



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

CURSO DE AGRONOMIA

FRANCISCO HENRIQUE NUNES DA SILVA ALVES

**SELEÇÃO DE ISOLADOS DE *Bacillus* spp. COM POTENCIAL
ANTAGONISTA PARA CONTROLE DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense***

FORTALEZA – CEARÁ

2017

FRANCISCO HENRIQUE NUNES DA SILVA ALVES

SELEÇÃO DE ISOLADOS DE *Bacillus* spp. COM POTENCIAL ANTAGONISTA PARA
CONTROLE DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*

Monografia apresentada ao Curso de Agronomia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Engenheiro Agrônomo.

Orientador: Dr. Patrik Luiz Pastori

Co-orientadora: Dra. Christiana de Fátima Bruce da Silva

FORTALEZA – CEARÁ

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

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

A479s Alves, Francisco Henrique Nunes da Silva.
Seleção de isolados de *Bacillus* spp. com potencial antagonista para controle de *Fusarium oxysporum* f. *sp. cubense* / Francisco Henrique Nunes da Silva Alves. – 2017.
44 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Curso de Agronomia, Fortaleza, 2017.

Orientação: Prof. Dr. Patrik Luiz Pastori.

Coorientação: Profa. Dra. Christiana de Fátima Bruce da Silva.

1. Antagonismo. 2. mal do Panamá. 3. controle biológico. I. Título.

CDD 630

FRANCISCO HENRIQUE NUNES DA SILVA ALVES

**SELEÇÃO DE ISOLADOS DE *Bacillus* spp. COM POTENCIAL
ANTAGONISTA PARA O CONTROLE DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense***

Monografia apresentada ao Curso de Agronomia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará, como parte das exigências da disciplina Trabalho de Conclusão de Curso para obtenção do título de Engenheiro Agrônomo.

Aprovada em: 21/Junho/2017.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Patrik Luiz Pastori .:

Orientador Pedagógico

Universidade Federal do Ceará

Pesq^a. Christiana de Fátima B. da Silva

Coorientadora

Embrapa Agroindústria Tropical

Pesq. Cléber de Freitas Fernandes

Avaliador

Embrapa Agroindústria Tropical

Pesq. Francisco das Chagas de O. Freire

Avaliador

Embrapa Agroindústria Tropical

*Dedico esta monografia à Deus, à minha família
e à todos meus amigos que me apoiaram nessa
jornada.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ser meu alicerce, minha força e por ter me dado tantas oportunidades e aprendizados, pois sem eles eu certamente não iria dar o valor merecido a tudo que já conquistei.

À minha mãe. Por sempre ter acreditado no meu potencial, ter me incentivado, ter se esforçado para sempre me oferecer o que houvesse de melhor e por ter me apoiado em todas as minhas decisões.

À minha tia Eliana, que considero como uma mãe. Que sempre fez mais que o necessário para meu sucesso. Que sempre fez muito além do que o papel de tia lhe exigia. Exemplo de superação, de humildade e de perseverança. Sempre me inspirou com toda a sua dedicação, carinho e amor.

À minha avó, Bernarda. Pela educação, criação e por ser essa avó carinhosa, humilde, batalhadora, exemplo de vida e superação.

À minha namorada, Laila, por todo o amor, carinho, incentivo, suporte e principalmente paciência. Por ter suportado todos os meus piores dias e ter continuado ao meu lado. Por ter me incentivado a seguir meus objetivos.

À todos meus amigos, Fernanda, Gelino, Ana Carlyne, Silvio, Ítalo, Lucas, Roberta entre muitos outros, que me ajudaram nessa caminhada.

À minha orientadora, Dra. Christiana Bruce, pela confiança, pelos ensinamentos e orientações ao longo de 3 anos. Por toda a paciência e ajuda durante todo o desenvolvimento do projeto e da escrita dessa monografia, além de todos os outros trabalhos que somente foram possíveis com o seu auxílio.

Ao meu co-orientador, professor Dr. Patrik Luiz Pastori, pelo suporte e por todo o conhecimento transmitido.

À professora Dra Rosemeiry Melo Carvalho, por todo carinho, orientação, suporte e amizade. Além de ter sido a primeira pessoa a me introduzir no mundo da pesquisa, acreditando e incentivando o meu potencial. Sem esquecer de todo auxílio na execução da estatística do trabalho.

Ao Dr. Freire e o Dr. Cleberson pela participação na banca.

À Naomí pela tradução do abstract, bem como toda a ajuda na montagem dos experimentos, o presente trabalho não estaria pronto sem a sua ajuda.

Ao meu amigo Marcio Ootani, pelos inúmeros conselhos e conversas sobre fitopatologia. Além das inúmeras coisas que aprendi no laboratório.

Aos meus colegas de laboratório, João e Isabel, pelo carinho e ajuda no planejamento e execução dos experimentos.

À toda a equipe do Laboratório de Patologia Pós-Colheita da EMBRAPA, por todo o suporte oferecido à pesquisa.

À Universidade Federal do Ceará, por ter me oferecido a oportunidade de ter um ensino gratuito e de alta qualidade.

À EMBRAPA Agroindústria Tropical pela concessão da bolsa de estágio e por todo o suporte técnico ofertado.

