presença do patógeno e liberação de toxinas (LI et al., 2011; BRASIL, 2018).

Os sintomas externos da murcha do *Fusarium* são observados pelo amarelecimento progressivo das folhas mais velhas para as mais jovens,

iniciando pela borda do limbo e direcionando no sentido da nervura principal, logo em seguida, as folhas murcham e quebram na proximidade do pseudocaule, semelhante a imagem de um guarda-chuva fechado, além de rachaduras e descoloração do pseudocaule (KUPPER, 2005).

A susceptibilidade do hospedeiro varia com as raças fisiológicas do patógeno. O *Foc* apresenta 3 raças fisiológicas atuantes na bananeira: raça 1 – infecta Gros Michel (AAA), Prata (AAB) e Maçã (AAB); raça 2 – infecta Bluggoe ou banana figo (ABB); raça 4 – infecta Gros Michel, Bluggoe, variedades do subgrupo Cavendish (AAA) e todas as variedades susceptíveis as raças 1 e 2. A raça 4 é subdividida em raça 4 tropical (RT4) e raça 4 subtropical (RS4). A RS4 se refere a espécies de *Foc* que são capazes de afetar Cavendish em áreas expostas a baixas temperaturas, enquanto que a RT4 pode afetar Cavendish tanto em condições tropicais, quanto subtropicais (BUDDENHAGEN, 2009).

Atualmente, há relatos que o *Foc* raça 4, sobrevive endofiticamente em hospedeiros secundários, como as plantas *Paspalum fasciculatum*, *Panicum purpurascens*, *Commelina diffusa*, *Heliconia caribea*, raízes de *Paspalum* sp. (HERRERA, 2012) e *Amaranthus* sp. (ROSENBAUM et al., 2014), espécies comuns em bananais. O patógeno pode permanecer nesses hospedeiros sem produzir sintomas visuais na ausência da bananeira (hospedeiro principal) até o momento favorável à disseminação (HERRERA, 2012).

A disseminação do fungo se dá através da irrigação, implementos agrícolas, animais, sementes, mudas contaminadas, além do homem desempenhar papel relevante na disseminação do patógeno pelo manejo inadequado da cultura (HADDAD et al., 2015). No Brasil, a doença tem caráter endêmico, e assim como nos demais países produtores, as variedades de bananeira altamente susceptíveis estão sendo substituídas por variedades mais resistentes, como as do subgrupo Cavendish. Em variedades susceptíveis como a Maçã, as perdas alcançam 100% da produção. Já em variedades com grau de susceptibilidade menor, como Prata, Pacovan e Prata Anã, as perdas são menores (CORDEIRO et al., 2004).

O controle do *Fusarium*, até o momento é realizado por medidas como aplicação de defensivos, inundação, práticas culturais que não tem tido os efeitos desejados ou por medidas drásticas como a erradicação das plantas infectadas. Nesse caso, a melhor forma é a prevenção do patógeno na área de cultivo.

Dentre as medidas preventivas estão, a fuga de áreas com histórico de incidência da doença, utilização mudas certificadas, realização de correção do solo, além de fazer o plantio preferencialmente em solos com teores mais elevados de matéria orgânica (CORDEIRO et al., 2004).

O controle de doenças fitopatogênicas, atualmente, tem se direcionado a medidas alternativas que resultem em menor impacto, tanto do ponto de vista ambiental, quanto à contaminação do ser humano. Nesse caso, a indução de supressividade do solo tem grande potencial de atuação como método de controle biológico para o *Fusarium*. Para tanto, o aumento e manutenção da riqueza de diversidade microbiana do solo através de incorporação de matéria orgânica, associado a enriquecimento com inoculação de antagonistas, é uma das técnicas promissoras na supressão do patógeno. (HUANG et al., 2017; PANG et al., 2017).

6. Controle biológico de doenças de planta

A definição de controle biológico consiste na 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). Os microrganismos que apresentam potencial para biocontrole de doenças, são organismos que estão presentes no ambiente e que, geralmente, são muito mais seletivos e específicos do que os pesticidas químicos por estabelecer interações do antagonista com foco em um patógeno alvo (MENEZES, 2010). Para Morandi e Bettiol (2009) dentre os microrganismos com potencial para o desenvolvimento de bioprodutos para o controle biológico de doenças de plantas destaca-se, bactérias do gênero *Bacillus* spp. e fungos do gênero *Trichoderma* spp..

A utilização de bactérias como biocontroladores pode ocorrer devido a produção de enzimas, sideróforos, antibióticos, competição por nichos ecológicos, espaço e nutrientes, parasitismo e indução de resistência (LUGTENBER; KAMILOVA, 2009). Edwards e Seddon (2001) destaca as bactérias do gênero *Bacillus* spp. como eficientes controladores de fitopatógenos pela produção de uma série antibiótico e substâncias microbianas. Além disso, essas bactérias são capazes de produzir endósporo, que toleram diferentes

temperaturas, oscilações dos níveis de pH, a substâncias pesticidas e suportam tempo de estocagem (BACKMAN et al., 2008).

Os agentes biocontroladores bacterianos do gênero *Bacillus* spp. apresentaram êxito como antagonistas 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., 2014), *Fusarium oxysporum* (SOTOYAMA et al., 2016).

No que se refere a agentes de biocontrole fúngicos, os isolados pertencentes ao gênero *Trichoderma* spp. apresentam desempenho promissor no controle biológico pela presença de mecanismos de micoparasitismo, predação, antibiose e competição por recursos. Além disso, novos testes indicaram atividade de indução de resistência sistêmica ou localizada. Dentre as diferentes espécies de *Trichoderma*, cada uma possui distinta interação com os patógenos, indicando a possibilidade de combinação de diferentes espécies combinadas para o tratamento de doenças de plantas. (HARMAN, 2006; ATANASOVA et al., 2013). Verma et al. (2007) descreve a ação de algumas linhagens de *Trichoderma* na associação com raízes de modo simbiótico, solubilizando nutrientes do solo, promovendo maior disponibilidade de nutrientes e proporcionando desenvolvimento radicular. Esse fungo apresenta-se como eficiente na atividade promotora de crescimento por meio da produção de compostos semelhantes a auxinas (CONTRERAS-CORNEJO et al., 2009).

Dentre as mais de 200 espécies de *Trichoderma*, para a cultura da bananeira, destacam-se as espécies mais utilizadas e com maior eficiência, *T. harzianum* e *T. asperellum*, ambos apresentam alta competência na colonização rizosférica (FRIEDL; DRUZHININA, 2012). Estas espécies têm sido comumente encontrada em solo ou endofiticamente nas plantas (XIA et al., 2011). No solo, o *Trichoderma* é encontrado em ambiente úmido, sem a incidência direta de raios solares e com temperaturas amenas (20 a 25°C) e com pH mais ácido (BHALE; RAJKONDA, 2012; GARCÍA-NÚÑEZ et al., 2012).

Diante disso, a trajetória de estudo com biocontroladores permitem novos testes de combinação da microbiota benéfica à bananicultura, utilizando as

potencialidades de cada um dos microrganismos para mitigar os efeitos ambientais e bióticos. Essas estratégias visam obter maior qualidade fitossanitária, redução no custo de produção e possibilidade reduzir ou substituir gradativamente o controle químico pelo controle biológico. Entretanto, importante salientar os isolados de biocontrole, solubilizadores, fixadores de nitrogênio, promotores de crescimento, sintetizadores de biofilme, somente poderão ser combinados no mesmo tratamento, caso não ocorra inibição entre eles.

