



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA**

ALANA MARA CASTRO BARBOSA

**ANTIBIOSE E CONSÓRCIO DE CEPAS DE *Bacillus* CONTRA ISOLADOS DE
Fusarium oxysporum f. sp. *cubense***

FORTALEZA

2025

ALANA MARA CASTRO BARBOSA

Antibiose e consórcio de cepas de *Bacillus* contra isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao
Curso de Bacharelado em Biotecnologia da
Universidade Federal do Ceará, como requisito
parcial à obtenção do título de Biotecnologista.

Orientador: Prof. Dra. Christiana de Fátima Bruce
da Silva.

FORTALEZA

2025

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

B195a Barbosa, Alana Mara Castro.

Antibiose e consórcio de cepas de *Bacillus* contra isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* /
Alana Mara Castro Barbosa. – 2025.
42 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências,
Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2025.

Orientação: Prof. Dr. Christiana de Fátima Bruce da Silva.

1. Controle biológico. 2. Antibiose, . 3. Consórcio bacteriano. I. Título.

CDD 661

ALANA MARA CASTRO BARBOSA

Antibiose e consórcio de cepas de *Bacillus* contra isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao
Curso de Bacharelado em Biotecnologia da
Universidade Federal do Ceará, como requisito
parcial à obtenção do título de Biotecnologista.

Aprovada em: 27/02/2025.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Christiana de Fátima Bruce da Silva (Orientadora)
Embrapa Agroindústria Tropical (EMBRAPA)

Prof. Dr. Humberto Henrique de Carvalho
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. Amarildo Lima da Silva Junior
Embrapa Agroindústria Tropical (EMBRAPA)

Dedico este trabalho aos meus pais, Mara e Alan,
que sob muito sol, me fizeram chegar até aqui,
pela sombra.

AGRADECIMENTOS

À toda a minha família, especialmente aos meus pais Mara e Alan, que sempre fizeram de tudo para me dar todo o suporte para chegar cada vez mais longe. Amo vocês mais que tudo.

Aos meus irmãos Phillippe, Thaynara e Alan Filho, que são partes integrais de mim. Aos meus avós, seu Raimundo e dona Aparecida, que ajudaram a me criar e sempre me deram muito amor. À minha tia Cyntia, que sempre esteve presente em todos os momentos da minha vida e a todos aqueles familiares que de uma forma ou de outra me engrandeceram.

À Universidade Federal do Ceará, que me proporcionou momentos inesquecíveis e me abriu portas para o futuro e a todos os movimentos sociais que lutaram décadas a fio para que a educação fosse para todos. Fui contemplada.

À minha escola do coração, EEM Adauto Bezerra, que para além de me ensinar o beabá para chegar a uma universidade federal, também me ensinou a ser gente e enxergar o mundo por uma ótica com diversidade.

À Embrapa Agroindústria Tropical, por todo o apoio, suporte e aprendizado em todos esses anos de trabalho.

Ao CNPq, pela concessão das bolsas possibilitando que eu pudesse me dedicar aos estudos e à pesquisa.

À Prof. Dra. Christiana Bruce, pela confiança, disponibilidade, parceira e excelente orientação durante todos esses anos.

À equipe do laboratório de Fitopatologia e Microbiologia dos Solos, em especial a Ma. Regimara, a Laryssa, Samara, ao Andrew e Milton, pelo tempo, assistência e apoio durante a realização do projeto.

A todos os meus amigos de graduação, que para além disso, são amigos de vida. Em especial Laryssa, que foi minha parceira durante todos esses anos na Embrapa e fez os dias serem mais alegres; Ana Carolina, que me mostrou vida e música através de outras óticas e me ajudou a passar por esse processo de forma mais leve e Gui Lobo, por todas as risadas, fofocas e parcerias no vôlei. Amo todos vocês.

As minhas amigas Ana Livia, Thaís, Raynara e Maju, vocês foram essenciais para minha chegada até aqui. Foram e são meu suporte para enxergar a vida com mais leveza e amor. Obrigada sempre, por tudo. Amo cada uma de vocês.

Aos meus amigos Fabio, Hidel e a todos do grupo Tricoloucos, que são meus parceiros de bancada para torcer pelo Leão, graças a vocês pude manter o bom humor e a simpatia até nos momentos mais difíceis. À Aylana, pelo amor, pelas risadas e pela parceria nos últimos meses dessa grande empreitada.

“Não, eu não sou do lugar dos esquecidos,
não sou da nação dos condenados,
não sou do sertão dos ofendidos,
você sabe bem: conheço o meu lugar.”

Belchior

RESUMO

A banana é uma das frutas mais consumidas no mundo, possuindo uma enorme importância alimentícia e econômica. No entanto, durante seu ciclo a bananicultura é afetada por diversas doenças, destacando-se o mal do Panamá, uma das maiores ameaças mundiais à cultura da banana, causado pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc). Alternativas sustentáveis, como o uso de agentes de controle biológico têm sido buscadas para conter o fitopatógeno. Dentre os microrganismos empregados no estudo do controle desses patógenos, as bactérias do gênero *Bacillus* se destacam. Diante disso, neste trabalho, objetivou-se avaliar a antibiose e o consórcio de cepas pertencentes ao gênero *Bacillus* contra isolados de Foc a fim de viabilizar estudos *in vivo* para uso de misturas bacterianas para o controle do mal do Panamá. Para tal, trinta e um isolados de *Bacillus* foram submetidos ao teste de antibiose contra dois isolados fúngicos do patógeno: RFB65 e RFB86, para a avaliação de atividade antagonista. Posteriormente, dentre as trinta e uma cepas bacterianas, sete foram selecionadas com base na sua capacidade de inibição do crescimento fúngico para testes de compatibilidade *in vitro*. Todas as cepas bacterianas demonstraram potencial para inibir o crescimento micelial dos isolados fúngicos, quando comparadas com o tratamento controle. Entretanto, as cepas LPPC259, LPPC266, LPPC283 e LPPC265 destacaram-se apresentando as maiores porcentagens de inibição, com, respectivamente, 77,41%, 73,40%, 66,24% e 61,92% contra o isolado RFB65. Em relação ao isolado RFB86, a inibição para LPPC283 foi de 79,40% e para LPPC259 foi 75,67%, enquanto para as cepas LPPC265 e LPPC266 foi de 70,40% e 67,93%, respectivamente. Cinco das sete cepas testadas em ensaio de compatibilidade *in vitro* mostraram ausência de halos indicando serem compatíveis. Conclui-se que as cepas de *Bacillus* inibiram o crescimento micelial *in vitro* dos isolados de Foc e demonstraram ser compatíveis entre si para uso futuro em estudos *in vivo* no controle do mal do Panamá em bananeiras.

Palavras-chave: Controle biológico; antibiose, consórcio bacteriano.

ABSTRACT

The banana is one of the most consumed fruits in the world, with enormous nutritional and economic importance. However, during its cycle, banana cultivation is affected by various diseases, with Panama disease standing out as one of the greatest global threats to banana crops. This disease is caused by the fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc). Sustainable alternatives, such as the use of biological control agents, have been explored to contain this phytopathogen. Among the microorganisms used in studies on pathogen control, bacteria of the *Bacillus* genus stand out. In this study, the objective was to evaluate the antibiosis and consortium of *Bacillus* strains against *Foc* isolates to enable *in vivo* studies on the use of bacterial mixtures for the control of Panama disease. To this end, thirty-one *Bacillus* isolates were subjected to antibiosis testing against two fungal isolates of the pathogen, RFB65 and RFB86, to assess their antagonistic activity. Subsequently, among the thirty-one bacterial strains, seven were selected based on their ability to inhibit fungal growth for *in vitro* compatibility tests. All bacterial strains demonstrated potential to inhibit the mycelial growth of fungal isolates when compared to the control treatment. However, strains LPPC259, LPPC266, LPPC283, and LPPC265 stood out, showing the highest inhibition percentages, with 77.41%, 73.40%, 66.24%, and 61.92% against isolate RFB65, respectively. Regarding isolate RFB86, the inhibition percentages were 79.40% for LPPC283 and 75.67% for LPPC259, while LPPC265 and LPPC266 showed inhibition rates of 70.40% and 67.93%, respectively. Five of the seven strains tested in the *in vitro* compatibility assay showed no halos, indicating they are compatible. It was concluded that *Bacillus* strains inhibited the *in vitro* mycelial growth of *Foc* isolates and demonstrated compatibility with each other for future use in *in vivo* studies on the control of Panama disease in banana plants.

Keywords: Biological control; antibiosis, bacterial consortium.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
2.1 Aspectos botânicos, alimentícios e econômicos da banana.....	17
2.2 Mal do Panamá e seu fitopatógeno.....	17
2.3 Sintomatologia do mal do Panamá.....	18
2.4 Controle biológico do mal do Panamá.....	19
2.5 Uso de <i>Bacillus</i> no controle biológico do mal do Panamá.....	20
2.6 Consórcio de microrganismos para uso em biodefensivos.....	20
3. OBJETIVOS.....	22
3.1 Objetivos Gerais.....	22
3.2 Objetivos Específicos.....	22
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
4.1 Origem dos isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	23
4.2 Origem das cepas de <i>Bacillus</i>	24
4.3 Preparo dos isolados de Foc e <i>Bacillus</i> para o teste de antagonismo.....	24
4.4 Efeito de cepas de <i>Bacillus</i> no crescimento micelial de isolados de Foc.....	25
4.5 Avaliação da inibição do crescimento micelial de Foc.....	26
4.6 Delineamento experimental do teste antagônico.....	26
4.7 Preparo dos inóculos para o teste de compatibilidade.....	26
4.8 Teste de compatibilidade <i>in vitro</i> entre cepas de <i>Bacillus</i>	27
4.9 Delineamento experimental do teste de compatibilidade bacteriana.....	27
4.10 Avaliação do teste de compatibilidade <i>in vitro</i> de cepas de <i>Bacillus</i>	27
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
5.1 Efeito de cepas de <i>Bacillus</i> no crescimento micelial de isolados de Foc.....	28
5.2 Compatibilidade <i>in vitro</i> entre isolados de <i>Bacillus</i>	38
6. CONCLUSÕES.....	42
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43

1. INTRODUÇÃO

A banana, uma das frutas *in natura* mais consumidas do mundo, tem enorme potencial econômico e alimentício. A nível mundial, a banana ocupa o segundo lugar no ranking de produção e consumo, representando juntamente com arroz, trigo e milho as fontes alimentares mais importantes (Ferreira *et al.*, 2016). No Brasil, a banana é o sétimo cultivo no ranking do valor bruto da produção agropecuária. Essa cultura é cultivada em todos os estados da federação e o seu sistema de produção é diversificado, com o uso de diferentes cultivares, sendo a produção destinada, majoritariamente, para o mercado interno (Donato *et al.*, 2021). Entretanto, esse cultivo enfrenta desafios que comprometem sua produtividade, especialmente devido a doenças (Bettoli *et al.*, 2009).