RESUMO

A bananicultura é uma atividade de elevada importância econômica em todo o mundo, com inúmeros países produtores. O Brasil possui um papel de destaque no cultivo da bananeira ocupando o quarto lugar no ranking de produção. O mal do Panamá, doença endêmica das regiões produtoras de banana, é um dos grandes problemas da bananicultura mundial, algumas variedades mostraram-se extremamente suscetíveis ao patógeno, inviabilizando a exploração econômica da bananicultura na região. Bactérias do gênero *Bacillus* são um dos agentes de controle biológico mais utilizados e comercializados no mundo. Estas bactérias possuem diversos mecanismos de antagonismo, como produção de metabólitos, enzimas, sideróforos, compostos orgânicos voláteis, dentre outros, que asseguram o sucesso competitivo contra outros microrganismos. Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo selecionar espécies do gênero *Bacillus*, que apresentem potencial antagonista para controle do mal do Panamá. Para tanto, 50 isolados de *Bacillus* spp. obtidos da rizosfera de bananeiras e do rabanete foram submetidos a testes *in vitro* contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (FOC), agente causal do mal do Panamá. No total de 23 isolados apresentaram capacidade de inibição do crescimento micelial, reduzindo em até 61,95% o crescimento do patógeno. Também foi avaliado a capacidade de produção de compostos voláteis dos isolados que mais se destacaram no teste de antagonismo. Dos 5 isolados (44, 59, 71, 99 e 186) de *Bacillus* spp. testados para produção de compostos orgânicos voláteis, quatro (59, 71, 99 e 186) apresentaram as melhores inibições do crescimento micelial de FOC, quando comparados com a testemunha. Os isolados que mais se destacaram foram submetidos a testes de inibição contra múltiplos patógenos. Apenas os patógenos *Rhizoctonia solani*, agente causal da rizoctoniose do meloeiro; *Lasiodiplodia theobromae*, agente causal da resinose do cajueiro e *L. theobromae* agente causal da podridão de lasiodiplodia em meloeiro, não foram inibidos pelos isolados bacterianos. Conclui-se que, os isolados mais promissores, considerando os mecanismos *in vitro* de antagonismo, são os isolados 44, 59, 71, 99 e 186, com destaque para o isolado 186 que apresentou uma boa atividade antagonista em todos os testes conduzidos.

Palavras-chave: Antagonismo, mal do Panamá, controle biológico.

ABSTRAT

Banana farming is an activity of great economic importance throughout the world, with numerous producing countries. Brazil has a prominent role in it, occupying the fourth place in the production ranking. The Panama disease is endemic disease in banana producing areas, is one of the greatest problems for banana industry worldwide, some varieties showed to be extremely susceptible to the pathogen, impeding the economic exploitation of the banana crop in such region. Bacteria of the *Bacillus* genus are some of the most widely used and commercialized biological control agents in the world. These bacteria have several mechanisms of antagonism, such as metabolites production, enzymes, siderophores, volatile organic compounds and others, that ensure competitive success against other microorganisms. In this context, this study aimed to select species of the genus *Bacillus*, that present antagonistic potential against Panama disease. Therefore, 50 isolates of *Bacillus* spp. obtained from the banana and radish rhizosphere were submitted to *in vitro* tests against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (FOC), causal agent of the Panama disease. In total, 23 isolates were capable to inhibit mycelial growth, reducing up to 61.95% of pathogen growth. It was also evaluated the production capacity of volatile compounds of the isolates that stood out the most in the antagonism test. Of the five isolates (44, 59, 71, 99 and 186) of *Bacillus* spp. tested in the test of volatile compounds, four (59, 71, 99 and 186) presented the best inhibitions of FOC mycelial growth when compared to the control. The isolates that stood out the most were submitted to tests of inhibition against multiple pathogens. Only the pathogens *Rhizoctonia solani*, causal agent of *Rhizoctonia* canker in melon, *Lasiodiplodia theobromae*, causal agent of gummosis in cashew tree and *L. theobromae* causal agent of stem-end rots in melon were not inhibited by the bacterial isolates. From this study, it can be concluded that the most promising isolates, considering the *in vitro* mechanisms of antagonism are the isolates 44, 59, 71, 99 and 186, especially the isolate 186 which showed a good activity in all tests conducted.

Keywords: Antagonism, Panama disease, biological control.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – Bananeira (*Musa* spp.) sadia (A), com sintomas externos (B) e internos (C) do mal do Panamá (B). Conídios de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (D).....18
- Figura 2 – Bactérias do gênero *Bacillus* spp.....20
- Figura 3 – Método do Pareamento de Culturas. Discos de 5 mm do isolado do patógeno FOC 27.9 (A). Placa de Petri contendo meio 523, distância do centro para os pontos distantes a 25 mm (B). Patógeno repicado com auxílio da alça de platina (C). Placas de Petri mantidas a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12h (D).....28
- Figura 4 – Antagonismo de isolados de *Bacillus* spp. contra *F. oxysporum* f.sp. *cubense*, pela produção de compostos orgânicos voláteis. Placas contendo o antagonista e o patógeno (A). Sobreposição das placas de ambos os isolados (B).....28
- Figura 5 – Antagonismo de isolados de *Bacillus* spp. contra *F. oxysporum* f.sp. *cubense*, pelo Método da Dupla Cultura. Placa contendo o antagonista e o patógeno com 1 dia de crescimento (A). Placa com 5 dias de crescimento (B). Placa com 7 dias de crescimento (C). Placa contendo apenas o patógeno com 7 dias de crescimento (D).....31
- Figura 6 – Antagonismo de isolados de *Bacillus* spp. contra *F. oxysporum* f.sp. *cubense*, pela produção de compostos orgânicos voláteis. Placas contendo o antagonista e o patógeno com 7 dias de crescimento (A). Placa com vista lateral (B). Placa contendo apenas o patógeno com 7 dias de crescimento (C).....35
- Figura 7 – Antagonismo de isolados de *Bacillus* spp. na inibição do crescimento micelial de múltiplos fitopatógenos: *Alternaria* sp. x *Solanum lycopersicum* (A). *Alternaria* sp. x *Fragraria x ananassa* (B). *Colletotrichum gloeosporioides* x *Anacardium occidentale* (C), *Colletotrichum musae* x *Musa* spp. (D). *Colletotrichum* spp. x *Fragraria x ananassa* (E). *Colletotrichum phomoides* x *Solanum lycopersicum* (F). *Fusarium guttiforme* x *Ananas* spp. (G). *Rhizoctonia solani* x *Cucumis melo* (H). *Lasiodiplodia theobromae* x *Cucumis melo* (I). *Lasiodiplodia theobromae* x *Anacardium occidentale* (J).....38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Isolados de <i>Bacillus</i> spp., coletados da rizosfera de bananeiras, cultivadas comercialmente e não cultivadas comercialmente, nas diferentes áreas de produção dos Estados do Ceará, Rio Grande do Norte e Bahia.....	24
Tabela 2 – Composição do meio de cultura Kado & Heskett 523.....	26
Tabela 3 – Composição do meio de cultura BDA.....	26
Tabela 4 – Resultado positivo (+) e negativo (-) do antagonismo dos isolados de <i>Bacillus</i> spp. coletados da rizosfera da bananeira, cultivadas comercialmente e não cultivadas, nas diferentes áreas de produção dos Estados do Ceará, Rio Grande do Norte e Bahia.....	32
Tabela 5 – Inibição do crescimento micelial e porcentagem de inibição de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cubense</i> , avaliada pelo método da dupla cultura, por isolados de <i>Bacillus</i> spp.....	33
Tabela 6 – Inibição do crescimento micelial e porcentagem de inibição de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cubense</i> , avaliada pela produção de compostos orgânicos voláteis, por isolados de <i>Bacillus</i> spp.....	36
Tabela 7 – Antagonismo de isolados de <i>Bacillus</i> spp. no crescimento micelial de fitopatógenos: <i>Alternaria</i> sp. x <i>Solanum lycopersicum</i> (A). <i>Alternaria</i> sp. x <i>Fragaria x ananassa</i> (B). <i>C. gloeosporioides</i> x <i>A. occidentale</i> (C), <i>C. musae</i> x <i>Musa</i> spp. (D).....	39
Tabela 8 – Antagonismo de isolados de <i>Bacillus</i> spp. no crescimento micelial de fitopatógenos: <i>Colletotrichum</i> spp. x <i>Fragaria x ananassa</i> (E), <i>Colletotrichum phomoides</i> x <i>Solanum lycopersicum</i> (F), <i>Fusarium guttiforme</i> x <i>Ananas</i> spp. (G).....	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