Referências

- AGRIOS, G. N. Losses caused by plant diseases. **Plant Pathology**. Elsevier, Oxford, p. 29-45, 2004.
- AQUINO, C. F.; SALOMÃO, L. C. C.; SIQUEIRA, D. L.; CECON, P. R.; RIBEIRO, S. M. R. Teores de minerais em polpas e cascas de frutos de cultivares de bananeira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 49, n. 7, p. 546-553, 2014.
- ARAUJO, F. F.; CREMONEZI, A. C. T.; MANRIQUE, A. E. R.; GONZAGA, E. N.; OLIVEIRA, G. C.; MAZZUCHELLI, R. C. L.; Seleção de rizobactérias para promoção do crescimento de algodoeiro. **Colloquium Agrariae**, Presidente Prudente, n. Especial, p. 32-38, 2012.
- ASTEN, P. J. A. V; FERMON, A. M.; TAULYA, G. Drought is a major yield loss factor for rainfed East African highland banana. **Agricultural Water Management**, v. 98, p. 541–552, 2011.
- 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**, v. 14, p.121, 2013.
- BACHAR, A.; AL-ASHHAB, A.; SOARES, M.I.M.; SKLARZ, M.Y.; ANGEL, R.; UNGAR, E. D.; GILLOR, O. Soil microbial abundance and diversity along a low precipitation gradient. **Microbial Ecology**, New York, v. 60, p. 453-461, 2010.
- BACKMAN, P.A.; SIKORA, R. Endophytes: An emerging tool for biological control. **Biological Control**. v.46, p.1-3, 2008.
- BAHIA, **Caderno de Ações no Semiárido Baiano**. Governo do Estado da Bahia, Salvador – BA, 2014.
- 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 ean-leaves. **Phytopathology**. p. 1148-1152, 1983.
- BALLESTERO, M. S. **Bananos: técnicas de producción, poscosecha y comercialización**. 3.ed. San José: Litografía e Imprensa LIL, 2008. 1 CD-ROM.
- BHALE, U. N.; RAJKONDA, J. N. Evaluation of distribution of *Trichoderma* species in soils of Marathwada region of Maharashtra during 2007-2011. **Journal of Mycology and Plant Pathology**, v. 42, n. 4, p. 505-508, 2012.
- BORGES, A. L.; SOUZA, L. S. **O cultivo da bananeira**. Cruz das Almas, EMBRAPA - Mandioca e Fruticultura, 279 p., 2004.

BRASIL. **Nova delimitação do semiárido brasileiro**. Ministério da Integração Nacional. Brasília: MIN/Secretaria de Políticas de Desenvolvimento Regional, 2005.

BRASIL. **Raça 4 tropical de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense***: subsídios para caracterização de praga quarentenária ausente / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília: MAPA/SDA, 2018

BUDDENHAGEN, I. Understanding strain diversity in *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* and history of introduction of 'tropical race 4' to better manage banana production. **Acta Hort.** 828, 193-204, 2009.

CASÁN, F.; VANDERLEYDEN, J.; SPAEPEN, S. Physiological and agronomical aspects of phytohormone production by model plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) belonging to the genus *Azospirillum*. **Journal of Plant Growth Regulators**, v.32, n.3, p.440-459, 2013.

CHANG, W.-S.; van de MROTEL, M.; NIELSEN, L.; GUZMAN, G.N.; LI, X.; HALVERSON, L.J. Alginate production by *Pseudomonas putida* creates a hydrated microenvironment and contributes to biofilm architecture and stress tolerance under water-limiting conditions. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 189, n. 22, p. 8290-8299, 2007.

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.

COHEN, A.C.; TRAVAGLIA, C.N.; BOTTINI, R.; PICCOLI, P.N. Participation of abscisic acid and gibberellins produced by endophytic *Azospirillum* in the alleviation of drought effects in maize. **Botany**, Ottawa, v.87, n.5, p.455-462, 2009.

COMPANT, S.; DUFFY, B.; NOWAK, J.; CLEMENT, C.; BARKA, E. **Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases**: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects. Applied and environmental microbiology, p. 4951–4959, 2005.

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.; MATOS, A. D.; MEISSNER FILHO, P. E. Doenças e métodos de controle. **O cultivo da bananeira**, v. 1, p. 146-182, 2004.
- COSTA, B.P.; REGO, C.A.R.M. As várias cultivares de banana e a problemática de sua comercialização no município de Olinda Nova do Maranhão. **Agropecuária Científica do Semiárido**, v. 10, n. 4, p. 01-04, 2015.
- DANHORN, T.; FUQUA, C. Biofilm formation by plant-associated bacteria. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 61, p. 401-422, 2007.
- DANTAS, J. L. L.; SHEPHERD, K.; SILVA, S. O.; SOARES FILHO, W. S. Classificação botânica, origem, evolução e distribuição geográfica. In: ALVES, E. J. **A cultura da banana: aspectos técnicos, socioeconômicos e agroindustriais**. 2ª edição. Brasília: Embrapa SPI/Cruz das Almas: Embrapa CNPMF, p. 27-34, 2000.
- DONATO, S. L. R.; ARANTES, A. DE M.; COELHO, E. F., RODRIGUES M. G. V. Considerações ecofisiológicas e estratégias de manejo da bananeira. VII Simpósio Brasileiro sobre Bananicultura. **Anais**. Montes Claros- MG, 2015.
- EDWARDS, S. G.; SEDDON, B. Mode of antagonism of *Brevibacillus brevis* against *Botrytis cinerea* in vitro. **Journal of Applied Microbiology**. 91:652-659. 2001.
- FAO. **Agricultural Database**. Disponível em: <<http://www.fao.org>. > Acesso em: 28 dezembro de 2020.
- FERREIRA, E. P. B.; KNUPP, A. M.; MARTIN-DIDONET, C. C. G.; Crescimento de cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.) influenciado pela inoculação com bactérias promotoras de crescimento de plantas. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 30, n. 3, p. 655-665, 2014.
- FRIEDL, M. A.; DRUZHININA, I. S. Taxon-specific metagenomics of *Trichoderma* reveals a narrow community of opportunistic species that regulate each other's development. *Microbiology*, v. 158, n. 1, p. 69-83, 2012.
- GARCÍA-NÚÑEZ, H. G.; ROMERO-GÓMEZ, S. J.; GONZÁLEZ-ESQUIVEL, C. E.; NAVA-BERNAL, E. G.; MARTÍNEZ-CAMPOS, A. R. Isolation of native strains of *Trichoderma* spp, from horticultural soils of the Valley of Toluca, for potential biocontrol of *Sclerotinia*. **Tropical and Subtropical Agroecosystems**, v. 15, n. 2, p. 357-365, 2012.
- GLICK, BR. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. **Microbiological Research** 169: 30– 39, 2014.
- 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.; AMORIM, E. P.; RODRIGUEZ, M. A. D. Fusariose da bananeira no Brasil: situação atual e perspectivas de pesquisa. **Congresso latino-americano y del Caribe de Plátanos y Bananos**, Brasil, 2015.

HALFELD-VIEIRA, B. A.; MARINHO-PRADO, J. S.; NECHET, K. L.; MORANDI, M. A. B.; BETTIOL, W. **Defensivos agrícolas naturais**: uso e perspectivas. Brasília, DF: Embrapa. 853 p., 2016.

HALFELD-VIEIRA, B. A.; VIEIRA, J. R.; ROMEIRO, R. S.; SILVA, H. S. A.; BARACATPEREIRA, M.C. Induction of systemic resistance in tomato by the autochthonous phylloplane resident *Bacillus cereus*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, p.1247-1252, 2006.

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

HERRERA, R.; NUNEZ, D.; ROMERO, N.; BESOAIN, X.; PEREZ, L.; MONTEALEGRE, J. Sensitivity of wild-type and mutant *Trichoderma harzianum* strains to fungicides: **Ciencia e Investigacion Agraria**, Santiago de Chile, v. 39, p. 569-576, 2012.

HUANG, H.C.; ERICKSON, R.S.; HISIEH, T.F. Control of bacterial wilt of bean (*Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*) by seed treatment with *Rhizobium leguminosarum*. **Crop Protection, Guildford**, v.26, p.1055-1061, 2007.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant Soil**, Crawley, n.3, p.413-425, 2010.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Indicadores. Produção Agrícola Municipal**. v. 46, p.1-8, 2019.

KAVAMURA, V.N. ; TAKETANI, R.G. ; LANÇONI, M.D. ; ANDREOTE, F.D.; MENDES, R., DE MELO, I.S. Water regime influences bulk soil and rhizosphere of *Cereus jamacaru* bacterial communities in the Brazilian Caatinga biome. **PloS one**, v.8, n.9, e73606, 2013.

KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIM FILHO, A; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M.; (eds.). **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Ceres, 1997.