As doenças que acometem as bananeiras podem ser causadas por diversos fitopatógenos, como fungos, vírus, nematoides e bactérias. Esses agentes afetam diferentes partes da planta, como raízes, rizoma, sistema vascular, folhas e frutos, prejudicando diretamente a produção (Gasparotto *et al.*, 2020). Dentre as principais doenças fúngicas que impactam a bananicultura, temos a murcha de *Fusarium* ou mal do Panamá (Donato *et al.*, 2021).

O mal do Panamá é atualmente a maior ameaça à bananicultura mundial, sendo ocasionada por um patógeno de solo que produz estruturas de resistência, denominada clámidósporos, os quais podem permanecer viáveis no solo por até 30 anos, mesmo na ausência de hospedeiros. O patógeno é do complexo de fungos *Fusarium oxysporum*, identificadas por sua morfologia e patogenicidade como *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc), como mostra W.C. Snyder & H.N. Hansen (Maryani *et al.*, 2019). Um dos métodos de controle para essa doença é o uso de fungicidas, através de controle químico. Entretanto, o uso desses produtos é prejudicial ao ambiente e pode aumentar os custos para o produtor, além de pouco efetivos. Mediante a isto, pesquisas relacionadas ao controle biológico mostraram-se promissores como alternativa sustentável para reduzir os impactos da doença (Ploetz, 2015).

O controle biológico consiste na utilização de microrganismos que desempenham um papel antagonista contra os fitopatógenos, promovendo a redução total ou parcial de sua população. No Brasil, estudos sobre o biocontrole são realizados desde a década de 50, com avanços significativos a partir dos anos 2000. Bactérias do gênero *Bacillus* se destacam entre os microrganismos empregados nesse tipo de controle. Pesquisas realizadas por Rodríguez *et al.* (2017) e Alves (2017) mostraram que cepas de *Bacillus* utilizadas em experimentos *in vitro* foram eficientes em reduzir

o crescimento micelial do isolado de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, indicando o potencial antagonista desses microrganismos. Além disso, estudos avaliados por Santos *et al.* (2021) mostraram a possibilidade da produção de um biodefensivo à base de misturas de cepas de *Bacillus* através de testes de compatibilidade *in vitro* como forma de reduzir biologicamente a antracnose em frutos de mamão, uma das diversas doenças de plantas.

Desse modo, pensando em alternativas sustentáveis para o controle do mal do Panamá, este trabalho teve como objetivo verificar, *in vitro*, a antibiose e o consórcio de *Bacillus* contra isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aspectos botânicos, alimentícios e econômicos da banana

A bananeira (*Musa spp.*) é uma planta típica de regiões tropicais úmidas, cujo cultivo é altamente influenciado por fatores como temperatura e umidade. As condições ideais incluem temperaturas entre 26 e 28 °C e umidade relativa superior a 80%. Além disso, a exposição à alta luminosidade e ventos com velocidade inferior a 40 km/h favorecem seu crescimento (Matos *et al.*, 2019).

O fruto da bananeira, a banana, é uma das frutas mais consumidas pela população em todo o Brasil devido ao preço acessível, facilidade e versatilidade de consumo e pelo seu enorme valor nutricional. Esta fruta contém diversas vitaminas como tiamina, piridoxina, niacina, C e riboflavina, além de sais minerais como potássio, fósforo, cálcio, sódio e magnésio (Bianchi, 2010; Rocha *et al.*, 2021).

A bananicultura no Brasil tem números expressivos que demonstram a sua importância no agronegócio. A produção brasileira no ano de 2023 foi de 6,82 milhões de toneladas produzidas e um valor de produção aproximado em R\$13.808.363 (IBGE, 2024). Este cultivo abrange todo o território brasileiro, tendo o Sudeste como destaque com a produção de 2,31 milhões de toneladas e o Nordeste logo em seguida com 2,28 milhões de toneladas produzidas (IBGE, 2023).

O estado do Ceará destaca-se como o oitavo maior produtor do país, tendo uma safra de 421.320 mil toneladas em 2023 e o terceiro maior do Nordeste, ficando atrás apenas da Bahia e de Pernambuco (IBGE, 2024). Os municípios do Ceará que mais produzem são Barbalha e Missão Velha devido a sua enorme expansão de área cultivada. (Oliveira *et al.*, 2019).

2.2 Mal do Panamá e seu fitopatógeno

Também conhecido como murcha do *Fusarium* ou fusariose da bananeira, o mal do Panamá é uma das maiores ameaças à cultura da banana em todo o mundo. Acredita-se que o primeiro caso da doença tenha sido por volta de 1874, no sudeste de Queensland, Austrália, atacando a cultivar Maçã. Prejuízos significativos foram relatados no Panamá, em 1904, onde em um período de 50 anos, mais de 40.000 hectares de terras cultivadas com bananas foram abandonados devido à doença, em toda a América Central e do Sul, sendo essa a provável razão do nome mal do Panamá (Embrapa, 2021).

A doença foi registrada, pela primeira vez no Brasil, em Piracicaba, no ano de 1930, afetando as variedades Maçã, Prata e Ouro. Estas variedades são suscetíveis ao fungo, o que levou à inviabilidade da produção na região (Amorim *et al.*, 2018).

O mal do Panamá é a principal doença associada à cultura da banana, podendo causar perdas consideráveis, senão for manejada. O agente causal da doença é o fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, que se divide em 3 raças que afetam as bananeiras: raça 1, 2 e 4, onde a 4 é subdividida em ST4 e TR4 (Gasparotto *et al.*, 2020). A TR4 é a variante mais recente e mais agressiva do fitopatógeno, atacando todo o subgrupo da cultivar Cavendish (além das cultivares resistentes à raça 1 e 2), uma das mais cultivadas e consumidas em todo o mundo (Cordeiro *et al.*, 2016). Existem relatos dessa variante em todos os continentes, entretanto, no continente americano, apenas um relato foi realizado, na Colômbia (Promusa, 2020). Ainda não há relatos dessa variante em terras brasileiras (Gasparotto *et al.*, 2020).

O Foc é um patógeno do solo com grande capacidade de sobrevivência, mesmo na ausência do hospedeiro, devido à formação de estruturas de resistência: os clámidósporos. Estas estruturas conseguem adaptar-se as condições ambientais adversas e podem permanecer viáveis no solo por mais de 30 anos (Stover, 1962). A infecção inicia-se quando o patógeno reage de forma compatível com as raízes da planta, reconhecendo exsudatos radiculares liberados por ela (LI *et al.*, 2013). Ao penetrar nas raízes, o fungo começa a colonizar o tecido da planta, liberando toxinas e invadindo vasos adjacentes. O processo progride até afetar todo o sistema vascular da planta, levando ao seu comprometimento (Stover, 1962; Ploetz, 2005).

2.3 Sintomatologia do mal do Panamá

Por ser uma doença vascular, o mal do Panamá pode atingir todas as partes da planta. É possível observar visivelmente os sintomas externos e internos da doença. Os sintomas externos incluem o amarelecimento das folhas mais velhas progredindo para as folhas mais jovens e por consequência a murcha de folhas e brotos (Warman, 2018).

Com o agravamento da doença é possível observar a necrose marginal e queda das folhas, flores e frutos, podendo ocasionar a divisão do pseudocaule. Os sintomas internos são caracterizados pela descoloração dos vasos do xilema, que progridem formando um círculo concêntrico periférico de coloração pardo avermelhada no interior do pseudocaule (Figura 1), que

pode ser observado ao realizar um corte transversal feito no pseudocaule e no rizoma (Amorim *et al.*, 2018; Warman, 2018).

Figura 1: Sintomas típicos do mal do Panamá: presença de áreas necrosadas na parte central do pseudocaule de bananeiras. Fonte: SILVA, C. F. B, 2022.



Legenda: Foto à esquerda – Pseudocaule da bananeira indicando início da infecção de Foc, com indícios de necrose central (mancha preta). Foto à direita – Pseudocaule da bananeira tomada pela infecção de Foc, com necrose central generalizada.

2.4 Controle biológico do mal do Panamá

A crescente demanda dos consumidores por produtos mais saudáveis é um fenômeno cada vez mais evidente na sociedade. Como os agrotóxicos nem sempre proporcionam resultados satisfatórios e duradouros, intensifica-se a busca por uma agricultura mais biológica, sustentável e ambientalmente responsável (Souza, 2013). Existem na literatura diversos trabalhos mostrando a eficácia do uso de microrganismos no controle do mal do Panamá como alternativa sustentável para a redução da severidade doença na cultura da banana (Cook, 1989; Borges, 2007; Coutrim, 2021; Barros, 2022).

Pesquisa realizada por Coutrim *et al.* (2021) concluíram que testes de antagonismo *in vitro* com fungos do gênero *Trichoderma* foram capazes de controlar com eficiência o *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, demonstrando potencial de uso como agente de controle biológico.

Coutrim *et al.* (2021) confrontou os isolados *Trichoderma longibrachiatum* e *Trichoderma harzianum* com Foc. As espécies de *Trichoderma* foram antagônicas ao patógeno, com inibições do crescimento micelial de 71,17% para o *T. longibrachiatum* e 69,74% para *T. harzianum*.

Microrganismos utilizados no manejo biológico utilizam-se de vários mecanismos para eficientemente inibir a ação do fitopatógeno. Os fungos do gênero *Trichoderma* tem como principais mecanismos a ação direta, a degradação, o uso de carboidratos complexos e a capacidade de secreção de metabólitos (Isaias, 2014).

2.5 Uso de *Bacillus* no controle biológico do mal do Panamá

Estudos realizados por Rodríguez *et al.* (2017) e Alves (2017) mostraram que cepas de *Bacillus* testadas em experimento de antagonismo *in vitro* foram eficientes em reduzir o crescimento micelial do isolado *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. Pesquisas mostram que o principal mecanismo de ação dessas bactérias é a antibiose, que consiste na inibição do crescimento dos fitopatógenos através da liberação de metabólitos como lipopeptídeos e enzimas (Freitas, 2017; González *et al.*, 2017; Amorim *et al.*, 2018).

Há registros sobre a produção de enzimas realizada por *Bacillus* que estão envolvidas no processo de antagonismo, como quitinases, lipases, β -1,3-glucanases, quitosanase e outras. Estas possuem a capacidade de degradar as paredes celulares de fungos fitopatogênicos, facilitando o controle por parte dos agentes biológicos (Freitas, 2017; Amorim *et al.*, 2018).