FAO Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura

Fe Ferro

IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

MDIC Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comercio

LISTA DE SÍMBOLOS

cm	Centímetros
°C	Graus centígrados
g	Gramma
ha	Hectare
Kg	Quilogramas
m	Metros
mL	Mililitros
μL	Microlitro
μM	Micromolar
M	Molar
g.L ⁻¹	Gramas por litro

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 Aspectos botânicos da bananeira	16
1.2 Aspectos econômicos da cultura da bananeira.....	16
1.3 Mal do Panamá	17
1.4 Manejo do mal do Panamá.....	19
1.5 Interações microbianas e antagonismo	21
1.5.1 Competição por nutrientes	21
1.5.2 Produção de compostos antimicrobianos voláteis.....	22
1.5.3 Competição por nichos ecológicos	22
2. OBJETIVOS	23
2.1 Objetivo geral.....	23
2.2 Objetivos específicos	23
3. MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1 Origem dos isolados de <i>Bacillus</i> spp. utilizados no estudo	24
3.2 Origem do isolado de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> utilizado no estudo.....	25
3.3 Meios de cultura.....	26
3.2.1 Meio Kado & Heskett	26
3.2.2 Meio BDA.....	26
3.4 Preparo dos isolados para os testes de antagonismo	27
3.5 Efeito de isolados de <i>Bacillus</i> spp. no crescimento micelial de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	27
3.6 Antagonismo de isolados de <i>Bacillus</i> spp. contra <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> pela produção de compostos orgânicos voláteis	27
3.7 Antagonismo de isolados de <i>Bacillus</i> spp. no crescimento micelial de múltiplos fitopatógenos.....	29
3.8 Porcentagem de inibição do crescimento micelial.....	29

3.9 Delineamento experimental	29
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1 Efeito de isolados de <i>Bacillus</i> spp. no crescimento micelial de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	31
4.2 Antagonismo de isolados de <i>Bacillus</i> spp. contra <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> pela produção de compostos orgânicos voláteis	34
4.3 Antagonismo de isolados de <i>Bacillus</i> spp. no crescimento micelial de múltiplos fitopatógenos	37
5. CONCLUSÕES	40
REFERÊNCIAS	41

INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos botânicos da bananeira

A bananeira (*Musa* spp.) é uma planta monocotiledônea perene, pertencente à ordem *Zingiberales*, família *Musaceae*. Esta frutífera pode chegar até 3 m de altura, não apresentando lignificação ou espessamento secundário do caule (HESLOP-HARRISON; SCHWARZACHER, 2007).

É uma planta herbácea, típica das regiões tropicais úmidas. Apresenta um caule subterrâneo, o rizoma, nos quais originam as raízes primárias, em grupo de três ou quatro, com espessura predominante menor que 0,5 mm, podendo chegar até 8 mm. O sistema radicular da bananeira é fasciculado, superficial, tendo aproximadamente 82% das raízes concentradas nas profundidades de 0–50 cm no solo. Entretanto, pode atingir horizontalmente até 5 m, condições estas que dependem das variedades cultivadas e do tipo de solo (BORGERS et al., 2014).

O fruto da bananeira, a banana, é uma fruta de elevado valor nutricional e fonte energética, possuindo alto teor de carboidratos, amido e açúcares. Contém níveis consideráveis de vitaminas A, B1 (tiamina), B2 (riboflavina), C e de sais minerais, como potássio, fósforo, cálcio, sódio e magnésio (NASCENTE et al., 2005).

1.2. Aspectos econômicos da cultura da banana

A banana é a fruta fresca mais consumida no mundo, justificando a sua importância como um dos grandes produtos do agronegócio internacional. Em 2014, o Brasil possuía a quarta posição de maior produtor do mundo, com cerca de 6.96 milhões de toneladas produzidas, atrás somente da Índia (27.5 milhões de toneladas), China (12.09 milhões de toneladas) e Filipinas (8.70 milhões de toneladas) (FAO, 2017).

No Brasil, no ano de 2016, a cultura da bananeira apresentou uma área plantada de 516.96 mil hectares, com uma produção de 6.96 milhões de toneladas, com um rendimento aproximado de 13.46 toneladas por hectare (IBGE-SIDRA, 2017). O cultivo da bananeira é conduzido em todas as regiões do país, com destaque para a região

Sudeste, com uma produção de 2.30 milhões de toneladas, seguida pela região Nordeste com 2.28 milhões de toneladas. Na região Nordeste, o estado do Ceará se sobressai com 14.83 mil toneladas produzidas no ano de 2016 (MIDIC-ALICEWEB, 2017).