KUPPER, K. C. Mal-do-Panamá. **ANAIS XIII Reunião Itinerante de Fitossanidade do Instituto Biológico**. p.28-31, 2005. Disponível: www.biologico.sp.gov.br. Acesso em: 25 de dezembro 2020.

LENTZEN, G.; SCHWARZ, T. Extremolytes: natural compounds from extremophiles for versatile applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 72, p. 623-634, 2006.

LI, C.Y.; Y.I., G.J.; CHEN, S.; SUN, Q.M.; ZUO, C.W.; HUANG, B.Z.; WEI, Y.R.; HUANG, Y.H.; WU, Y.L.; XU, L.B.; HU, C.H.. Studies on some of the early events in the *Fusarium oxysporum-Musa* interaction. **Acta Horticulture**. 897: 305-312, 2011.

LI, C., ZUO, C., DENG, G., KUANG, R., YANG, Q., HU, C., SHENG, O., ZHANG, S., MA, L., WEI, Y. Contamination of bananas with beauvericin and fusaric acid produced by 18 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. **PloSone**, v8, e70226, 2013.

LIMA, R.D.S.; MUNIZ, M.D.F.S.; CASTRO, J.D.C.; OLIVEIRA, E.R.L.; OLIVEIRA, P.G.; SIQUEIRA, K.M.S.; MACHADO, A.C.Z.; COSTA, J.G. Frequencies and population densities of the major. **Nematropica**, v. 43, n. 2, p. 186-193, 2013.

LISAR, S. Y. S.; MOTAFAKKERAZAD, R.; HOSSAIN, M. M.; RAHMAN, I. M. M. **Water stress in plants: causes, effects and responses**. Rijeka: Intech Europe, 2012.

LSPA , **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**. Banco de tabelas estatísticas. 2020. Disponível em <<https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9201-levantamento-sistemico-da-producao-agricola.html>> Acesso em: 12 janeiro de 2021.

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

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.; SOMROTHI POL, S.; SUETRONG, S.; WEN, T.; XU, J. Towards a natural classification and backbone tree for Sordariomycetes. **Fungal Diversity**, v. 72, p. 199-301, 2015.

MAHOUACHI, J. Changes in nutrient concentrations and leaf gas exchange parameters in banana plantlets under gradual oil moisture depletion. **Scientia Horticulturae**, v.120, p.466-469, 2009.

MARQUES, P. R. R.; DONATO, S. R.; PEREIRA, M. C. T.; COELHO, E. F.; ARANTES, A. de M.. Características agronômicas de bananeiras tipo Prata sob diferentes sistemas de irrigação. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.46, n.8, 2011.

MCNEIL, S.D.; NUCCIO, M.L.; HANSON, A.D. Betaines and related osmoprotectants. Targets for metabolic engineering of stress resistance. **Plant Physiology**, Washington, v. 120, p. 945-949, 1999.

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.

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. In: **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna- SP: Embrapa Meio Ambiente, p. 7-14, 2009.

MOREIRA-MATTOS, L.A. **Respostas fisiológicas e análise proteômica de bananeiras submetidas à deficiência hídrica**. 2013. 108 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 2013.

NOCKER, A.; FERNANDEZ, P.S.; MONTIJN, R.; SCHUREN, F. Effect of air-drying on bacterial viability: a multiparameter viability assessment. **Journal of Microbiological Methods** 90: 86-95, 2012.

PANG, K., YOU, H., CHEN, Y., CHU, P., HU, M., SHEN, J., MagR alone is insufficient to confer cellular calcium responses to magnetic stimulation. **Front. Neural Circuits** 11:11. 2017.

PIRKNER, M.; TANNY, J.; SHAPIRA, O.; TEITEL, M.; COHEN, S.; SHAHAK, Y.; ISRAELI, Y. The effect of screen type on crop micro-climate, reference evapotranspiration and yield of a greenhouse banana plantation. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.180, n.1, p.32-39, 2014.

PLOETZ, R. C. *Fusarium* wilt of banana. **Phytopathology**, v. 105, n. 12, p. 1512-1521, 2015.

PODILE, A.R.; KISHORE, A.K. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. In: GNANAMANICKAM, S.S. (Ed.). **Plant-Associated Bacteria**. Netherlands: Springer- Verlag,. Pt 2, p. 195-230, 2007.

QUEIROZ, L.P. Flowering plants of the Brazilian Semi-Arid. In: QUEIROZ, L.P.; RAPINI, A.; GIULIETTI, A.M. (Ed.). **Towards greater knowledge of the Brazilian semi-arid biodiversity**. Brasília: Ministério de Ciência e Tecnologia, 2006. Cap. 6, p. 45-50.

RAVI, I. Y; UMA, S.; VAGANAN, M.M.; MUSTAFFA, M.M. Phenotyping bananas for drought resistance. *Frontiers in Physiology*. **Plant Physiology**, v.4, p.1-15, 2013.

RINAUDI, L.V.; GIORDANO, W. An integrated view of biofilm formation in rhizobia. **FEMS Microbiology Letters**, v.304, p.1-11, 2010.

ROBINSON, J.C.; GALÁN SAÚCO, V. **Bananas and plantains**. 2nd ed. Oxford: CAB International. 311p. (Crop production science in horticulturae series, 19), 2010.

ROSENBAUM, K. K.; MILLER, G.L.; KREMER, R. J.; BRADLEY, K. W.. Interactions between glyphosate *Fusarium* infection of common waterhemp (*Amaranthus rudis*), and soil microbial abundance and diversity in coil collections from Missouri. **Weed Sci**. 62, 71-82, 2014.

RUKUNDO, P; CARPENTIER, S.C; RONY, R. Development of in vitro technique to screen for drought tolerant banana varieties by sorbitol induced osmotic stress. **African Journal of Plant Science**, v.6, p.416-425, 2012.

RYTTER, J. L.; LUKEZIC, F. L.; CRAIG, R.; MOOMAN, G. W. Biological control of geranium rust by *Bacillus subtilis*. **Phytopathology**, v. 79, n. 3, p. 367-370, 1989.

SANTOS, D.; SIQUEIRA, D. L.; SALOMÃO, L. C. C.; CECON, P. R.; OLIVEIRA, G. P.; MACHADO, D. L. M.; ZUCOLOTO, M. Teores de carboidratos e fluorescência da clorofila a em folhas de limeiras ácidas 'Tahiti' submetidas ao

anelamento e incisão anelar de ramos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.44, n.10, p.1725-1731, 2014.

SANTOYO, G.; MORENO-HAGELSIEB, G.; OROZCO-MOSQUEDA, M. D. C.; GLICKC, B.R. Plant growth-promoting bacterial endophytes. **Microbiol Res**. 183: 92-99, 2016.

SARAF, M.; RAJKUMAR, S.; SAHA, T. Perspectives of PGPR in Agri-Ecosystems. In: Maheshwari, D.K.K. (Ed.). **Bacteria in Agrobiolgy: Crop Systems**. Heidelberg: Springer- Verlag, Cap. 13, p. 361-385, 2011.

SILVA, A. J. P. da S.; ARANTES, A. M.; CRUZ, A. J. S.; COTRIM, C. E.; COELHO, E. F.; COSTA, F. S.; SANT'ANA, J. A.; MARQUES, P. R. R.; OLIVEIRA, P. M.; DONATO, S. L. R.; MAROUELLI, W. A. **Irrigação da bananeira** - Brasília, DF: Embrapa, 2012

SILVA, S. de O; AMORIM, E.P; SANTOS-SEREJO, J.A; BORGES, A.L. Cultivares. In: FERREIRA, C.F.; SILVA, S.O.; AMORIM, E.P.; SANTOS-SEREJO, J.A. Ed(s). **O agronegócio da bananeira**. Brasília: p.137-170,2016.

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.

SOUZA, D.M.; GARCIA-CRUZ, C.H. Produção fermentativa de polissacarídeos extracelulares por bactérias. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 25, n. 4, p. 331-340, 2004.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4ed. Porto Alegre: Artmed. 848p, 2009

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.