Coutrim *et al.* (2018) demonstraram o antagonismo de *Bacillus* sp. sobre o agente causal do mal do Panamá através de antibiose *in vitro*, intensificando o consórcio de bactérias para o controle biológico do fitopatógeno.

2.6 Consórcio de microrganismos para uso em biodefensivos

Pesquisa realizada por Mafia *et al.* (2007) demonstraram potencial para desenvolver um biodefensivo composto por misturas bacterianas através de ensaios de compatibilidade *in vitro* de cepas de *Bacillus*, observando ausência ou presença de halos de compatibilidade, visando estimular habilidades antagonistas desses isolados e benefícios como promoção de crescimento e intensificação de resistência sistêmica, através da ação de metabólitos liberados na interação agente biológico-fitopatógeno.

De Melo *et al.* (2021) mostram que a inibição causada por *Bacillus* spp., microrganismos amplamente utilizados para consórcio, é realizada por meio de mecanismos como a alta competição por espaço e nutriente para a sobrevivência quando na presença de outro microrganismo e a produção de enzimas que degradam componentes celulares dos fitopatógenos.

Estudo visando efeitos antagônicos de bactérias epifíticas contra fungos do gênero *Colletotrichum* demonstraram a viabilidade da produção de misturas bacterianas para a redução da antracnose em frutos de mamão. O consórcio bacteriano foi selecionado observando a síntese de compostos antimicrobianos, como a quitinase, no qual ocasionou a inibição da germinação de conídios de *Colletotrichum* (Santos, 2021).

Desta forma, a análise do antagonismo entre bactérias do gênero *Bacillus* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* e a compatibilidade *in vitro* entre essas cepas bacterianas é de grande relevância, uma vez que essa abordagem demonstra potencial promissor para o controle biológico do mal do Panamá em culturas de banana.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar a atividade antifúngica e a compatibilidade de cepas de *Bacillus* contra isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc).

3.2 Objetivos Específicos

- Investigar os efeitos de cepas de *Bacillus* no crescimento micelial de isolados de Foc;
- Investigar a compatibilidade *in vitro* entre as cepas de *Bacillus*;
- Selecionar cepas promissoras para uso como biodefensivo à cultura da banana.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os experimentos realizados neste trabalho foram desenvolvidos nos laboratórios de Fitopatologia e Microbiologia dos Solos da Embrapa Agroindústria Tropical, localizada na cidade de Fortaleza/CE no período dos anos de 2023 a 2024.

4.1 Origem dos isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*

Os isolados de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) utilizados neste trabalho foram coletados de pseudocaules de bananeiras acometidas com o mal do Panamá (Tabela 1). Para isso, um corte longitudinal no pseudocaule foi realizado com o auxílio de ferramentas desinfetadas com álcool 70%. Subsequente ao corte, foi retirado um fragmento do pseudocaule com aproximadamente 15cm de altura, 10cm de largura e 3-5 cm de profundidade, evitando a retirada de áreas de avançada decomposição dos tecidos vasculares. A partir desse corte, foi retirado os feixes vasculares e em seguida retirou-se o excesso de umidade dos feixes coletados com o auxílio de papel toalha estéril. O armazenamento dos feixes foi feito em tubos estéreis tipo Falcon (Gasparotto *et al.*, 2020).

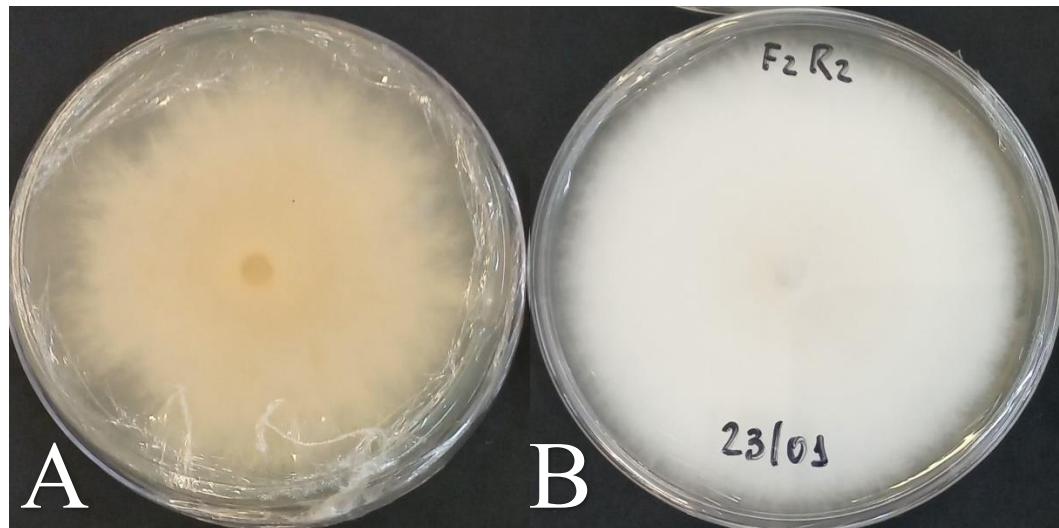
Em laboratório, o material coletado em campo seguiu para uma série de isolamentos afim de se obter uma cultura pura. Com a cultura pura obtida (Figura 2), foi realizada a preservação dos isolados através de tubos rosqueados com água destilada estéril. Vinte discos de micélio de 5 mm foram adicionados em 2 tubos rosqueáveis e mantidos reservados em sala de incubação (Alfenas & Maffia, 2007).

Tabela 1 – Origem dos isolados de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* utilizados no trabalho, coletados de pseudocaules de cultivares Maçã.

<i>Código de coleta</i>	<i>Espécie</i>	<i>Município</i>
<i>RFB65</i>	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	Limoeiro do Norte - CE
<i>RFB86</i>	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	Russas - CE

Fonte: Vieira, 2021.

Figura 2: Placas de Petri contendo colônias puras dos isolados de Foc, RFB65 e RFB86, respectivamente.



Legenda: A – Isolado RFB65; B – Isolado RFB86.

4.2 Origem das cepas de *Bacillus*

Os isolados de *Bacillus* utilizados nesse estudo foram coletados da rizosfera de bananeiras dos interiores dos estados do Ceará e do Rio Grande do Norte. Estas compõem a Coleção de Trabalho do Laboratório de Microbiologia dos Solos da Embrapa Agroindústria Tropical.

4.3 Preparo dos isolados de Foc e *Bacillus* para o teste de antagonismo

As cepas de *Bacillus* estão preservadas em tubos de ensaio contendo meio de cultura Kado & Heskett (1970) inclinado e mantidas sob refrigeração. Os isolados de Foc estão preservados em tubos rosqueáveis com água destilada estéril mantidos a 28°C.

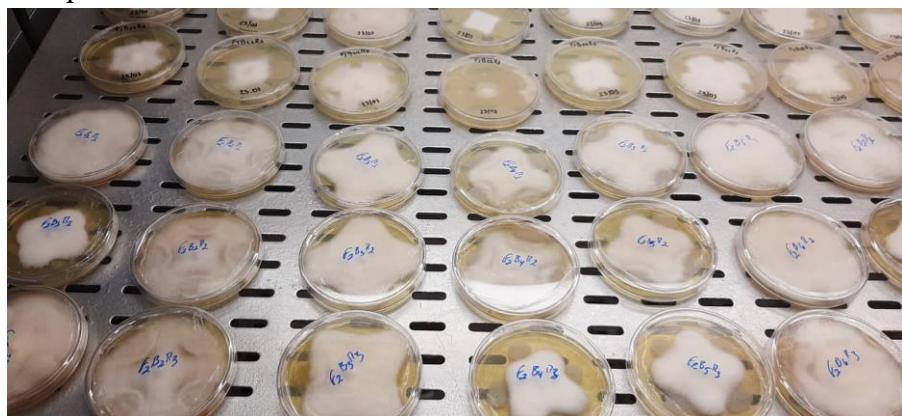
As cepas de *Bacillus* foram ativadas por meio de estriamento simples em placas de Petri de 90 mm de diâmetro, contendo meio de cultura Kado & Heskett (1970) e incubados por 24h em uma temperatura de 28°C com fotoperíodo de 12 horas. Em paralelo, os isolados de Foc foram repicados para placas de Petri de 90 mm de diâmetro contendo meio de cultura BDA a 28°C, com fotoperíodo e 12 horas por 7 dias.

4.4 Efeito de cepas de *Bacillus* no crescimento micelial de isolados de Foc

Para o presente estudo do efeito das cepas de *Bacillus* contra os isolados de Foc, foi utilizada uma adaptação do método de Bharat *et al.* (1980).

As cepas de *Bacillus* foram ativadas em placas de Petri de 90 mm para a montagem do experimento, enquanto os isolados de Foc foram repicados de placas de Petri de 90 mm crescidos por 7 dias, segundo o item 4.3. Inicialmente dois isolados de Foc (RFB65 e RFB86) foram selecionados com base na sua capacidade de expressão dos sintomas do mal do Panamá em plantas mantidas em condições de casa de vegetação, mediante teste de patogenicidade. Posteriormente, um total de 31 cepas de *Bacillus* foram avaliadas quanto a capacidade de inibição do crescimento micelial dos isolados de Foc. Em placas de Petri de 90 mm, contendo meio de cultura Kado & Heskett (1970) foram incubados um disco de micélio de 5 mm no centro da placa. Com auxílio de alça flambada, as cepas bacterianas foram repicadas em quatro pontos equidistantes de 25 mm dos isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. Dessa forma, cada placa de Petri contendo os isolados de Foc e *Bacillus* caracterizou-se em um tratamento e cada tratamento teve três repetições (cada repetição= uma placa). A testemunha consistiu em uma placa de Petri contendo apenas um disco de Foc no mesmo meio que os demais tratamentos. As placas foram levadas à sala de incubação e mantidas a 28 °C em fotoperíodo de 12 h durante um período de 7 dias (Figura 3).

Figura 3: Experimento disposto em sala de incubação, na temperatura 28 °C e fotoperíodo de 12 horas, durante um período de 7 dias. Fonte: Autora.



Legenda: Placas de Petri com os tratamentos do teste de antibiose.