No estado do Ceará, o município de Limoeiro do Norte destaca-se com uma produção de 6.83 mil toneladas, representando cerca de 46% do total produzido no estado (MIDIC-ALICEWEB, 2017). Entretanto, o cultivo de bananas no Ceará apresentam alguns entraves em relação ao desenvolvimento da cultura, sobretudo devido ao baixo índice pluviométrico, altas temperaturas e solos pobres (CARVALHO, 2007). Além disso, grande parte da produção apresenta baixo nível tecnológico, manejo pós-colheita deficiente, o que vem ocasionando perdas econômicas de até 40%, principalmente devido ao transporte inadequado das frutas (BORGES et al., 2014).

1.3 Mal do Panamá

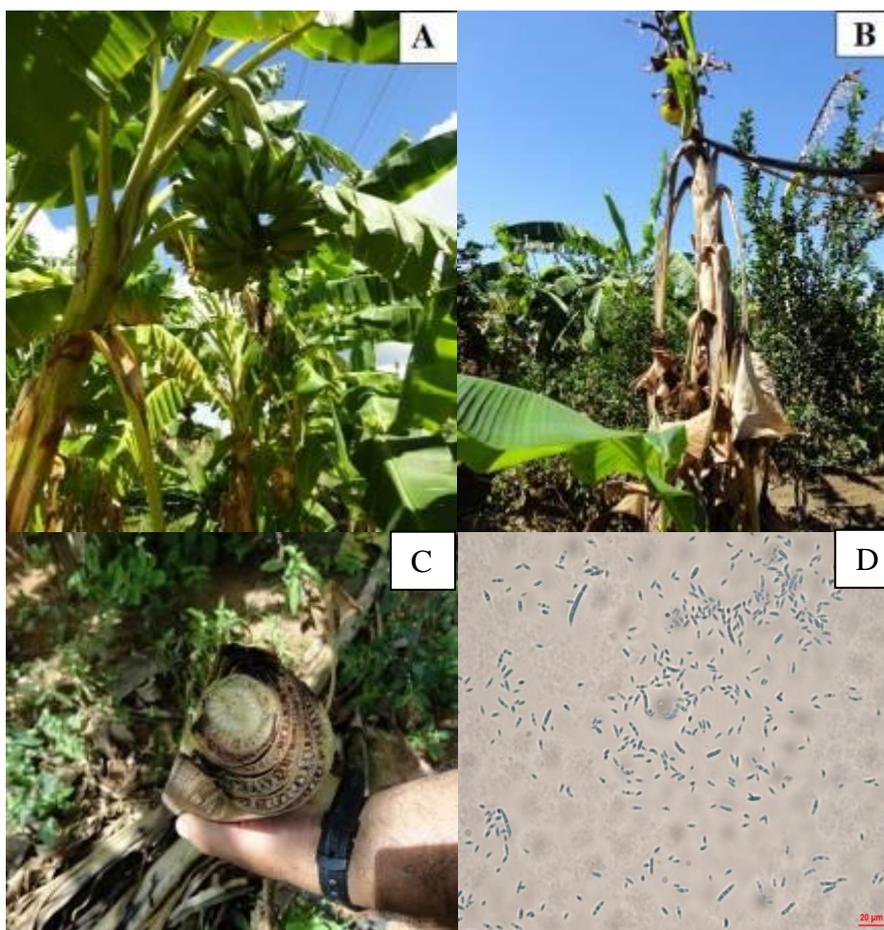
O mal do Panamá, ocasionado pelo fungo *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* Snyder Hansen é um dos grandes problemas da bananicultura mundial (PLOETZ, 1994). No Brasil, os primeiros relatos desta doença foram constatados no município de Piracicaba, no ano de 1930. A maioria dos bananais do estado de São Paulo, na década de 30 eram formados por variedades do grupo AAB, principalmente as variedades Maçã, Prata e Ouro. Estas variedades mostraram-se extremamente suscetíveis ao patógeno, inviabilizando a exploração econômica da bananicultura na região (AMORIM et al. 2011).

Os sintomas externos, ou reflexos, da enfermidade iniciam-se, nas plantas mais velhas, observando-se o clareamento das nervuras e alterações da tonalidade verde das folhas, que gradualmente vão se tornando amareladas. Estes sintomas iniciam-se pelas folhas mais velhas das plantas, avançando para as mais novas. Com o desenvolvimento da doença, pode ocorrer a murcha de folhas e brotos, necrose marginal e queda das folhas, flores e frutos, seguidos pela morte da planta. Os sintomas internos do mal do Panamá são comprovados pela descoloração dos vasos do xilema, iniciando com o amarelecimento dos tecidos vasculares nas raízes e no rizoma, o qual progride formando um círculo concêntrico periférico de coloração pardo avermelhada no interior

do pseudocaule, que é possível de ser observado ao realizar o corte transversal e longitudinal do caule (AMORIM et al. 2011) (Figura 1).

O patógeno é um fungo de solo, no qual possui estrutura especializada de resistência, denominada de clamidósporo, constituído de uma única célula com um citoplasma condensado (acúmulo de reservas nutritivas) e uma espessa parede celular que pode originar os conídios (Figura 1). Os clamidósporos representam a principal forma de sobrevivência do fungo no solo. A formação dessas estruturas de resistência dificulta o controle nas áreas afetadas pelo mal do Panamá (AMORIM et al., 2011). *F. oxysporum* f.sp. *cubense* apresenta três raças (1, 2 e 4) que ocasionam a enfermidade na bananeira (PLOETZ, 1994).

Figura 1. Bananeira (*Musa* spp.) sadia (A), com sintomas externos (B) e internos (C) do mal do Panamá. Conídios de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (D).



Fonte: Christiana Bruce (2016).

1.4 Manejo do mal do Panamá

O controle, atualmente, mais efetivo da enfermidade tem sido conduzido principalmente com a adoção de variedades resistentes, dentre as quais podem ser mencionadas as variedades do subgrupo Cavendish (Nanica, Nanicão, Grande Naine e Williams) e do subgrupo Terra. A variedade Maçã é altamente suscetível ao patógeno, nas raças 1 e 2 presentes no Brasil. A raça 4 é ausente no país, ocasionando a doença também no subgrupo Cavendish. Esta raça é altamente agressiva justificando a preocupação com as medidas de controle que visem impedir a entrada desta raça (TR4), em locais onde ainda não foram constatadas (AMORIM et al., 2011).