TRIGUEIRO, E.R.C.; OLIVEIRA, V.P.V.; BEZERRA, C.L.F. Indicadores biofísicos e a dinâmica da degradação / desertificação no bioma Caatinga: estudo de caso no município de Tauá, Ceará. **Revista Eletrônica do Prodepa**, Fortaleza, v. 3, n. 1, p. 62-82, 2009.

VAN ASTEN, P.J.A; FERMONT, A.M; TAULYA, G. Drought is a major yield loss factor for rainfed East African highland banana. **Agricultural Water Management**, v.98, p.541-552, 2011.

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.

XIA, X.; LIE, T. K.; QIAN, X.; ZHENG, Z.; HUANG, Y.; SHEN, Y. Species diversity, distribution, and genetic structure of endophytic and epiphytic *Trichoderma* associated with banana roots. **Microbial Ecology**, v. 61, n. 3, p. 619-625, 2011.

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.

CAPÍTULO II

POTENCIAL DE BACTÉRIAS EDÁFICAS ORIUNDAS DO SEMIÁRIDO PARA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO, TOLERÂNCIA À SECA E CONTROLE BIOLÓGICO EM BANANEIRA

Artigo elaborado sob as normas da Revista "Revista Brasileira de Ciência do Solo"

POTENCIAL DE BACTÉRIAS EDÁFICAS ORIUNDAS DO SEMIÁRIDO PARA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO, TOLERÂNCIA À SECA E CONTROLE BIOLÓGICO EM BANANEIRA

Resumo

A banana (*Musa* spp.) é uma das frutas mais consumidas e cultivadas nas regiões tropicais e subtropicais, porém sua produção pode ser comprometida pela suscetibilidade da cultura ao estresse hídrico e incidência de fitopatógenos como *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc), fungo causador da doença da murcha de *Fusarium*. O presente trabalho selecionou bactérias edáficas do semiárido e verificou o potencial de antagonismo ao Foc, de promoção de crescimento e de tolerância a seca. Para tanto foram realizados isolamentos à partir do solo do semiárido, coletado em rizosfera de plantas nativas e de cactáceas. Estes isolados foram testados *in vitro* com uso de meio seletivos para selecionar bactérias produtoras de sideróforos, fixadoras de nitrogênio, tolerantes ao estresse hídrico e térmico e produtoras de exopolissacarídeos (EPS). Posteriormente, os isolados selecionados foram testados para antibiose recíproca, solubilização de potássio e fosfato, antagonismo com pareamento direto com isolado de Foc (raça 1) e *Trichoderma asperellum* (T-81). Os testes resultaram na seleção de 15 isolados bacterianos produtores de EPS, que cresceram em meio com atividade de água reduzida, sob temperaturas de até 55°C, cinco testaram positivo para fixação de nitrogênio, dois apresentaram solubilização de potássio e seis com capacidade de produzir sideróforos. Os 15 isolados selecionados apresentaram algum grau de compatibilidade em teste de antibiose recíproca, além de índice de baixa solubilização de fosfato e antagonismo ao Foc e três isolados não inibiram crescimento do *T. asperellum*. Portanto, os resultados deste trabalho indicam potencial dos isolados selecionados serem utilizados combinados entre si e com *T. asperellum* para promoção de crescimento vegetal, tolerância a seca e manejo de murcha de *Fusarium*.

Palavras-chave: *Musa* spp., Estresse hídrico, Biocontrole, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*.

1. Introdução

O semiárido brasileiro possui condições climáticas que favorecem a ocorrência do estresse hídrico, em virtude da predominância de altas temperaturas e baixos índices pluviométricos, restritos a curtos períodos abaixo de 800 mm ao ano (IBGE 2019). A vegetação característica da zona semiárida é a caatinga, que possui diversidade de plantas nativas e microrganismos edáficos adaptados aos severos regimes de seca. Em contrapartida, a atividade agrícola da região pode ser comprometida pela condição de baixa oferta hídrica, sobretudo para culturas suscetíveis à seca, a exemplo da bananeira (Kissel et al. 2015).

O estresse hídrico induz rápida resposta fisiológica em bananeira. Dentre as principais reações destacam-se a redução da área foliar e do aprofundamento das raízes no solo, em decorrência da alteração dos drenos preferenciais, pela mudança da razão entre a parte aérea e a raiz, (Taiz & Zeiger 2009). Sob essas condições de estresse as plantas estão mais expostas a infecções por fitopatógenos, como *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc), que penetra nas zonas de alongamento e/ou fissuras naturais causados pela emissão de raízes secundárias (Li et al. 2011).

O Foc é o agente causal da doença vascular conhecida como murcha de *Fusarium*, ocupa quinto lugar no ranking entre os dez fitopatógenos fúngicos mais relevantes no campo científico e econômico, e é mundialmente considerado causador da doença mais grave da bananicultura pelo seu potencial destrutivo e pela capacidade de sobrevivência no solo (Ploetz 2015, Brasil 2018). Essas características indicam a necessidade constante de pesquisas para manejo da doença, uma vez que o controle químico tem baixa eficiência e o controle genético possui eficácia por tempo limitado, devido à alta variabilidade do fungo e surgimento de novas raças (Dean et al. 2012).

Assim, uma alternativa promissora para a bananicultura é o uso de isolados da microbiota edáfica que disponham de mecanismos benéficos, dentre os quais biocontrole do Foc, capacidade de induzir o crescimento vegetal e proporcionar tolerância à seca. Como agentes de biocontrole, destacam-se aqueles microrganismos que atuam por meio da competição por nutrientes, produção de compostos antimicrobianos, indutores de resistência sistêmicas, dentre outros (Atanasova et al. 2013) Sobre a mitigação dos efeitos

do estresse hídrico, são relevantes os microrganismos com capacidade de produção de osmólitos, exopolissacarídeos e reguladores de crescimento (Casán et al. 2013).

Diante disso, a hipótese deste estudo é que as bactérias oriundas do solo do semiárido tem potencial de promover crescimento de plantas de bananeira proporcionar tolerância ao estresse hídrico, em virtude adaptações evolutivas às condições ambientais. Esse estudo teve como objetivo a busca e , e caracterização de isolados bacterianos oriundos do solo do semiárido baiano quanto ao potencial de promoção de tolerância à seca, crescimento vegetal e antagonismo ao *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*.

Material e Métodos

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Mandioca e Fruticultura, município de Cruz das Almas, Bahia. Os isolados utilizados em testes de pareamento foram *Trichoderma asperellum* – Tri-81 e *F. oxysporum* f.sp *cubense* raça 1

2.1 Coleta de amostras de solo

As amostras do solo foram coletadas no município de Itatim- Ba (12°43'41.9"S 39°42'19.3"W) em novembro de 2019, período de estiagem na região. Foram selecionados seis pontos de coletas, três pontos selecionados próximo a arbustos que não apresentassem queima, murcha ou morte na parte aérea e outros três em cactáceas. As amostras de solo rizosférico e raízes foram armazenadas em sacos plásticos e transportados para casa de vegetação da Embrapa.

2.2 Isolamento de microrganismos

As seis amostras do solo foram dispostas em sacos com capacidade de 1 kg e realizado o plantio de mudas bananeira como planta isca (variedade Prata Anã). As plantas foram mantidas por 50 dias em casa de vegetação para proporcionar interação dos microrganismos com a rizosfera. Para favorecer a predominância de microrganismos tolerantes à seca foi induzido um estresse hídrico com suspensão da irrigação durante dois ciclos, cada um com duração de 25 dias.

Logo após 50 dias, foram coletadas amostras de solo e raízes das plantas que sobreviveram aos dois ciclos sem irrigação e levadas ao laboratório. O

isolamento dos microrganismos foi realizado via diluição seriada, seguido do plaqueamento em meios semisseletivos nutriente ágar, para bactérias totais e bactérias produtoras de endósporos, meio B de King (King et al. 1954) para bactérias produtoras de sideróforos. As colônias bacterianas que apresentaram diferenças morfológicas foram purificadas por repicagem em meio nutriente ágar, totalizando 126 bactérias isoladas.