4.5 Avaliação da inibição do crescimento micelial de Foc

Foram realizadas três medições do crescimento micelial de Foc por um período de 7 dias. As medições foram realizadas em dois sentidos diametralmente opostos, com auxílio de paquímetro marca DIGIMESS. Com base nos resultados das medições, a área de crescimento micelial de cada tratamento foi calculada utilizando a média simples entre o comprimento e a largura, conforme a seguinte fórmula:

$$\text{Área do crescimento micelial} = \text{média do comprimento} * \text{média da largura}$$

A porcentagem de inibição do crescimento micelial dos isolados de Foc foi determinada utilizando a seguinte fórmula onde o crescimento corresponde a área de crescimento micelial (Menten *et al.*, 1976):

$$PIC = \frac{\text{Crescimento testemunha} - \text{crescimento tratamento}}{\text{Crescimento testemunha}} \times 100$$

Utilizou-se o critério de Brzezinska & Jankiewicz (2012) para categorizar as inibições. A porcentagem de inibição do crescimento micelial foi dividida em quatro categorias: sem inibição (0 – 20%); inibição moderada (21 – 30%); inibição forte (31 – 50%) e inibição muito forte (> 50%).

4.6 Delineamento experimental do teste de antagonismo

O experimento foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado, com três repetições, sendo cada repetição representada por uma placa de Petri. Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA e as médias foram comparadas pelo teste de médias Scott&Knott a 5% de probabilidade.

4.7 Preparo dos inóculos para o teste de compatibilidade

Em capela de fluxo laminar, transferiu-se uma alçada da cepa de *Bacillus* para um Erlenmeyer de 50mL contendo 25mL de meio Kado & Heskett (1970), para a preparação do pré-inóculo. O pré-inóculo foi incubado em shaker a 28 °C e 150 rpm, por um período de 24 horas.

Subsequente, foi retirado 1 mL do pré-inóculo, adicionado em Erlenmeyer de 250mL contendo 100 mL de meio Kado e incubado em shaker a 28 °C e 150 rpm, por um período de 24 horas.

4.8 Teste de compatibilidade *in vitro* entre cepas de *Bacillus*

A metodologia foi realizada de acordo com Romeiro (2007). Foram cultivadas as cepas bacterianas em meio de cultura líquido Kado & Heskett (1970) por 24h e, subsequente, foram repicados para placas de Petri em quatro pontos equidistantes de 25mm do centro da placa, mantidos em BOD por 48 horas à 28 °C. Em seguida, uma camada do meio Kado & Heskett (1970) foi depositada acima das cepas e aguardado sua solidificação.

Após isso, foi feita a diluição seriada de 1 mL da suspensão bacteriana concentrada do isolado concorrente e 100 microlitros dessa solução foi adicionado nas placas. Foi realizado o espalhamento com auxílio de alça de Drigalski e posteriormente a respectiva identificação de cada placa. Os tratamentos foram mantidos em BOD por 72 horas à 28 °C.

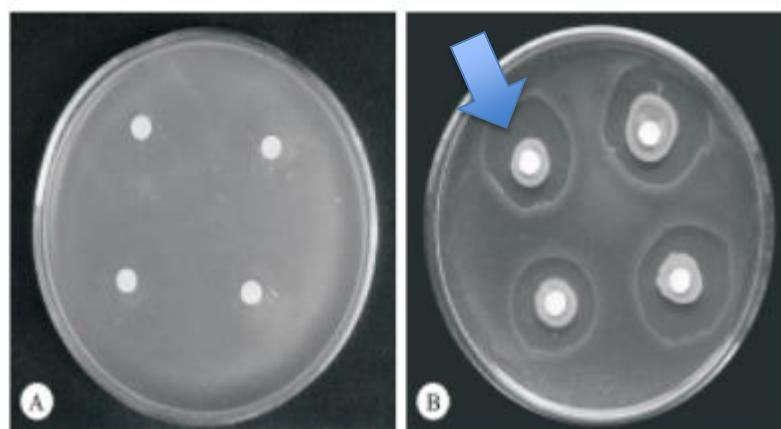
4.9 Delineamento experimental do teste de compatibilidade bacteriana

O experimento foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições, sendo cada repetição representada por uma placa de Petri.

4.10 Avaliação do teste de compatibilidade *in vitro* entre cepas de *Bacillus*

Os resultados foram avaliados observando a presença ou ausência de halos de compatibilidade, segundo Mafia *et al.* (2007).

Figura 4: Exemplo de compatibilidade e incompatibilidade entre cepas de *Bacillus*.



Legenda: A – Ausência de halos, indicando compatibilidade entre os isolados; B – Presença de halos (indicado pela seta azul), demonstrando incompatibilidade entre os isolados. Fonte: Mafia *et al.*, 2007.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Efeito de cepas de *Bacillus* no crescimento micelial de isolados de Foc

Observou-se que a porcentagem de inibição do crescimento micelial variou conforme a interação entre as diferentes cepas bacterianas e os isolados de Foc. A variação foi de 7,97% a 79,40% quando comparado com a testemunha. Os isolados de *Bacillus* mostraram reduções do crescimento micelial de Foc, demonstrando seu potencial antagônico.

Tabela 2: Porcentagem de inibição micelial dos tratamentos do estudo.

Isolado de Foc	Cepas de <i>Bacillus</i>	Inibição do crescimento micelial (%)	Isolado de Foc	Cepas de <i>Bacillus</i>	Inibição do crescimento micelial (%)
RFB65	LPPC259	77,41	RFB86	LPPC283	79,40
RFB65	LPPC266	73,40	RFB86	LPPC259	75,67
RFB65	LPPC242	71,26	RFB86	LPPC265	70,45
RFB65	LPPC283	66,24	RFB86	LPPC266	67,93
RFB65	LPPC265	61,92	RFB86	LPPC242	67,13
RFB65	LPPC257	59,97	RFB86	LPPC260	51,53
RFB65	LPPC250	59,50	RFB86	LPPC246	49,76
RFB65	LPPC246	58,94	RFB86	LPPC250	49,65
RFB65	LPPC256	51,42	RFB86	LPPC154	47,06
RFB65	LPPC325	50,18	RFB86	LPPC282	44,91
RFB65	LPPC154	46,00	RFB86	LPPC156	44,91
RFB65	LPPC170	44,89	RFB86	LPPC325	39,08
RFB65	LPPC159	43,70	RFB86	LPPC170	38,50
RFB65	LPPC260	41,10	RFB86	LPPC275	34,14

RFB65	LPPC234	39,66	RFB86	LPPC272	33,44
RFB65	LPPC189	36,17	RFB86	LPPC136	32,59
RFB65	LPPC251	36,14	RFB86	LPPC172	31,07
RFB65	LPPC282	35,89	RFB86	LPPC159	30,40
RFB65	LPPC172	35,46	RFB86	LPPC134	28,72
RFB65	LPPC203	32,30	RFB86	LPPC158	27,58
RFB65	LPPC156	30,24	RFB86	LPPC259	21,13
RFB65	LPPC157	27,26	RFB86	LPPC181	19,03
RFB65	LPPC272	26,98	RFB86	LPPC189	18,72
RFB65	LPPC136	25,46	RFB86	LPPC135	15,10
RFB65	LPPC181	23,63	RFB86	LPPC157	14,59
RFB65	LPPC275	22,54	RFB86	LPPC262	14,11
RFB65	LPPC134	21,84	RFB86	LPPC257	12,42
RFB65	LPPC158	20,61	RFB86	LPPC251	11,63
RFB65	LPPC135	16,98	RFB86	LPPC326	10,37
RFB65	LPPC262	10,54	RFB86	LPPC234	9,06
RFB65	LPPC326	7,47	RFB86	LPPC203	8,03

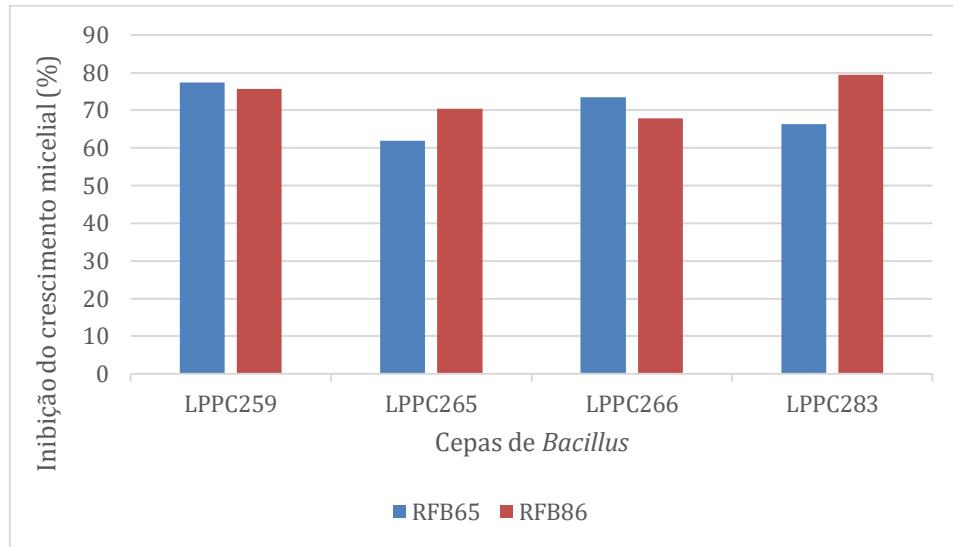
Fonte: Autora, 2023.

Para o isolado RFB65 obteve-se dez cepas de *Bacillus* com inibição acima de 50%, seguindo a escala de inibição de Brzezinska & Jankiewicz (2012), sendo elas LPPC242, LPPC246, LPPC250, LPPC259, LPPC257, LPPC260, LPPC265, LPPC266, LPPC283 e LPPC325. As três melhores cepas entre as dez foram LPPC259, LPPC266 e LPPC242, com porcentagens de inibição de 77,41, 73,40 e 71,26%, respectivamente.

O isolado RFB86 teve o menor crescimento micelial quando submetido ao teste antagônico com a cepa LPPC283, alcançando 79,40% de inibição. Semelhantemente, a cepa LPPC259 também teve uma inibição considerável para este isolado, com 75,67%.