Uma outra alternativa viável para o controle do mal do Panamá seria a utilização do controle biológico, que visa manter um equilíbrio no ecossistema, de modo que o hospedeiro, mesmo na presença do patógeno, não sofra danos significativos, devido à ação controladora dos organismos não patogênicos presentes no sistema (OLIVEIRA, 2011). Em culturas que demandam grandes investimentos fitossanitários, com elevados números de aplicações de fungicidas, métodos de controle alternativos, como o biológico, reduzem os impactos dos defensivos nos agroecossistemas.

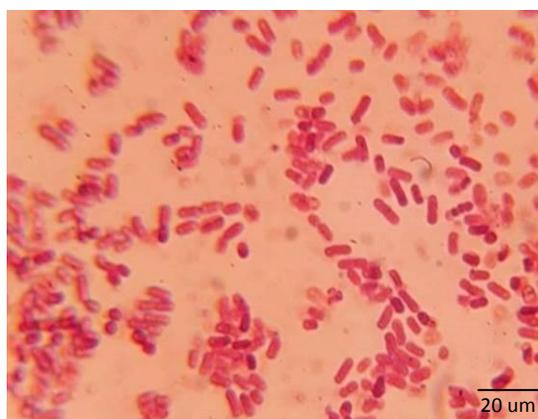
O controle biológico tem como finalidade a redução do inóculo ou das atividades determinantes da doença, através de um ou mais organismos exceto o homem (COOK; BAKER, 1983). Tem-se constatado que, com o desenvolvimento das técnicas de cultivo, a existência das interações antagonistas entre microrganismos. A utilização de agentes de biocontrole de enfermidades de plantas, como os procariotos iniciaram-se a poucas de décadas. Pesquisadores chineses, por exemplo, selecionaram culturas de *Streptomyces* sp., em coleção de 4.000 actinomicetos, provenientes de raízes de algodão e alfafa, com forte atividade antagonista *in vitro* contra patógenos como, *Verticillium albo-atrum* e *Rhizoctonia solani* (YIN et al., 1965). Portanto, a introdução de bactérias benéficas, visando aumentar a produtividade das culturas tem sido atividade bastante praticada ao longo dos séculos na agricultura.

Dentre os microrganismos benéficos e com grande potencial antagonista destacam-se as rizobactérias. Estes microrganismos quando inoculados nas plantas, seja por microbiolização de sementes, injeção, irrigação do substrato, atomização ou por outros métodos, são capazes de promover o crescimento das plantas e o controle de enfermidades (BAKKER et al., 2003). As rizobactérias estão localizadas na superfície

(rizoplano) e próximas a raízes de plantas (rizosfera), nutrindo-se dos exsudados radiculares liberados pelas plantas. Além disso, na rizosfera fazem nichos ecológicos, onde obtém proteção contra o antagonismo da microbiota circundante (LUCY et al., 2004).

As bactérias do gênero *Bacillus* (Figura 2), bactérias baciliformes gram positivas, de coloração esbranquiçada, são um dos agentes de controle biológico mais utilizados e comercializados (NICHOLSON, 2002). A multiplicidade das estruturas da parede celular, variados mecanismos de ação direta (competição por nutrientes, produção de metabólitos, compostos voláteis, dentre outros) e indiretos (ativação de sistemas de defesa em plantas), formação de estruturas de resistência (endósporo) e rápido crescimento aumentam a viabilidade de *Bacillus* spp. em diferentes condições ambientais, bem como em diferentes bioformulações (ERRINGTON, 2003; HAMDACHE et al., 2011; LEE et al., 2012; SANTOYO et al., 2012). Vários produtos comerciais originários de *Bacillus* spp. como RhizoPlus (*B. subtilis* cepa FZB24), Yield Shield (*B. pumilus* cepa GB34), Kodiak (*B. subtilis* cepa GB03) e Serenade (*B. subtilis* cepa QST716) são utilizados no Estados Unidos, e em outros países. (FRAVEL, 2005; BERG, 2009). No Brasil podemos citar Ecoshot, Nemacontrol que tem como princípio ativo *Bacillus amyloliquefaciens*, Able, Agree, BTControl, Bac-Control WP e mais 18 produtos que usam *Bacillus thuringiensis* como princípio ativo (AGROFIT, 2017).

Figura 2. Bactérias do gênero *Bacillus* spp., obtidas da rizosfera de bananeiras, visualizadas em microscópio de luz (100x).



Fonte: Lopes (2016).

1.5 Interações Microbianas e Antagonismo

As interações entre microrganismos que dividem o mesmo nicho ecológico, envolvem principalmente características competitivas. As bactérias são capazes de “perceber” alterações no ambiente, bem como a presença de outros seres em sua proximidade, esta característica é relevante para a sua sobrevivência, principalmente em condições adversas (ROMEIRO, 2007). No seu estabelecimento e sobrevivência no ambiente, as bactérias são capazes de adaptação às condições desfavoráveis e de ajustar, rapidamente e efetivamente suas estruturas e fisiologias. Dessa forma, ocorre alterações a nível de expressão gênica, como resposta a sinais e ameaças do ambiente (ROMEIRO, 2005).

No processo de antagonismo, os microrganismos (antagonistas) acionam um arsenal de mecanismos para inibição do crescimento micelial, bem como da multiplicação e esporulação de outros microrganismos (patógenos). Dentro desse contexto, existem vários mecanismos de ação, envolvidos na interação antagonista/patógeno, tais como: a) competição por nutrientes e por nichos ecológicos; b) sequestro de íons de ferro do ambiente (sideróforos); c) produção de metabólitos antimicrobianos; d) produção de compostos voláteis, dentre outros (ROMEIRO, 2007). Os mecanismos de ação serão melhor detalhados à seguir.