2.3 Seleção de microrganismos fixadores de nitrogênio de vida livre e produtores de sideróforos

Os 126 isolados obtidos foram crescidos em meio de cultura ágar nutriente por 48 horas a 28 °C. Logo após, adicionaram-se 200 µL de água destilada esterilizada às placas seguido da raspagem das colônias com alça Drigalski. Adicionaram-se 100 µL de suspensão bacteriana em meio de cultura semissólido NFb (Döbereiner et al. 1995), com posterior incubação a 28 °C por 10 dias. A presença de uma película abaixo da superfície do meio, e modificação da coloração para azulado, caracterizou resultado positivo para fixação de nitrogênio para o isolado avaliado.

Para teste de bactérias produtoras de sideróforos foi utilizado meio de cultura seletivo com limitação em ferro, ágar PGS (Peptona, gelatina e sacarose) (Lamichhane & Varvaro, 2013). Foram posicionados discos de papel filtro umedecidos com suspensão bacteriana em três repetições por placa e mantidos a 28 °C por 48 horas. A avaliação dos produtores de sideróforos foi considerado positivo para colônias que apresentaram fluorescência sob luz com comprimento de onda próximo do ultravioleta (King et al., 1954).

2.4 Seleção de microrganismos tolerante ao estresse térmico e hídrico

Todos os isolados obtidos foram repicados em cinco repetições com posições equidistantes em placas de Petri de 9 cm de diâmetro, contendo meio de cultura TSA (Triptona, soja e ágar) (10 %) suplementado com sorbitol (405 gL⁻¹) regulando atividade de água com valor de 0,919 (considerando que é atividade de água mínima para a maioria das bactérias). O experimento foi repetido em diferentes temperaturas (30 °C, 40 °C, 50 °C e 55 °C) com fotoperíodo de 12 horas.

A avaliação foi realizada após três dias, atribuindo notas de 1 a 3 para categorizar o crescimento das colônias, sendo: nota 1 para os isolados que

apresentaram crescimento no local da repicagem; nota 2 para isolados que cresceram até 5 mm; e nota 3 para isolados que cresceram acima de 5 mm.

2.5 Seleção de microrganismos produtores de exopolissacarídeos (EPS)

Os isolados bacterianos foram crescidos em discos de papel filtro esterilizado de 5mm dispostos em meio de cultura de acordo com Guimarães et al. (1999) e incubados à 28 °C. A produção de EPS foi caracterizada visualmente, mediante a formação e medição do halo do EPS produzido.

A classificação do potencial de produção de EPS pelas bactérias foi realizada de acordo com Paulo (2010), onde os códigos: + representou pouca produção (halo de EPS \leq 10 mm); ++ representou média produção (halo de EPS entre 10 e 14 mm) e +++ representou ótima produção (halo de EPS \geq 14 mm). A confirmação da produção de EPS foi realizada pelo método químico, misturando a colônia bacteriana em 2 mL de álcool etílico, com auxílio de uma alça de platina (Paulo 2010).

2.6 Seleção de isolados solubilizadores de potássio e fosfato

As 126 bactérias foram submetidas a uma avaliação para seleção dos melhores isolados. Esse processo foi realizado utilizando duas etapas de classificação, a primeira agrupando os isolados testaram positivo em mais de uma atividade bioquímica. Na segunda etapa, foram agrupados os isolados e realizou-se avaliação com utilizando quesito hierárquico, sendo o primeiro quesito as melhores bactérias tolerantes ao estresse hídrico e térmico; segundo, os melhores produtores de exopolissacarídeos; e por último os isolados produtores de sideróforos e fixadores de N. Essa avaliação selecionou 15 isolados para realizar os próximos testes.

Para avaliação de bactérias com capacidade de solubilização de potássio foi realizado repicagem dos 15 isolados em meio de cultura Aleksandrov (1967) enriquecido de potássio a partir de pó de rocha (Biotita-Xisto e Feldspato rosa), em cinco repetições, mantidas em incubação no escuro por 15 dias a 28 °C. Para avaliar o potencial de solubilização de fosfato de cálcio as 15 bactérias que foram repicadas no meio NBRIP sólido (Nautiyal et al. 1999) em cinco repetições por placa, mantidos a 28 °C por 15 dias.

Em ambos os testes o resultado foi considerado positivo mediante presença de halo claro ao redor da colônia. Posteriormente, foi aferido o

diâmetro da colônia e do halo com régua milimetrada e obtido o índice de solubilização (IS), com o cálculo da razão entre o diâmetro do halo e o diâmetro da colônia (Berraqueiro et al. 1976). A solubilização foi classificada de acordo com os IS obtidos, conforme sugerido por Silva Filho e Vidor (2000): (IS < 2 = baixo índice de solubilização; IS entre 2 e 3 = média solubilização; IS > 3 = alta solubilização).

2.7 Teste de produção de ácido idol-acético (AIA)

Os isolados foram repicados com auxílio da alça de platina, três repetições por placa, em meio Triptona Soja Ágar (TSA) enriquecido com 5mM de L-triptofano e cobertas com uma membrana de nitrocelulose previamente esterilizada (Khalid et al. 2004).

As culturas foram incubadas por 48 horas em temperatura ambiente. Após esse período, as membranas foram removidas das placas com uma pinça estéril e transferidas para tubos, em que foram saturadas com solução de Salkowski (7.9 mol. L⁻¹ de H₂SO₄ e 12g FeCl₃) e incubadas no escuro por um período de 30 minutos a 2 horas. A estimativa colorimétrica foi verificada por meio da observação de halo róseo-avermelhado na placa e mudança na coloração da membrana de nitrocelulose.

2.8 Avaliação do potencial de controle biológico dos isolados pela produção de compostos voláteis, não-voláteis e pareamento direto com *Foc* e *T. asperellum*

O teste de produção de compostos voláteis foi realizado com uso de placas vertidas na base e na tampa, posicionando disco de micélio de *Foc* na base e repicado o isolado bacteriano no centro da tampa da placa com alça de platina. Como controle, foi utilizado caldo nutriente esterilizado na tampa da placa. As placas foram mantidas a 28 °C, em posição invertida, de modo que o micélio fique no topo e o isolado bacteriano na base.

Para o teste de inibição por compostos não-voláteis, quinze isolados bacterianos foram cultivados em meio BD (batata-dextrose) em erlenmeyers de 150 mL durante sete dias. Após esse período, a biomassa bacteriana foi descartada utilizando filtro Millipore Millex® com 0,2 µm, com separação dos metabólitos que foram liberados. Em seguida, quatro discos de papel filtro esterilizados foram imersos no filtrado e transferidos para placas de Petri de 9

cm de diâmetro com meio de cultivo BDA, em posição equidistantes a um centímetro da borda da placa. Posteriormente, foram repicados separadamente um disco de 5 mm de diâmetro com tratamentos que continham micélio de *Foc* e de *T. asperellum* no centro da placa. Como controles, foram utilizadas placas em que quatro papéis filtro foram imersos em água destilada esterilizada para substituir os compostos filtrados. As placas foram mantidas a 25 °C por 12 dias em fotoperíodo de 12 horas.

Para teste de pareamento direto, foram posicionados quatro discos de papel filtro em posições equidistantes umedecidos com meio líquido, após 24 horas de crescimento dos isolados bacterianos, e no centro da placa foi posicionado disco de 5 mm de diâmetro com tratamentos que continham micélio de *Foc* e de *T. asperellum*. Como controle, foram utilizadas placas contendo papel filtro umedecido com água destilada esterilizada. As placas foram mantidas a 25 °C por 12 dias em fotoperíodo de 12 horas.

Os três experimentos foram realizados com delineamento inteiramente casualizado, cada um com 32 tratamentos e quatro repetições. As avaliações consistiram em aferições do diâmetro das colônias dos fungos depois de 4, 8 e 12 dias, com régua milimetrada. A partir dos dados, determinou-se a porcentagem de inibição do crescimento micelial (PICM) utilizando a fórmula (Menten et al., 1976): $PICM = (\text{Diâmetro do controle} - \text{diâmetro do tratamento}) \times 100 / \text{Diâmetro do controle}$.

Todos os dados dos experimentos que foram transformados pela fórmula 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 agrupamentos de medias de Scott Knott a 5%, utilizando o programa estatístico SISVAR (Ferreira et al. 2011).