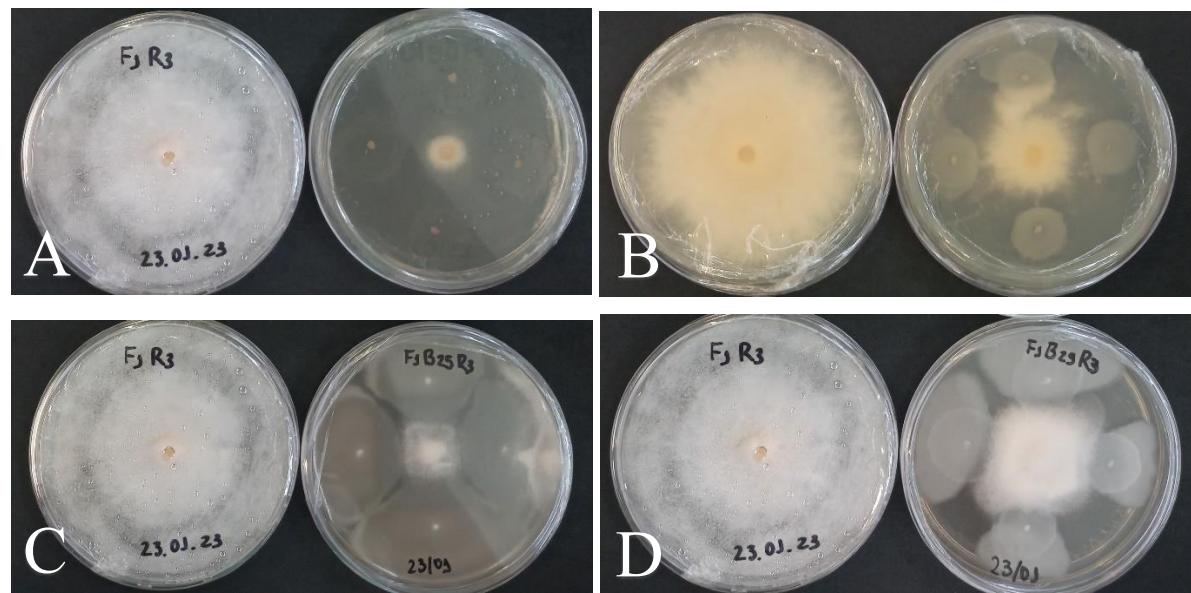
De todas as cepas testadas, quatro obtiveram resultados de inibição próximos considerando os dois isolados fúngicos (RFB65 e RFB86), com inibições acima de 60%, considerada inibição muito forte (>50%), como mostra na Figura 5.

Figura 5: Inibição do crescimento micelial dos isolados de *Fusarium oxysporum* RFB65 e RFB86 pelas cepas de *Bacillus* LPPC259, LPPC265, LPPC266 e LPPC283.



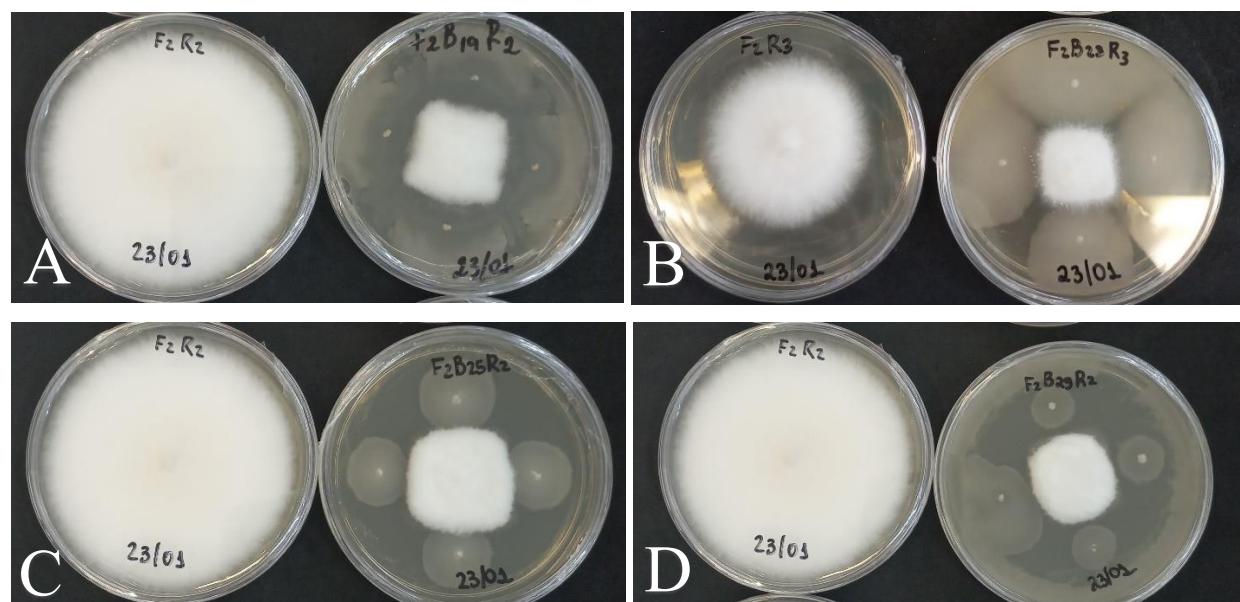
As quatro cepas de *Bacillus* com resultados semelhantes demonstraram ótimo desempenho em reduzir o crescimento dos dois isolados de Foc quando comparadas à testemunha no teste de antagonismo *in vitro* (Figura 6 e 7).

Figura 6: Teste de antibiose *in vitro* das cepas de *Bacillus* contra o isolado RFB65 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*.



A – Isolado de Foc RFB65 confrontado com a cepa LPPC259; B – Isolado de Foc RFB65 confrontado com a cepa LPPC265; C – Isolado de Foc RFB65 confrontado com a cepa LPPC266 e D – Isolado de Foc RFB65 confrontado com a cepa LPPC283, placas mais a esquerda: testemunha negativa: crescimento só do patógeno, placas a direita: tratamentos. Fonte: Autora, 2023.

Figura 7: A – Teste de antibiose *in vitro* das cepas de *Bacillus* contra o isolado RFB86 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*.

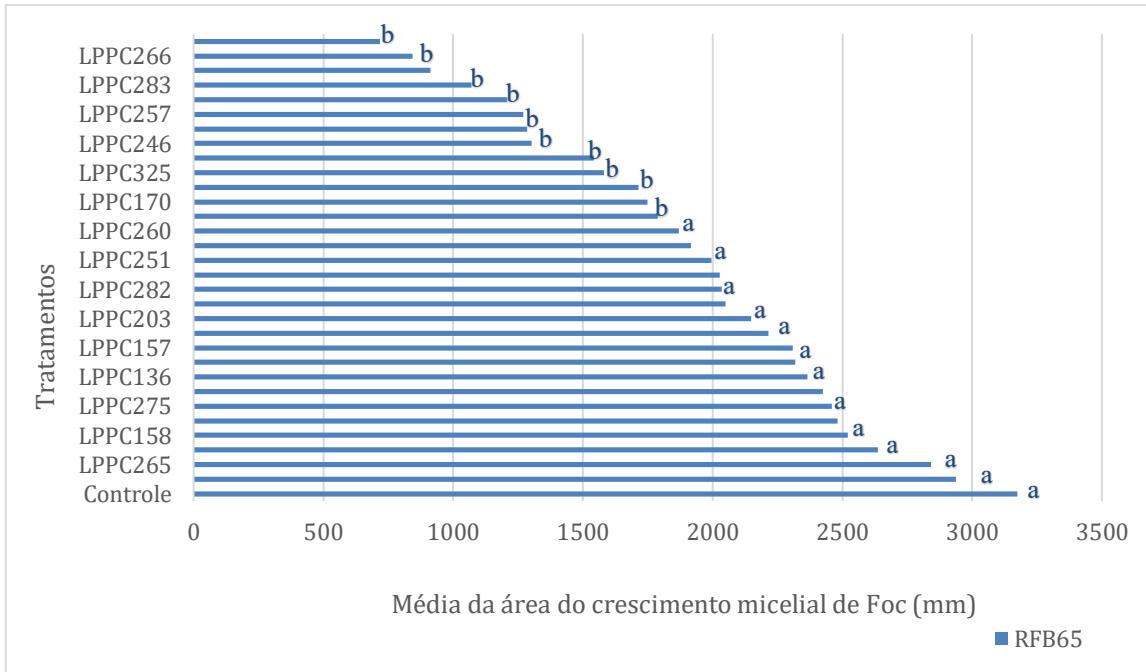


A- Isolado RFB86 confrontado com a cepa LPPC259; B – Isolado de Foc RFB86 confrontado com a cepa LPPC265; C – Isolado de Foc RFB86 confrontado com a cepa LPPC266 e D – Isolado de Foc RFB86 confrontado com a cepa LPPC283, placas mais a esquerda: testemunha negativa: crescimento só do patógeno, placas a direita: tratamentos. Fonte: Autora, 2023.

As cepas de *Bacillus* mais eficientes na redução do crescimento micelial do isolado mais agressivo (RFB86), segundo teste de patogenicidade realizado em casa de vegetação, foram LPPC242, LPPC259, LPPC265, LPPC266 e LPPC283 e seguiram o critério de inibição muito forte de acordo com a escala de inibição de Brzezinska & Jankiewicz (2012).

Avaliando todos os tratamentos testados para o isolado RFB65, treze diferiram estatisticamente da testemunha e com inibições muito fortes (Figura 8).

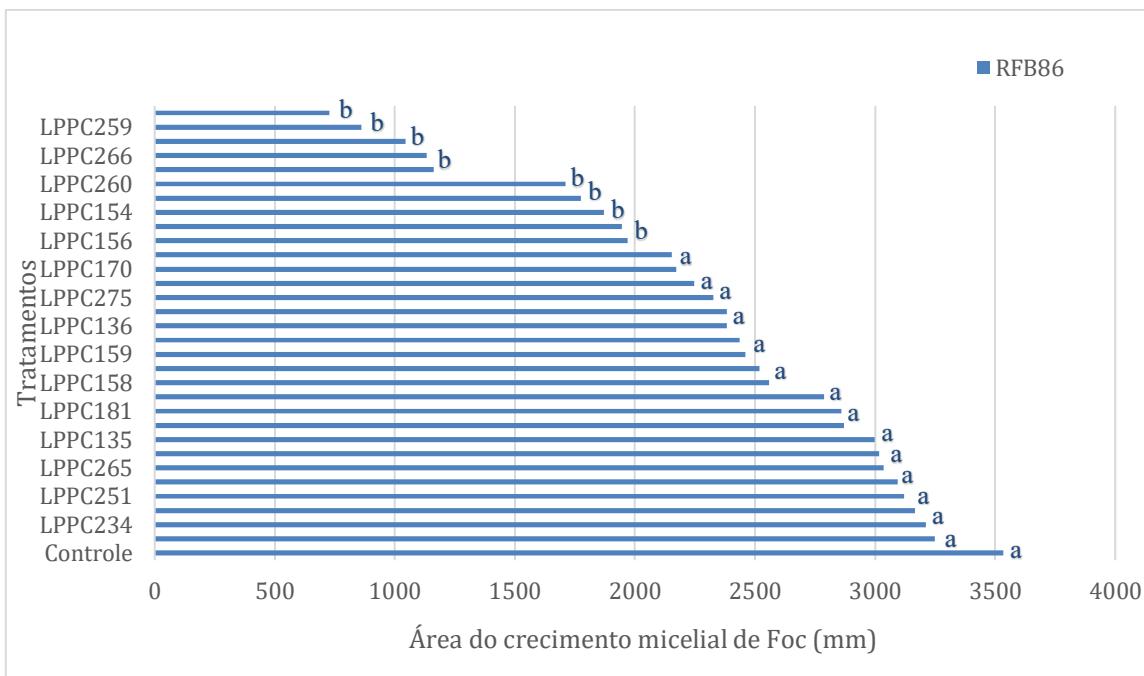
Figura 8: Média das áreas do crescimento micelial de RFB65 nos tratamentos, pelo método Scott&Knott a 5% de probabilidade.