1.5.1 Competição por nutrientes

Os microrganismos são extremamente dependentes da disponibilidade de nutrientes, prontamente utilizáveis, para realizarem suas funções vitais, como crescimento, multiplicação e esporulação. A competição por nutrientes é um mecanismo comum no antagonismo e, verifica-se que, o período de gerações da bactéria é ponto crucial neste processo. A população bacteriana cresce em função da disponibilidade de nutrientes no ambiente. Dessa forma, os microrganismos que se multiplicam rapidamente e que são capazes de utilizar uma variedade de nutrientes têm maiores chances de sobreviver e competir, nestes ambientes. Portanto, o agente de controle biológico, no qual será introduzido deverá ser capaz de competir rapidamente e eficientemente pelos poucos nutrientes disponíveis, para que possa obter sucesso no seu estabelecimento e sobrevivência (ROMEIRO 2007).

1.5.2 Produção de compostos antimicrobianos voláteis

Os microrganismos produzem metabólitos voláteis que são capazes de inibir o crescimento e a multiplicação de outros microrganismos (MADIGAN et al., 2001). Dentre os metabólitos voláteis destacam-se os álcoois, aldeídos, cetonas, sulfetos e amônias. Estas substâncias são produzidas pelas bactérias, durante os processos de controle biológico dos patógenos (DUFFY et al. 2003).

Entre os metabólitos produzidos por microrganismos antagonistas, o ácido cianídrico (HCN) destaca-se como um potente inibidor de hemiproteínas, tais como a citocromo oxidase e a cloreto desmutase, possuindo uma ampla atividade contra a maioria dos microrganismos patogênicos (RIKKEN et al., 1996). O cianeto pode levar a inibição da cloreto desmutase, bem como outras hemienzimas envolvidas na redução do perclorato. A inibição dessas enzimas tem como resultado o acúmulo de cloreto no interior da célula do patógeno que pode entrar em colapso (SONG & LOGAN, 2004).

1.5.3 Competição por nichos ecológicos

Competição por espaço, nichos ecológicos, é um mecanismo de antagonismo microbiano e pode ter importante efeito no controle biológico de doenças de plantas (ROMEIRO, 2007).

Em um estudo com o agente de biocontrole *Pantoea agglomerans* (Strain EPS 125), eficiente no controle da podridão marrom (*Monilinia laxa*) em frutos de abricó, pêssego e nectarina, Bonaterra et al. (2003), observaram a inibição da germinação de conídios do patógeno. Contudo, nenhuma inibição era observada se ocorria à separação física dos antagonistas e dos patógenos através de uma membrana que permitia a passagem de nutrientes e metabólitos, descartando a competição por nutrientes ou a produção de substâncias antifúngicas pela bactéria.

Portanto, a identificação da atividade antagonista *in vitro* pelos isolados bacterianos é importante, pois permite a seleção dos isolados de *Bacillus* spp. para uso futuro em programas de biocontrole *in vivo*.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Selecionar isolados do gênero *Bacillus* spp., que apresentem atividade antagonista *in vitro* para controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* e avaliar sua capacidade de inibição de múltiplos fitopatógenos.

2.2. Objetivos específicos

- Realizar testes de antagonismo das espécies do gênero *Bacillus* spp. coletadas da rizosfera de bananeiras e de folhas de rabanete, contra o patógeno: *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*.

- Determinar o antagonismo de bactérias do gênero *Bacillus* spp., pela produção de compostos voláteis, contra *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*.

- Identificar a capacidade das bactérias do gênero *Bacillus* spp., de inibição do crescimento micelial de múltiplos fitopatógenos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Patologia Pós-colheita, da Embrapa Agroindústria Tropical (CNPAT), localizado em Fortaleza-CE.

3.1. Origem dos isolados de *Bacillus* spp. utilizados no estudo

Os isolados de *Bacillus* spp. da rizosfera da bananeira, utilizados nos experimentos foram obtidos e identificados por Lopes (2016), no Laboratório de Patologia Pós-colheita, da Embrapa Agroindústria Tropical. O isolado RAB9 (*Bacillus* sp.), obtido de folhas de rabanete (*Raphanus sativus*), foi cedido pelo Laboratório de Fitobacteriologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) e se encontra depositado na Coleção de Microrganismos de Interesse para Agroindústria Tropical (CMIAT) (Tabela 1).

Tabela 1. Isolados de *Bacillus* spp., coletados da rizosfera de bananeiras, cultivadas comercialmente e não cultivadas, nas diferentes áreas de produção dos Estados do Ceará, Rio Grande do Norte e Bahia.

Número do isolado	Município	Coordenadas Geográficas	Cultivar
1	Baturité – CE	S 04° 20' 054" W 0038° 52' 358"	Pacovan
10	Guaramiranga – CE	S 04° 15' 917" W 0038° 57' 459"	Pacovan
15	Pacoti – CE	S 04° 12' 808" W 0038° 54' 430"	Prata
16	Pacoti – CE	S 04° 12' 814" W 0038° 54' 419"	Prata
20	Limoeiro do Norte – CE*	S 04° 09' 199" W 0038° 51' 502"	-
24	Limoeiro do Norte – CE*	S 05° 09' 589" W 0038° 00' 687"	Prata Catarina
28	Limoeiro do Norte – CE*	S 05° 08' 971" W 0038° 00' 376"	Prata Anã
31	Russas – CE*	S 04° 58' 093" W 0038° 03' 173"	Prata Catarina
42	Cruz das Almas – BA	S 4°58'53.4324" W 38°3'42.7392"	Platina
44	Barbalha – CE	S 4°58'53.4324" W 38°3'42.7392"	-
45	Ubajara – CE	S 3°52'34.3200" W 41°00'8.700"	Pacovan
48	Ubajara – CE	S 3°52'34.3200" W 41°00'8.700"	Pacovan
52	Fortaleza – CE	S 3°45'06.6" W 38°34'38.4"	-
55	Canindé – CE	S 03°24'29.3" W 039°01'53.4"	Prata
59	Canindé – CE	S 04°20'47.2" W 039°17'58.1"	Maçã
61	Canindé – CE	S 04°20'47.8" W 039°17'57.9"	Maçã

Continuação...