2.9 Teste de antibiose recíproca

Para a possibilidade do uso dos isolados em tratamentos combinados, foi realizado teste de antibiose recíproca entre os 15 isolados. O ensaio consistiu na técnica de aplicação de dupla camada de meio de cultura, de acordo com metodologia adaptada de Romeiro (2007). Os isolados foram semeados em placas de Petri em meio nutriente ágar (NA), cada isolado em sete pontos equidistantes na superfície do meio e foram mantidas a 28 °C por 24 horas. Logo após esse período, as placas foram vertidas com uma sobrecamada

composta por 10 mL de meio NA semi-fundente e 100 µL de suspensão bacteriana. A avaliação consistiu na visualização de halos de inibição na área sobre as repicagens, que indica a incompatibilidade entre os isolados bacterianos.

2. Resultados

Os isolamentos resultaram na obtenção de 126 isolados bacterianos selecionados inicialmente pela interação com a planta isca (bananeira Prata Anã) sob condição de estresse hídrico e posteriormente com uso de meios de cultura semi-seletivos.

Dentre os 126 isolados bacterianos, 30 cresceram em meio com baixa atividade de água sob temperaturas de até 55° C, 21 testaram positivos para fixação de N, com destaque para quatro isolados (Bac 1.5, Bac 22.3, Bac 8, e Bac 24.1), pela formação de espessa película aerotóxica e acentuada mudança de coloração para azulado. Quanto ao teste de produção de sideróforos, selecionaram-se 21 isolados bacterianos que apresentaram fluorescência sob a luz próximo ao comprimento de onda ao ultra violeta.

A produção de exopolissacarídeos (EPS) foi visível em 68,2 % dos isolados, com halo de crescimento variando de 6 mm a 56 mm, sendo 36,5 % atribuídos com +, 5,6 % com ++ e 26,2% com ++. Os melhores resultados foram obtidos em três isolados (Bac 2; Bac3; Bac7) com respectivos diâmetros, 50 mm, 53 mm e 56 mm.

Os melhores isolados seguiram duas etapas de classificação. A primeira considerou os isolados que apresentaram resultados positivos nos quatro testes realizados, agrupando em conjuntos, com definição de 44 isolados nas interseções (Figura 1). Dentre estes, na segunda etapa foram selecionados baseado em avaliação de modo hierárquico, sendo: I – melhores tolerantes ao estresse hídrico e térmico; II – melhores produtores de EPS; III – Produtores de sideróforos e fixadores de N. Essa seleção resultou em 15 isolados que atendem a categoria I. Desse total, 12 foram avaliados com +++ e três com ++ para a produção de EPS (II) e entre eles, cinco são fixadores biológicos de nitrogênio e seis são produtores de sideróforos (categoria III).

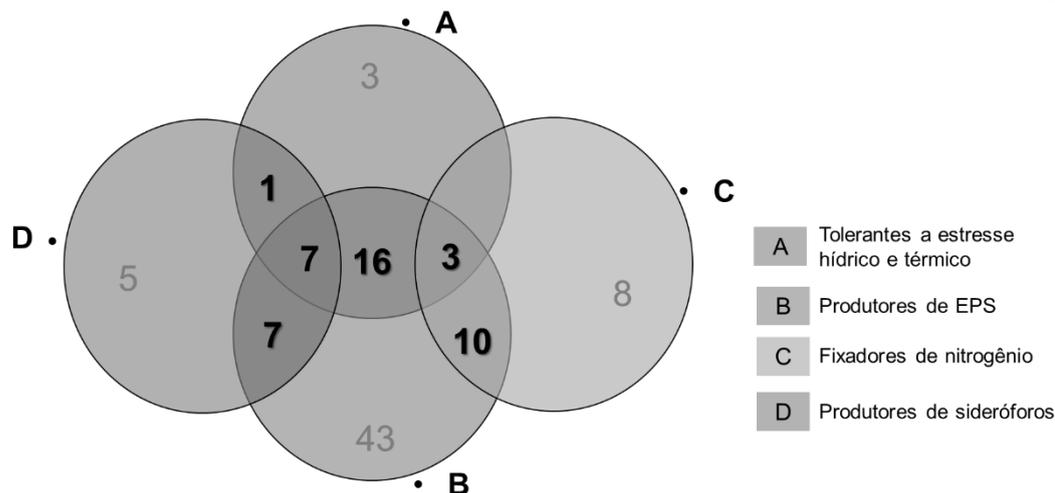


Figura 1 – Diagrama dos isolados que testaram positivo para os testes bioquímico.

Os testes de solubilização de potássio e fosfato utilizaram a escala do índice de solubilização (IS), que calcula a razão entre halo de solubilização e o diâmetro da colônia. As avaliações indicaram que dois isolados solubilizam potássio por apresentar halos claros ao redor das colônias em meio Aleksandrov enriquecido com Biotita-Xisto (ABX) e Feldspato rosa (AFR). Ambos os isolados foram classificados com capacidade de baixa solubilização ($IS < 2$), foram eles Bac 8 ($IS_{ABX} = 1,1$; $IS_{AFR} = 1,3$) e Bac 11 ($IS_{ABX} = 1,2$; $IS_{AFR} = 1,2$). Em relação a solubilização de fosfato, todos os isolados apresentaram baixa solubilização, com destaque para três isolados, Bac 5 ($IS = 1,9$), Bac 11 ($IS = 1,9$) e Bac 14 ($IS = 1,8$).

Em relação a produção de auxinas, os isolados Bac 9 e Bac 5 apresentaram mudança de coloração pelo reagente Salkowski, ambos testaram positivo para a produção de ácido indol-acético (AIA), o primeiro com mudança acentuada para coloração rosácea e o segundo com coloração sutil.

A avaliação do potencial de controle biológico em teste de pareamento direto com *Foc* apresentou inibição no crescimento micelial em todos os isolados em diferentes percentuais de 21% a 61% (Tabela 1), com destaque para Bac 1 (PICM= 59,7), Bac 3 (PICM= 60,5), Bac 7 (PICM= 61,3), Bac 14 (PICM= 60). Ao comparar o pareamento direto entre as bactérias com *Foc* e com *T. asperellum*, os isolados que se destacaram foram Bac 8 (PICM= 56,9), Bac 12 (PICM= 53,0), Bac 15 (PICM= 57,5) e não apresentar nenhum percentual de inibição ao *T. asperellum* (figura 2). Esses índices são extremamente satisfatórios, pois os isolados bacterianos foram capazes de ter

uma significativa atividade antagonista a *Foc* e com possibilidade de uso combinado com o *T. asperellum* por não haver inibição.

Tabela 1 – Percentual de inibição de crescimento micelial dos isolados bacterianos em relação ao *Foc* e ao *T. asperellum*

Isolados antagonistas	Fungos pareados	
	PICM - <i>Foc</i>	PICM - <i>T. asperellum</i>
Bac 1	59,7 a*	53,9 a
Bac 2	57,2 a	47,8 a
Bac 3	60,5 a	49,4 a
Bac 4	53,3 a	48,9 a
Bac 5	26,4 b	44,4 a
Bac 6	23,2 b	38,3 b
Bac 7	61,3 a	48,8 a
Bac 8	56,9 a	0 c
Bac 9	56,1 a	46,6 a
Bac 10	20,5 b	0 c
Bac 11	56,9 a	32,7 b
Bac 12	53,0 a	0 c
Bac 13	53,9 a	47,7 a
Bac 14	60,0 a	45,5 a
Bac 15	57,5 a	0 c
CV %	18,35	14,29