Legenda: a – não diferiram estatisticamente da testemunha; b – diferiram estatisticamente da testemunha. Controle – apenas crescimento fúngico em placa. Fonte: Autora.

Avaliando de modo geral os tratamentos no ensaio com o isolado RFB86, obtivemos resultados estatisticamente significativos. Dez cepas de *Bacillus* diferiram estatisticamente da testemunha entre todos os tratamentos testados nesse estudo (Figura 9).

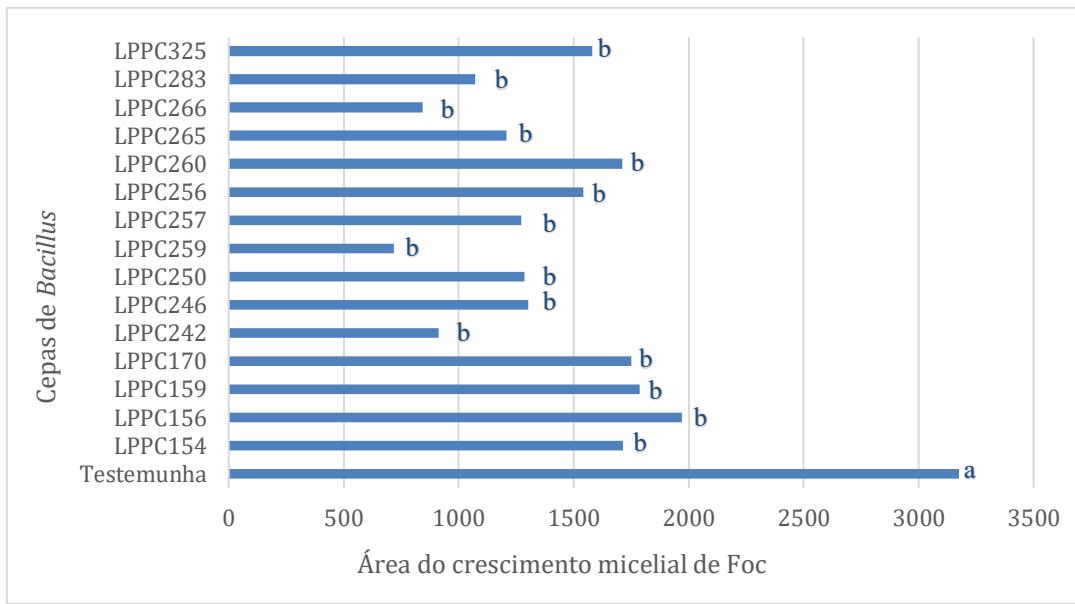
Figura 9: Média das áreas do crescimento micelial de RFB86 nos tratamentos, pelo método Scott&Knott a 5% de probabilidade.



Legenda: a – não diferiram estatisticamente da testemunha. b – diferiram estatisticamente da testemunha. Controle – apenas crescimento fúngico em placa. Fonte: Autora.

Das 31 cepas de *Bacillus* testadas nesse estudo para os dois isolados fúngicos (RFB65 e RFB86), quinze destacaram-se na redução do crescimento micelial, configurando inibições estatisticamente significativas e muito fortes (Figura 10). Esse resultado é semelhante a diversos estudos presentes na literatura que utilizam isolados de *Bacillus* para o controle *in vitro* de espécies do gênero *Fusarium* (Lima, 2014; Porto, 2024).

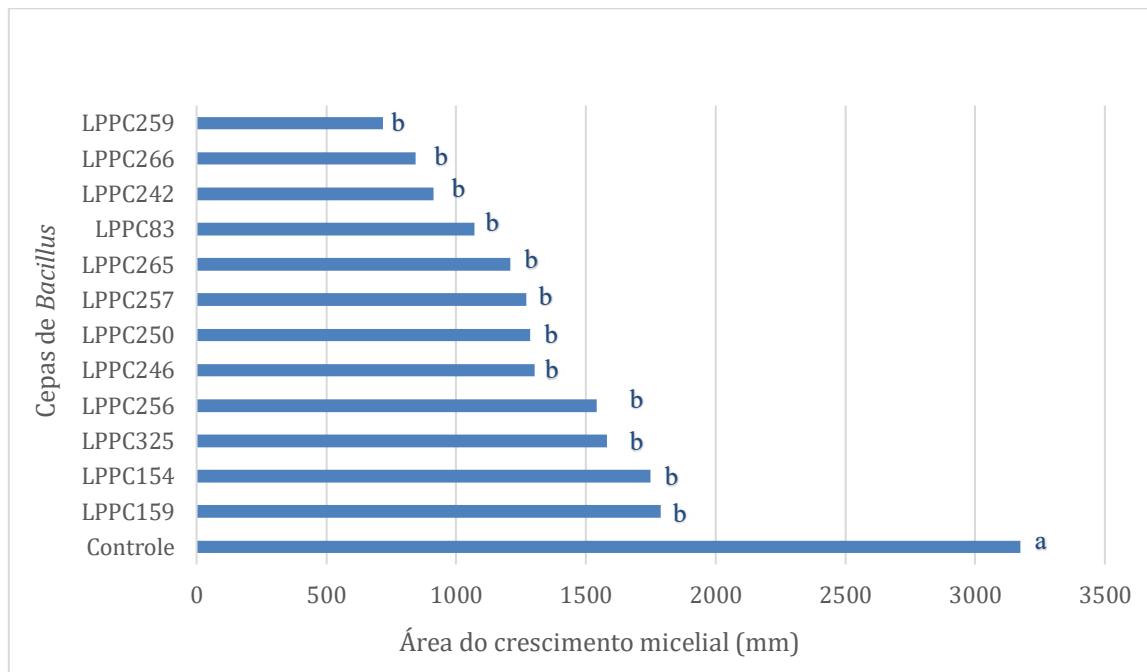
Figura 10: Média das áreas do crescimento micelial dos dois isolados de Foc nos tratamentos com maiores inibições, pelo método Scott&Knott a 5% de probabilidade.



Legenda: a – não diferiram estatisticamente da testemunha. b – diferiram estatisticamente da testemunha. Fonte: Autora.

Comparando separadamente cada tratamento do isolado RFB65, obtivemos resultados estatisticamente significativos a nível de $P = 0,05\%$. Dos 31 tratamentos do estudo para este isolado, treze diferiram estatisticamente da testemunha, cuja cepas de *Bacillus* são LPPC159, LPPC154, LPPC325, LPPC256, LPPC246, LPPC250, LPPC257, LPPC265, LPPC283, LPPC242, LPPC266 e LPPC259 (Figura 11).

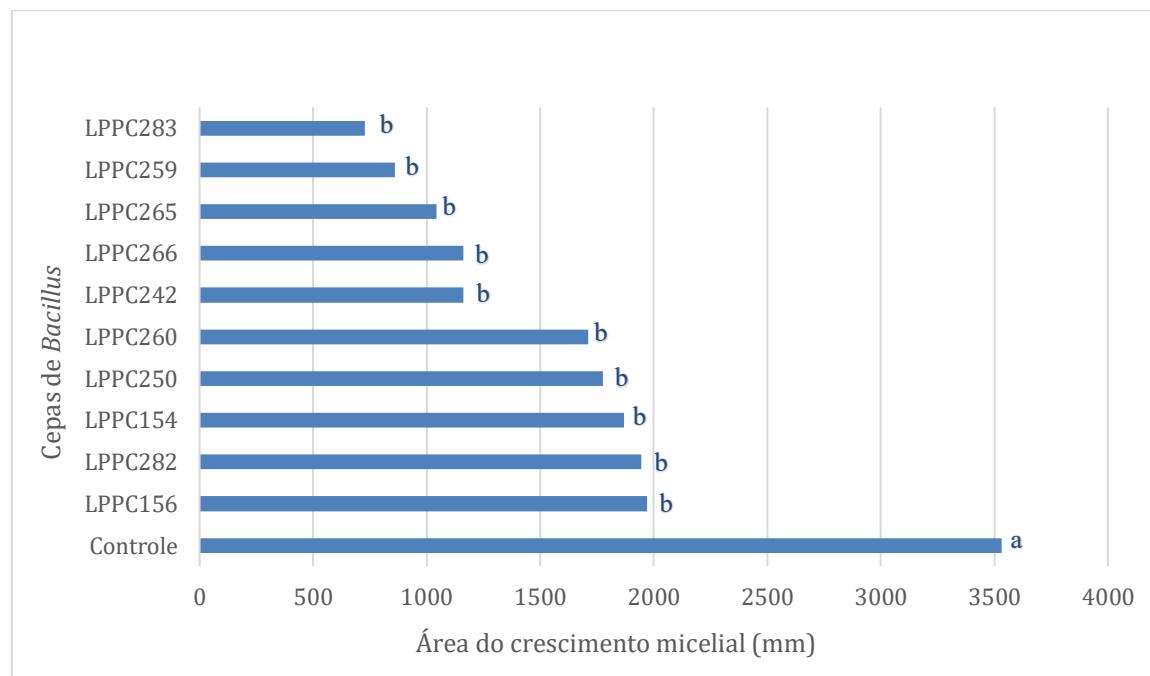
Figura 11: Área do crescimento micelial de RFB65 pelos tratamentos com melhores porcentagens de inibição, pelo método Scott&Knott a 5% de probabilidade.



Legenda: a – não diferiram estatisticamente da testemunha. b – diferiram estatisticamente da testemunha. Fonte: Autora.

Semelhantemente, para o isolado RFB86, foram observadas inibições muito fortes e estatisticamente significativas a nível de $P = 0,05\%$ para dez das trinta e uma cepas de *Bacillus* (Figura 12).

Figura 12: Área do crescimento micelial de RFB86 pelos tratamentos com melhores porcentagens de inibição, pelo método Scott&Knott a 5% de probabilidade.



Legenda: a – não diferiram estatisticamente da testemunha. b – diferiram estatisticamente da testemunha. Fonte: Autora.