66	Itatira – CE	S 04°31'31.9'' W 39°36'06.7''	Prata
67	Aratuba – CE	S 04°24'26.9'' W 39°04'6.4''	Maçã
68	Aratuba – CE	S 04°24'26.9'' W 39°04'6.4''	Casca Verde
69	Aratuba – CE	S 04°24'26.9'' W 39°04'6.4''	Pacovan
70	Redenção – CE	S 04°13'39'' W 38°43'45.7''	Pacovan
71	Redenção – CE	S 04°13'39'' W 38°43'45.7''	Pacovan
75	Quixeramobim – CE	S 05°13'03.1'' W 039°20'31.7''	-
78	Quixeramobim – CE	S 05°13'2.4'' W 35°20'29.7''	Maçã
85	Mombaça – CE	S 05°39'7.8'' W 39°35'46''	Casca Verde
86	Mombaça – CE	S 05°39'7.8'' W 39°35'46''	Maçã
92	Iguatu – CE	S06°23'28,9'' W039°07'23,2''	Pacovan
95	Iguatu – CE	S06°23'53,3'' W039°07'20,2''	Trezentinha
97	Iguatu – CE	S06°23'55,3'' W039°07'20,4''	Pacovan
98	Barro Alto-Iguatu - CE	S06°26'49,1'' W039°22'27,6''	Pacovan
99	Barro Alto-Iguatu - CE	S06°26'49,4'' W039°22'28,3''	Pacovan
105	Missão Velha – CE	S07°21'112,6'' W039°13'25,8''	Prata Anã
107	Missão Velha- CE	S07°21'11,0'' W039°13'25,2''	Prata Anã
109	Missão Velha – CE	S07/21'35,6'' W039°12'51,1''	Nanica
111	Missão Velha – CE	S07°21'27,0'' W039°13'01,0''	Prata-Anã
114	Missão Velha –CE	S07°21'27,0'' W039°13'01,0''	Prata-Anã
115	Tabuleiro do Norte –CE	S05°13'45,4'' W038°09'36,5''	Prata
116	Tabuleiro do Norte – CE	S05°13'45,4'' W038°09'36,5''	Prata
121	Tabuleiro do Norte – CE	S05°13'21,0'' W038°09'52,7''	Maçã
123	Tabuleiro do Norte – CE	S05°13'16,5'' W038°10'16,1''	Prata Catarina
124	Tabuleiro do Norte – CE	S05°13'16,5'' W038°10'16,1''	Nanica
125	Tabuleiro do Norte – CE	S05°13'16,5'' W038°10'16,1''	Pacovan
126	Limoeiro do Norte – CE	S05°11'21,6'' W038°06'24,8''	Prata Catarina
127	Limoeiro do Norte – CE	S05°11'21,6'' W038°06'24,8''	Prata Catarina
128	Quixeré – CE	S05°04'37,6'' W037°59'50,5''	Pacovan
130	Quixeré – CE	S05°04'37,6'' W037°59'50,5''	Pacovan
186	Assu – RN*	S05°31'33,5'' W36°55'44,7''	Williams
188	Assu – RN*	S05°31'33,5'' W36°55'44,7''	Williams
194	Ipangaçu – RN*	S05°31'23,6'' W036°51'57,4''	Williams

Fonte: LOPES, L.A (2016). (–) Informações não obtidas. (*) Bananeiras cultivadas.

3.2. Origem do isolado de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* utilizado no estudo

O isolado FOC 27.9 (*Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*) foi obtido de bananeiras da variedade Maçã sintomáticas e identificado pela Embrapa Roraima (CPAFRR), localizada em Boa Vista – RR.

3.3. Meios de cultura utilizados no estudo

3.3.1. Meio Kado & Heskett 523

Um dos meios de cultura utilizados no estudo foi o proposto por Kado & Heskett (1970). Este meio de cultura apresenta uma composição adequada para o cultivo da maioria das bactérias, como *Bacillus*, proporcionando crescimento rápido e ótima visualização das colônias (Tabela 2). O pH do meio para todos os experimentos foi ajustado para 7.0.

Tabela 2. Composição do meio Kado & Heskett 523 (1970).

Meio Kado&Heskett (g/L)	
Sacarose	10
Caseína	8
Extrato de levedura	4
Fosfato de potássio dibásico anidro	2
Sulfato de magnésio heptahidratado	0,3
Ágar	15

Fonte: Adaptado de Kado & Heskett (1970).

3.3.2. Meio BDA (Batata Dextrose Ágar)

O BDA (batata dextrose ágar) é o meio de cultura mais utilizado em diferentes análises em Fitopatologia. É um meio de cultura ideal para o crescimento micelial de fitopatógenos, como os fungos e bactérias (Tabela 3).

Tabela 3. Composição do meio BDA.

Meio BDA (g/L)	
Batata	225g
Dextrose	20g
Ágar	15g

Fonte: Romeiro (2007).

3.4. Preparo dos isolados para os testes de antagonismo

Os isolados de *Bacillus* spp. (Tabela 1) foram repicados inicialmente em placas de Petri, contendo meio 523 e incubados na temperatura de $28 \pm 2^\circ\text{C}$, com fotoperíodo de 12 h, por 48 h. Enquanto que, o isolado do patógeno FOC 27.9 foi repicado para placas de Petri, contendo o meio de cultura BDA, a 28°C , com fotoperíodo de 12 h e incubado por um período 7 dias.