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

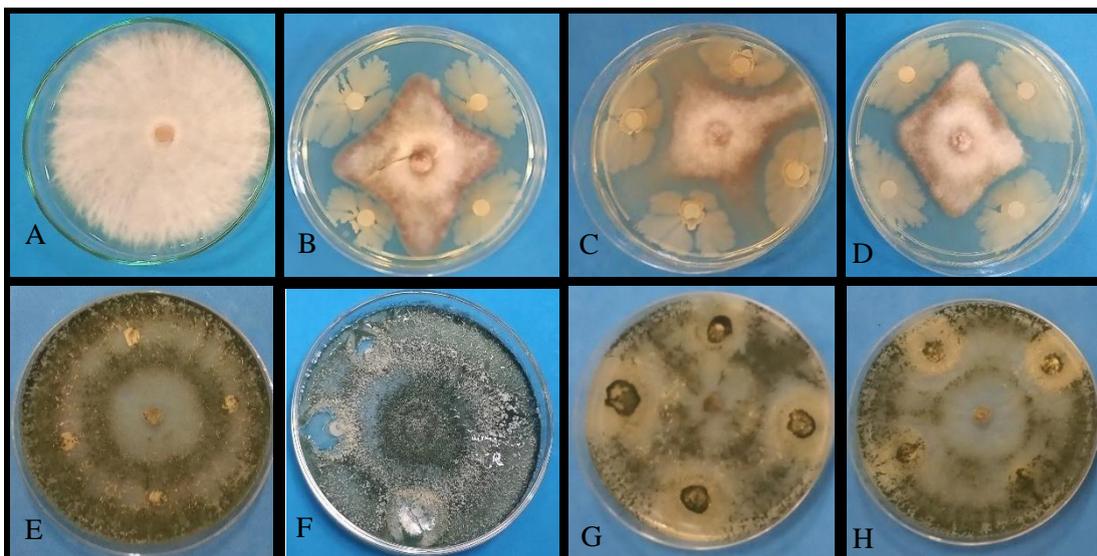


Figura 2 - Teste de pareamento direto isolados bacterianos com *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* e *T. asperellum*. A- Tratamento controle *Foc*; B- Bac 8 PCIM = 56,9; C- Bac 12= 53; D - Bac 15 PCIM= 57,5; E- Tratamento controle *T. asperellum*; F, G, H – PICM = 0.

O teste de controle biológico por compostos voláteis não apresentou inibição do crescimento de *Foc*, ou seja, todas as placas pareadas tiveram crescimento micelial igual ao controle. Porém, o teste de compostos não-voláteis apresentou inibição do crescimento até o oitavo dia de incubação, após o qual a capacidade de crescimento do fungo foi superior a quantidade de metabólitos presente nos discos umedecidos e aos doze dias de avaliação todas as placas igualaram o crescimento do controle. Em relação ao teste de antibiose recíproca, verificou-se que há compatibilidade entre as 15 bactérias testadas com diferentes possibilidades de combinação. Desses resultados, destaca-se as bactérias compatíveis com outros 11 isolados (Bac 1, Bac 2 e Bac 10) e a que é compatível com todos (Bac 6).

3. Discussão

Os microrganismos edáficos desempenham diversas atividades bioquímicas, algumas de extrema importância para agricultura. Para este estudo destacam-se os mecanismos de tolerância a seca, como a produção de exopolissacarídeos (EPS), a capacidade antagonística pela produção de metabólitos antimicrobianos ou competição (produção de sideróforos) e promoção de crescimento vegetal (solubilização de fósforo e potássio, fixação de nitrogênio e produção de ácido indol-acético).

Sobre os microrganismos com capacidade de produzir exopolissacarídeos, sua síntese pode ocasionar constituição de biofilme, que consiste na formação de aglomerado de populações microbianas (Casán et al. 2013). A presença do biofilme na rizosfera favorece a aderência a superfícies, tanto de colonização de outros microrganismos, quanto acúmulo e fixação de nutrientes e minerais, retenção de água e proteção da planta contra estresse hídrico, salinidade e variação térmica. Além disso, a formação ou acúmulo de EPS possui tendência de aumento proporcional quando o estresse ambiental é acentuado, aspecto que torna as bactérias produtoras de biopolímeros potenciais agentes de promoção a tolerância à seca (Santos & Esposito 2014).

A produção de sideróforos configura como importante agente de competição por nutrientes pela capacidade de produção de moléculas quelantes de ferro que, em ambientes com baixa disponibilidade desse elemento no solo, inibem o crescimento de microrganismos dependentes de ferro, incluindo fitopatógenos. (Beneduzi et al 2012). Ademais, a disponibilidade de ferro é importante para o desenvolvimento vegetal, pois o elemento é cofator para várias enzimas, incluindo a nitrogenase que realiza o processo de fixação biológica de nitrogênio.

Para o manejo nutricional, a presença de bactérias que disponibilizem macronutrientes (nitrogênio, potássio e fósforo) representa uma alternativa para a substituição progressiva dos fertilizantes industriais. Visto que o processo de produção desses fertilizantes necessita de alto consumo energético de combustíveis fósseis derivados de petróleo, matéria prima que tem batido sucessivos recordes de preço no mercado internacional (DNPM, 2015).

Sobre a fixação biológica de nitrogênio (N), vale ressaltar que essa atividade microbiana possui grande relevância na agricultura, pois esse N é o elemento mais absorvido pela bananeira depois do potássio, e é necessário para a planta desde a fase vegetativa até o momento da emissão do cacho (Machado et al. 2012). No caso das bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico de vida livre, possuem outra vantagem por ter a possibilidade de inoculação em culturas que não nodulam, como ocorre com a bananicultura (Schultz et al., 2012).

A produção nacional de fertilizantes potássicos é considerada insuficiente por atenderem cerca de 10 % da demanda agrícola. Nesta perspectiva, a

obtenção de microrganismos capazes de solubilizar potássio (K) apresenta possibilidade para desenvolvimento de um produto biotecnológico vantajoso para potencializar a produção de banana (DNPM, 2015). Visto que o potássio representa o macronutriente com maior relevância para a bananicultura, mesmo sem participar diretamente da estrutura da planta, atua na translocação de fotossintatos, no balanço hídrico e tem relação direta com a qualidade dos frutos. Além destas funções, o K⁺ atua na ativação enzimática e no processo de absorção iônica e algumas enzimas são dependentes do K para sua atividade normal, citando-se as sintetases, oxiredutases, desidrogenases, transferases e quinases. Logo, a nutrição potássica também está ligada à regulação do potencial osmótico das células das plantas, da expansão celular e a abertura e fechamento dos estômatos (Ganeshamurthy et al. 2011).

No que se refere à fertilização com fósforo inorgânico (P), para a bananeira é indicada sua aplicação na cova de plantio, pois o P é um elemento praticamente imóvel no solo e a maior parte das reservas é não-lábil, ou seja, quimicamente estável e indisponível para as plantas. Sendo assim, a utilização dos microrganismos solubilizadores de P para manejo nutricional da bananeira, mesmo que apresentem baixos índices de solubilização, são vantajosos por disponibilizarem o fósforo de modo constante na região rizosférica. Vale ressaltar que a bananeira não exige grandes quantidades de fósforo, mas é um elemento que atua no desenvolvimento vegetativo e do sistema radicular e sua ausência reduz a produtividade, pois resulta em as plantas apresentarem crescimento atrofiado e raízes pouco desenvolvidas (Moreira et al. 2010).

Em se tratando de promoção de crescimento, a presença de bactérias que são capazes de sintetizar auxinas, particularmente o ácido indol-acético (AIA), são importantes no aumento da produção por atuar como um regulador do crescimento das raízes e caules através do alongamento celular. Também, ocorre o aumento do número de pelos radiculares, melhorando a absorção de água e potencializando o efeito do manejo nutricional (Pereira et al., 2012).

Além dos aspectos supracitados, os isolados que também apresentam atividade de controle biológico de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* (*Foc*) apresentam-se como promissores produtos biotecnológicos por agrupar mais de uma atividade benéfica a bananicultura. Ademais, a compatibilidade das bactérias deste estudo com o *T. asperellum* indica possibilidade de uso com a

combinação dos efeitos de promoção a tolerância ao estresse hídrico, controle biológico e promoção de crescimento (Kahn et al. 2017, Haddad et al. 2018). Afinal, várias espécies de *Trichoderma* sp. já possuem relatos de redução efetiva nas doenças da bananeira, benefícios na promoção de crescimento em mudas de bananeira e seu potencial de mecanismos de biocontrole (Martínez-Medina et al. 2014, Atanasova et al. 2013, Moreira et al. 2021).