Estudos sobre o uso de *Bacillus* no controle biológico de doenças de plantas são encontrados na literatura em razão das propriedades benéficas desses microrganismos, que ajudam a proteger as culturas contra as mais diversas doenças (Braga *et al.*, 2021; De Melo *et al.*, 2021; Souza *et al.*, 2024). Dentre essas propriedades, podemos citar a ação antimicrobiana, com a produção de metabólitos como lipopeptídeos (Perez, 2014) e enzimas (Alves, 2017), que inibem o crescimento de fungos e bactérias fitopatogênicas na interação agente biológico-fitopatógeno e a indução de resistência sistêmica, estimulando as defesas naturais das plantas (Amorim, 2018). É sabido que o principal mecanismo de ação dessas bactérias é a antibiose, que consiste na inibição do crescimento micelial dos fitopatógenos quando em contato com os metabólitos excretados por essas bactérias (Gowtham *et al.*, 2016; Freitas, 2017), como foi observado nos resultados do presente trabalho.

Os testes antifúngicos realizados nesse estudo foram feitos de forma *in vitro* e demonstraram o potencial de antagonismo das cepas de *Bacillus*. Todas as cepas utilizadas demonstraram capacidade em reduzir o crescimento micelial dos dois isolados de Foc (RFB65 e

RFB86), entretanto as cepas LPPC154, LPPC156, LPPC159, LPPC170, LPPC242, LPPC246, LPPC250, LPPC259, LPPC257, LPPC256, LPPC260, LPPC265, LPPC266, LPPC283 e LPPC325 obtiveram os melhores desempenhos, configurando inibições muito forte ($>50\%$) de acordo com Brzezinska & Jankiewicz (2012). Todas as cepas que apresentaram inibições muito fortes diferiram estatisticamente quando comparadas à testemunha. Para o isolado RFB65, treze cepas diferiram estatisticamente, sendo elas LPPC154, LPPC159, LPPC170, LPPC242, LPPC246, LPPC250, LPPC259, LPPC257, LPPC256, LPPC265, LPPC266, LPPC283 e LPPC325. Já para o isolado RFB86, dez cepas diferiram estatisticamente da testemunha, sendo elas LPPC154, LPPC156, LPPC242, LPPC250, LPPC259, LPPC260, LPPC265, LPPC266, LPPC282 e LPPC283. As cepas de *Bacillus* conseguiram controlar de forma eficiente os dois isolados de Foc, entretanto as quatro melhores cepas no controle do isolado RFB65 foram LPPC242, LPPC259, LPPC265 e LPPC283, enquanto para o ensaio com o isolado RFB86, as melhores cepas foram LPPC259, LPPC265, LPPC266 e LPPC283. Estudos com bactérias do gênero *Bacillus* no controle biológico do *Fusarium oxysporum* feitos por Lima *et al.* (2014) mostraram resultados semelhantes aos desse trabalho para ensaio de antibiose, com inibições acima de 50% e cinco isolados diferindo estatisticamente da testemunha.

Alves (2017) indica que um dos mecanismos que está envolvido no controle biológico de fungos e está relacionados a antibiose é a produção de compostos orgânicos voláteis (COVs). Ensaios para a produção de COVs realizados previamente no laboratório de Microbiologia dos Solos da Embrapa Agroindústria Tropical, mostraram que as cepas utilizadas nesse estudo produzem compostos orgânicos que estão relacionados a inibição do crescimento fúngico.

Mediante a isto, os resultados deste estudo demonstraram a viabilidade da utilização de bactérias do gênero *Bacillus* no controle *in vitro* de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*.

5.2 Compatibilidade *in vitro* entre isolados de *Bacillus*

Foram obtidos resultados positivos quanto a compatibilidade entre as cepas de *Bacillus*.

Para isso, a cepa LPPC259 foi selecionada devido apresentar uma das melhores porcentagens de inibição no crescimento micelial de Foc, sendo testada contra as cepas LPPC159, LPPC172, LPPC246, LPPC250, LPPC265, LPPC266 e LPPC325, que também apresentaram ótimo desempenho em reduzir o crescimento fúngico, a fim de buscar compatibilidade entre elas.

As oito cepas de *Bacillus* trabalhadas no presente estudo apresentaram eficiência quanto a inibição do crescimento micelial de Foc e quase todas mostraram-se compatíveis com a cepa LPPC259 (Tabela 3).

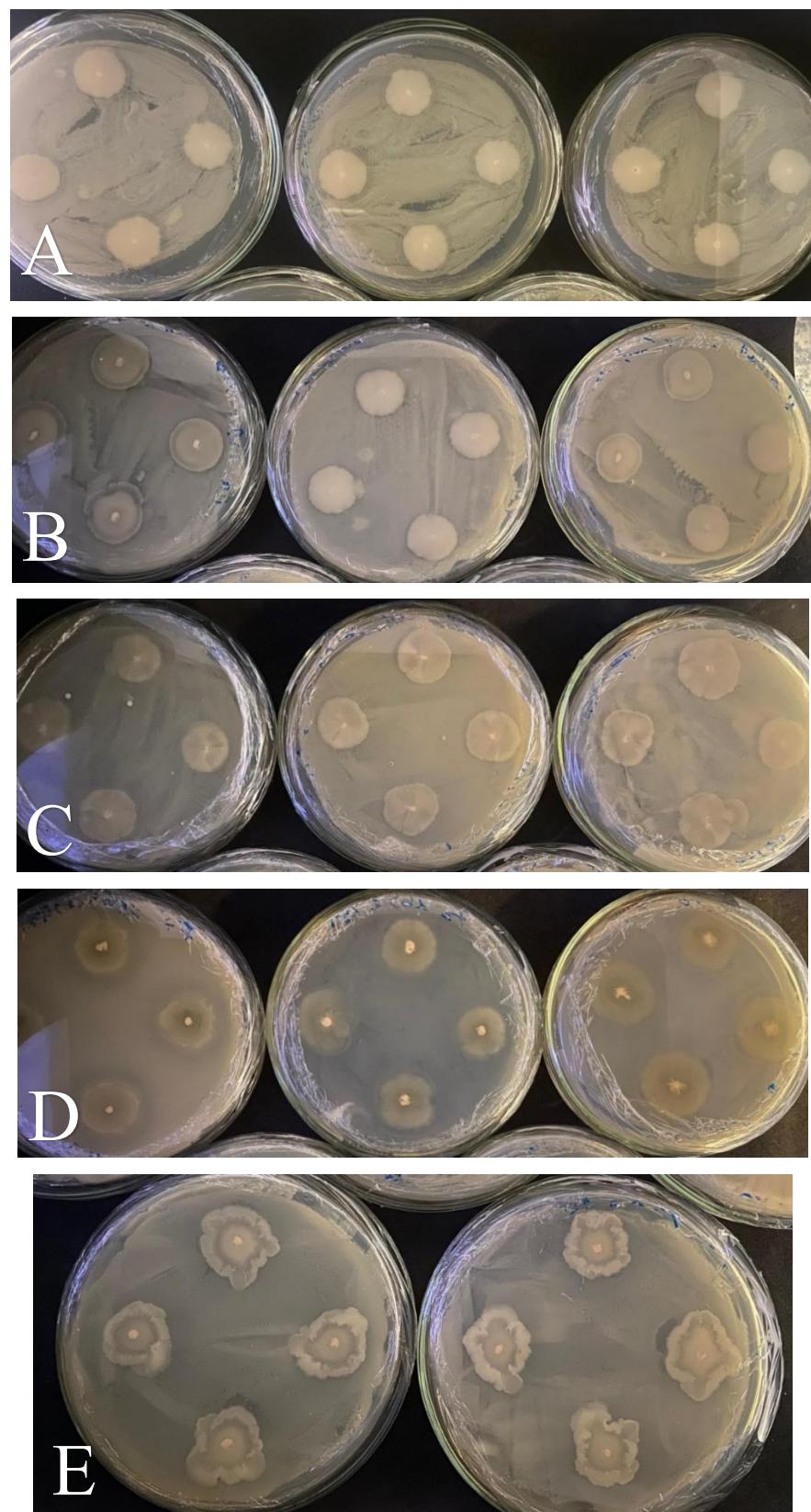
Tabela 3: Compatibilidade entre as cepas de *Bacillus*.

	B	C	D	E	F	G	H
A	+	+	+	-	+	+	-

Legenda: Sinais positivos (+) e negativos (-) sinalizam combinações compatíveis e incompatíveis, respectivamente. A – LPPC259; B – LPPC159; C – LPPC172; D – LPPC246; E – LPPC250; F – LPPC265; G – LPPC266 e H – LPPC325. Fonte: Autora.

Foi observado compatibilidade (ausência de halos) entre os tratamentos LPPC159 (por baixo) e LPPC259 (em cima); LPPC172 (por baixo) e LPPC259 (em cima); LPPC 246 (por baixo) e LPPC259 (por cima); LPPC265 (por baixo) e LPPC259 (por cima) e LPPC266 (por baixo) e LPPC259 (por cima).

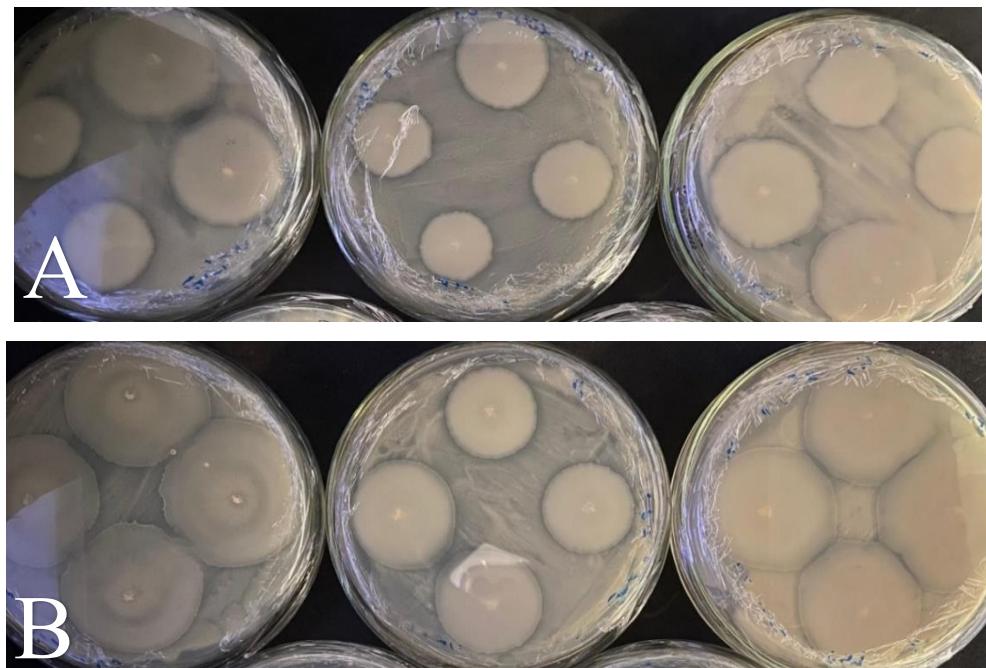
Figura 15: Tratamentos demonstrando compatibilidade *in vitro* entre cepas de *Bacillus*.



Legenda: A – Cepas LPPC159 (por baixo) e LPPC259 (em cima); B – Cepas LPPC172 (por baixo) e LPPC259 (em cima); C – Cepas LPPC 246 (por baixo) e LPPC259 (por cima); D – Cepas LPPC265 (por baixo) e LPPC259 (por cima) e E – Cepas LPPC266 (por baixo) e LPPC259 (por cima). Fonte: Autora.

Para os tratamentos composto pelas cepas LPPC159 e LPPC259; LPPC172 e LPPC259; LPPC246 e LPPC259; LPPC265 e LPPC259 e LPPC266 e LPPC259, observamos resultados positivos demonstrando compatibilidade entre os isolados. Os tratamentos LPPC250 e LPPC259 e LPPC325 e LPPC259, mostraram-se incompatíveis entre si, com formação de halos.

Figura 16: Teste de compatibilidade *in vitro* de cepas de *Bacillus* sp. A presença de halos indica a incompatibilidade *in vitro* entre cepas de *Bacillus*.



Legenda: A – Cepas LPPC250 (por baixo) e LPPC259 (por cima) e B – Cepas LPPC325 (por baixo) e LPPC259 (por cima). Fonte: Autora.

Visando ampliar o controle biológico através do uso de cepas do gênero *Bacillus*, estudos relacionados ao consórcio de microrganismos mostram-se promissores para o biocontrole de doenças em plantas (Santos, 2021; Bronzatto, 2023). O consórcio de microrganismos é verificado por meio de ensaios de compatibilidade *in vitro*, assim como os realizados por Mafia *et al.* (2007)

e De Melo *et al.* (2021). Para as sete cepas (LPPC159, LPPC172, LPPC246, LPPC250, LPPC265, LPPC266 e LPPC325) testadas nesse estudo contra a cepa LPPC259, obtivemos cinco resultados demonstrando compatibilidade entre as bactérias, com ausência de halos. As cepas LPPC159, LPPC172, LPPC246, LPPC265 e LPPC266 mostraram ser compatíveis com a cepa LPPC259, enquanto as cepas LPPC250 e LPPC325 demonstraram incompatibilidade, indicando que não podem ser usadas em conjunto.

Santos *et al.* (2021) mostram que a partir de testes de compatibilidade *in vitro* foi possível estabelecer cinco “mix” compostos por quatro isolados de bactérias epifíticas, onde quatro dos cinco reduziram significativamente a antracnose quando comparados ao controle, onde os “mix” 5, 3 e 1 apresentaram melhor desempenho reduzindo a severidade da doença em até 90,80%, 89,78% e 75%, respectivamente. Em perspectivas futuras, o uso do consórcio de *Bacillus* através dos testes de compatibilidade *in vitro* mostra-se promissor objetivando a produção de mixes para redução das doenças nas plantas.

Diante disso, algumas cepas de *Bacillus* (LPPC159, LPPC172, LPPC246, LPPC250, LPPC259, LPPC265, LPPC266 e LPPC325) testadas no presente trabalho demonstraram resultados promissores quanto à compatibilidade entre si para uso futuro em estudos *in vivo* a fim de reduzir biologicamente o mal do Panamá.

6. CONCLUSÕES

As cepas de *Bacillus* são capazes de inibir o crescimento micelial *in vitro* dos isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, destacando-se as cepas LPPC259, LPPC265, LPPC266 e LPPC283, nas quais apresentaram as maiores porcentagens de inibição nos ensaios com os isolados RFB65 e RFB86 de Foc.

Para as oito cepas de *Bacillus* testadas, seis mostraram-se compatíveis entre si, entre elas LPPC159, LPPC172, LPPC246, LPPC259, LPPC265 e LPPC266, viabilizando estudos *in vivo* visando a produção de um possível produto biotecnológico a base de misturas bacterianas para o controle do fitopatógeno.

Dessa forma, pode-se recomendar as cepas que obtiveram bons resultados no presente estudo, com destaque para a LPPC259, como promissores para uso futuro *in vivo* no controle do mal do Panamá em bananeiras.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFENAS, A.C., MAFIA, R.G. **Métodos em Fitopatologia**. UFV. p. 382, 2007.

AMORIM, L. *et al.* **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. Agronômica Ceres, p. 528, 2018.

AREAL, M. V. R. **Compostos orgânicos voláteis (COVs) emitidos por *Bacillus* sp. no controle biológico de fitopatógenos**. Monografia. p. 18-21, 2019.

BARROS, A. M. **Utilização de Fungos Endofíticos de Sucupira Branca no controle alternativo do Mal-do-Panamá na cultura da Banana e potencial biotecnológico**. Monografia. p. 13-14, 2022.

BETTIOL, W. Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas. **Cadernos de Ciência e Tecnologia Agrícola**, p. 7-8, 2009.

BHARAT, R. *et al.* *Trichoderma viridae* as a mycoparasite of *Aspergillus* spp. **Plant and Soil**, v. 57, p. 131-135, 1980.

BIANCHI, M. **Banana verde – Propriedades e Benefícios**. Universidade Estadual do Ceará, 2010. Disponível em:
<https://www.uece.br/wpcontent/uploads/sites/82/2021/07/BananaVerdePropriedadeseBeneficio s.pdf>. Acesso em: 20 nov. 2024.

BORGES, A. J. S. *et al.* Redução do mal-do-panamá em bananeira-maçã por inoculação de fungo micorrízico arbuscular. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, p. 35-41, 2007.

BRAGA, A. F. *et al.* **Interação de *Trichoderma Asperellum* e *Bacillus* spp. utilizados no controle biológico de doenças na soja**. Dissertação de Mestrado. p. 8-9, 2021.

BRONZATTO, E. S. *et al.* **Compatibilidade de microrganismos em campo e *in vitro* na promoção de crescimento e no manejo de doenças em soja.** Dissertação de Mestrado. p. 19-21, 2023.

BRZEZINSKA, M. S., JANKIEWIEZ, U. Production of antifungal chitinase by *Aspergillus niger* LOCK 62 and its potential role in the biological control. **Current Microbiology**, v. 65, p. 666–672, 2012.

COOK, R. J, BAKER, K. F. **The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens.** St. Paul, APS Press, p. 539, 1983.

CORDEIRO, Z. J. M. *et al.* **Manual de fitopatologia: manual das plantas cultivadas.** Agronômica Ceres. p. 109-123, 2016.

COUTRIM, R. L. Efeito antagonista de *Bacillus subtilis* e *Bacillus amyloliquefaciens* sobre o fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. **Cadernos de Agroecologia**, v.13, p. 2-3 2018.

COUTRIM, R. L. *et al.* Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma longibrachiatum* e *Trichoderma harzianum* a *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. **Agroecologia**, v.4, p. 171-175, 2021.

DE MELO, T. A. *et al.* O gênero *Bacillus* aplicado ao controle biológico de doenças de plantas. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 9, p. e18110917817-e18110917817, 2021.

DONATO, S. L. R. *et al.* **Banana: do Plantio à Colheita.** Belo Horizonte: EPAMIG, p. 376, 2021.

FERREIRA, C. F. *et al.* **O agronegócio da banana.** Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. p. 20-27, 2016.

GASPAROTTO, L. et al. *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raça 4 tropical: perigo para a bananicultura nacional. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. p. 2-3, 2020.

GONZÁLEZ, C. A. R. et al. Actividad antagonista de *Bacillus* sp. frente a *Fusarium oxysporum*: un aporte a la agricultura sostenible. **Revista Nova**, v. 3. p. 9-19, 2017.

IBGE. **Produção de Banana: Brasil.**, 2023. Disponível em:
<https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/banana/br>. Acesso em: 7 de fev. 2025.

KADO, C. I., HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, v. 60, n. 6, p.969-976, 1970.

LIMA, O. D. R. et al. Ação antifúngica *in vitro* de isolados de *Bacillus* sp. sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **Revista Caatinga**, v. 27, n. 4, p. 57-64, 2014.

MAFIA, R. G., et al. Compatibilidade e efeito da mistura de isolados de rizobactérias na indução do enraizamento e crescimento de clones de eucalipto. **Revista Árvore**, v. 31, p. 635-643, 2007.

MARIANO, R. L. R et al., Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, v. 1, p. 89-111, 2004.

MATOS, A. P., VASCONCELOS, J. A. R., SIMÃO, A. H. **Práticas de cultivo para a cultura da banana no estado do Tocantins**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, p. 43, 2019.

MENTEN, J. O. M. et al. Efeito de alguns fungicidas no crescimento micelial de *Macrophomina phaseolina* (Tass.) Goid. “*in vitro*”. **Fitopatologia Brasileira**, v. 1, n. 2, p. 57-61, 1976.

PEREZ, K. J. **Caracterização de lipopeptídeos antimicrobianos e surfactantes produzidos por *Bacillus* spp. isolados de puba**. Dissertação de Doutorado. p.60-61, 2014.

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

PORTE, N. S., REIS, J. M. R. Efeito antagonista de *Bacillus* spp. sobre o fungo *Fusarium verticillioides*. **Perquirere**, v. 21, n. 2, p. 115-121, 2024.

PROMUSA. **Tropical race 4**. Disponível em: <https://www.promusa.org/Tropical+race+4+-+TR4>. Acesso em: 28 fev. 2025.

ROCHA, S. L., GERUM, A. F. A. A., SANTANA, M. A. **Canais de comercialização de banana in natura no Brasil**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, p. 16, 2021.

RODRÍGUES, L. L., *et al.* Antagonismo in vitro de cepas de *Bacillus* spp. frente a *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. **Biotecnología Vegetal**, v. 17, n. 4, p.229 - 236, 2017.

SANTOS, L. A. L. *et al.* Biocontrole da antracnose em frutos de mamoeiro por bactérias epífíticas formadoras de biofilme. **Summa Phytopathologica**, v. 47, p. 45-53, 2021.

SANTOS, J. E. A. **Emissão de Compostos Orgânicos Voláteis (COVs) por *Bacillus* sp. no antagonismo a fitopatógenos da bananeira (*Musa* spp.).** Dissertação de Doutorado. p. 28-29, 2023.

SOUZA, D. M. M. *et al.* Avaliação do potencial antagônico de *Bacillus* sp. e *Trichoderma harzianum*, no biocontrole de *Colletotrichum gloesporioides*. **Revista JRG de Estudos Acadêmicos**, v. 7, n. 15, p. e151708-e151708, 2024.

WARMAN, N. M., AITKEN, E. A. B. The movement of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Sub-Tropical Race 4) in susceptible cultivars of banana. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 2, 2018.