Visto isso, cada cepa bacteriana tem potencial para ser utilizado, de modo combinado, explorando seus diferentes mecanismos de ação, inclusive com *T. asperellum*, para atender às diferentes necessidades das cultivares de bananeira. Para variedades suscetíveis a murcha de *Fusarium*, como 'Prata Anã', foca-se no uso de microrganismos que apresentem atividades de controle biológico. No caso de variedades resistentes para a murcha de *Fusarium*, como Nanica, o modo de utilização das bactérias pode ser direcionado ao manejo nutricional, por apresentarem atividades de promoção de crescimento vegetal direto, como fixação de nitrogênio e solubilização de fosfato e produção de AIA.

4. Conclusões

Os isolados bacterianos selecionados apresentaram potencial de utilização para mitigar os efeitos do escassez de água, devido a capacidade de tolerância ao estresse hídrico, térmico e capacidade de produzir EPS. Essas bactérias tem possibilidade de uso no manejo nutricional pela presença de atividade de fixação de nitrogênio, solubilização de fosfato e potássio. Além disso, a atividade de síntese ácido indol-acético agrega mais importância por atuar na promoção de crescimento vegetal.

As bactérias selecionadas são potenciais agentes de biocontrole pela capacidade de produção de sideróforos que é um mecanismo de competição, e pelo antagonismo direto, demonstrado pelo controle satisfatório do crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense in vitro*. Essas atividades benéficas a bananicultura são potencializadas devido à compatibilidade dos isolados bacterianos entre si e com o *T. asperellum*.

5. Referências

- 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*, 2013; v. 14, p.121.
- Beneduzi, A.; Ambrosini, A.; Passaglia, L.; M.P. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genet. Mol. Biol.* 2012.vol.35, n.4.
- Berraqueiro, F.R.; Baya, A.M.; Cormenzana, A.R. Establecimiento de índices para el estudio de la solubilización de fosfatos por bacterias del suelo. *ARS Pharmaceutica*, Granada, 1976; v.17, p.399-406.
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Raça 4 tropical de Fusarium oxysporum f.sp. cubense*: subsídios para caracterização de praga quarentenária ausente. 2018.
- Caballero, H.; Pocasangre, E.; Casanoves, F.; Avelino, J.; Tapia, F.; Ortiz, J.L. Use of endophytic insulation of *Trichoderma* spp., for biocontrol of Panama disease (*Fusarium oxysporum* f. sp. cubense) race 1, in vitro plants of banana, Gros Michel variety (AAA) under greenhouse. *La Calera*, 2013; v. 13, n. 20, p. 16-23.
- Casán, F.; Vanderleyden, J.; Spaepen, S. Physiological and agronomical aspects of phytohormone production by model plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) belonging to the genus *Azospirillum*. *Journal of Plant Growth Regulator*, 2013; n.3, p.440-459.
- Dean, R. et al. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 2012; v.13, p. 414–430.
- Dimkpa, C.; Weinand, T.; Asch, F. Plant-rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions. *Plant, Cell and Environment*, Malden, 2009; v. 32, p. 1682-1694.
- Döbereiner, J.; Baldani, V.L.D.; Baldani, J.I. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas. *Embrapa*, 1995.

- Ferreira, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia (UFLA)*, 2011; v. 35, n.6, p. 1039-1042.
- Ganeshamurthy, N.; Satisha, G.; Prakash Patil, P. Potassium Nutrition on yield and quality of fruit crops with special emphasis on banana and grapes. *Karnataka Journal of Agricultural Science*, 2011; v.24, n.1, p.29-38.
- Glick, BR. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological Research*, 2014; 169: 30– 39.
- Guimarães, D.P.; Costa, F.; Rodrigues, M.J.; Maugeri, F. Optimization of dextran synthesis and acid hydrolysis by surface response analysis. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 1999; n. 2, p. 129-139.
- Haddad, F.; Rocha, L.S.; Soares, A.C.F.; Martins, I.P.S.; Teixeira, L.A.J; Staver, C.; Dita, M. Management of *Fusarium* wilt of bananas in Minas Gerais, Brazil. *Acta Horticulturae*, 2018; v. 1, p. 137-146.
- IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Indicadores. *Produção Agrícola Municipal*, 2019, v. 46, p.1-8.
- Khalid, A.; Arsha, M.; Zahir, Z.A. Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. *Journal of Applied Microbiology*. 2004; v. 96, n. 3, p. 473-480.
- King, E. O.; Ward, M. K.; Raney, D. E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *J. Lab. Clin. and Med.* 1954; ed. 44, 301-307.
- Lamichhane J. R.; Varvaro L. A new medium for the detection of fluorescent pigment production by pseudomonads. *Plant Pathology*, 2013; 62, 624–632.
- Lisar, S. Y. S.; Motafakkerazad, R.; Hossain, M. M.; Rahman, I. M. M. *Water stress in plants: causes, effects and responses*. Rijeka: Intech Europe, 2012.
- Machado, D. F. M.; Parzianello, F. R.; Silva, A. C. F.; Antonioli, Z. I. *Trichoderma* no Brasil: o fungo e o bioagente. *Revista de Ciências Agrárias*, 2012; v. 35, n. 1, p. 274-288.
- 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*, 2014; v. 40, n. 7, p. 804-815.
- Moreira, A.N.; Moreira, A.S.; Dia, P.S.; Vendruscolo, C. T. comportamento reológico e composição química do biopolímero da bactéria *Beijerinckia* sp. 7070 produzido por via enzimática. *Brazilian Journal. Food Technology*, 2005; v.8, p.135-142.
- Moreira, F. M.; Cairo, P. A. R.; Borges, A. L. ; Silva, L. D. D. ; Haddad, F. . 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*, 2021; v. 137, p. 249-256.
- Menten, J. O. M.; Minussi, C. C.; Castro, C.; Kimati, H. Efeito de alguns fungicidas no crescimento micelial de *Macrophomina phaseolina* (Tass.) Goid. "in vitro". *Fitopatologia Brasileira*, 1976; n. 2, p. 57-66.
- Nautiyal, C.S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 1999; v. 170, p. 265-270.
- Paulo, E.M. Encapsulamento de *Lactobacillus acidophilus* por atomização em spray drying, utilizando exopolissacarídeos (EPS) produzidos por bactérias lácticas. 222p. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2010.
- Pereira, A. P. A.; Silva, M. C. B.; Oliveira, J. R. S.; Ramos, A. P. S.; Freire, M. B. G. S.; Freire, F. J.; Kuklinsky-Sobral. Influência da salinidade sobre o crescimento e a produção de ácido indol acético de *Burkholderia* spp. Endofíticas de cana-de-açúcar. *Bioscience Journal*, Uberlândia, 2012;v. 28, Supplement1, p. 112-121.
- Ploetz, R. C. *Fusarium* wilt of banana. *Phytopathology*, 2015; v. 105, n. 12, p. 1512-1521.
- Ramos, A. G. O.; Donato, S. L. R.; Arantes, A. de M.; Coelho Filho, M. A.; Rodrigues, M. G. V. Evaluation of gas exchanges and production of genotypes

of Maçã banana type cultivated in the semi-arid region of Bahia. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 2018; n. 3, e-500.

Romeiro, R. S. Controle biológico de doenças de plantas: procedimentos. 127p. UFV, 2007.

Santoyo, G.; Moreno-Hagelsieb, G.; Orozco-Mosqueda, M.D.C.; Glick, C. B.R. Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiol Res*, 2016; ed. 183: 92-99.

Santos, A. F. J.; Esposito E. Interação entre micro-organismos x biotecnologia sócio-ambiental. In: Políticas públicas: estudos e casos. Org. Cianciarullo, T. I.; Panhoca, I.; Bonini, L. M. M. 2014; 1 ed. 680 p.

Schultz, N.; Silva, J.A. da; Sousa, J.S.; Monteiro, R.C.; Oliveira, R.P.; Chaves, V.A.; Pereira, W.; Silva, M.F. da; Reis, V.M.; Urquiaga, S. Inoculation of sugarcane with diazotrophic bacteria. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 2014; v.38, p.359-371.

Silva Filho, G.N.; Vidor, C. Solubilização de fosfato por microrganismos na presença de fontes de carbono. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 2000; v.24, p.311-319.

Silva, J. T. A.; Borges, A. L.; Carvalho, J. G.; Damasceno, J. E. A. Adubação com potássio e nitrogênio em três ciclos de produção da bananeira Prata Anã. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 2003; .v.25, p.152-155.