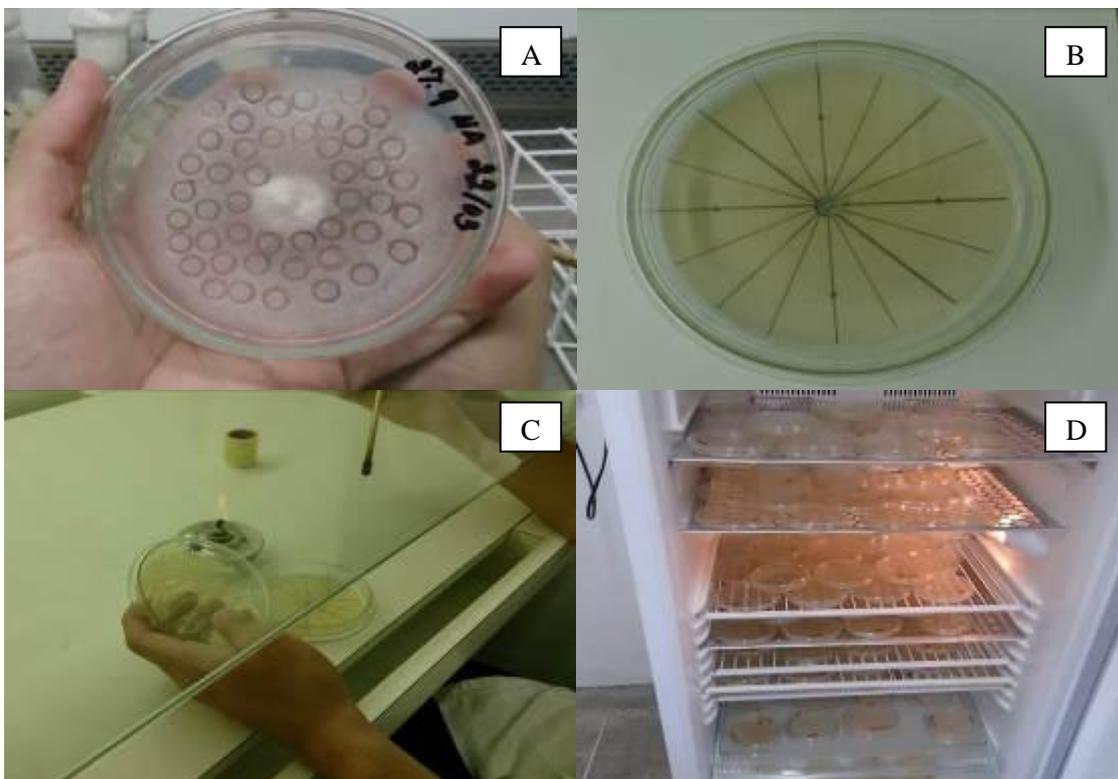
3.5. Efeito de isolados de *Bacillus* spp. no crescimento micelial de *F. oxysporum* f.sp. *cubense*.

Foi utilizado *in vitro* o Método do Pareamento de Culturas (BELL et al, 1982). Inicialmente os isolados do antagonistas e do patógeno (FOC) foram cultivados em placas de Petri, conforme descrito no item 3.4. Posteriormente, em câmara de fluxo laminar, transferiu-se assepticamente um disco de 5 mm de diâmetro do crescimento micelial de FOC, para placas de Petri, com 9 cm de diâmetro, contendo o meio 523. Os discos com o crescimento micelial foram depositados no centro das placas de Petri. Nesta mesma placa, com auxílio de uma alça de platina, repicou-se os isolados bacterianos em quatro pontos equidistantes de 25 mm do disco do patógeno (MARIANO, 1993). A testemunha consistiu no disco contendo apenas o crescimento micelial do patógeno repicado para placas de Petri, contendo o meio de cultura 523. As placas foram mantidas a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12h, durante 7 dias (Figura 3).

3.6. Antagonismo de isolados de *Bacillus* spp. contra *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*, pela produção de compostos orgânicos voláteis

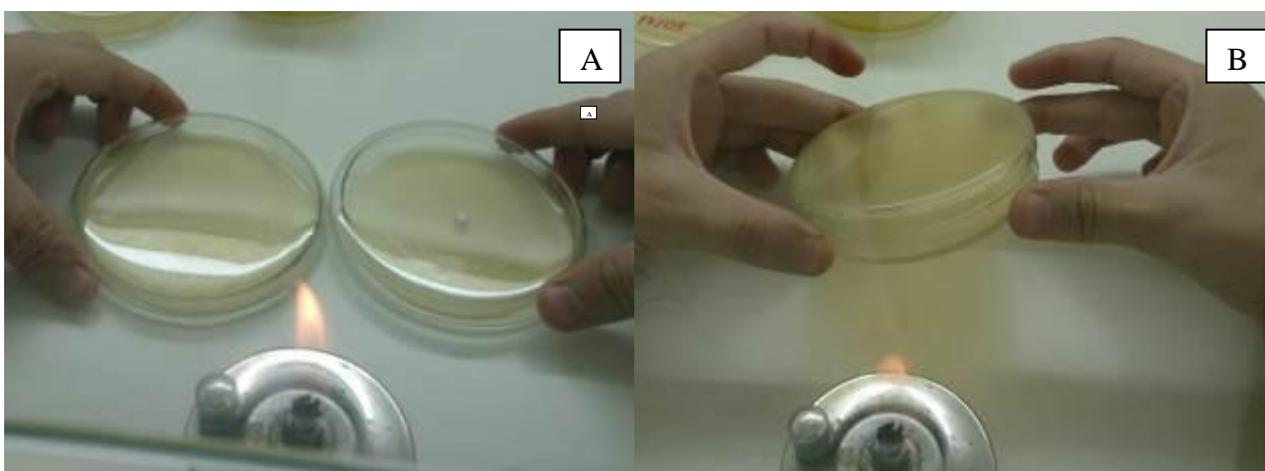
Foi utilizado o método de BHARAT et al. (1980), com algumas modificações. Os isolados dos antagonistas foram repicados, com auxílio de alça de platina, para placas de Petri, contendo meio de cultura 523 Kado. Posteriormente, foi transferido um disco de 5 mm de diâmetro de micélio do fungo FOC 27.9, com 7 dias de crescimento, na região central da placa de Petri, contendo também meio 523. Utilizou-se o fundo da placa com o antagonista e a tampa das placas de Petri, com o crescimento do patógeno (Figura 4).

Figura 3. Método do Pareamento de Culturas. Discos de 5 mm do isolado do patógeno FOC 27.9 (A). Placa de Petri contendo meio 523, distância do disco do patógeno no centro, para os pontos de 25 mm (B). Patógeno repicado com auxílio da alça de platina (C). Placas de Petri mantidas a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12h (D).



Fonte: autoria própria (2017).

Figura 4. Antagonismo de isolados de *Bacillus* spp. contra *F. oxysporum* f.sp. *cubense*, pela produção de compostos orgânicos voláteis. Placas contendo o antagonista e o patógeno (A). Sobreposição das placas de ambos os isolados (B).



Fonte: autoria própria (2017).

3.7. Antagonismo de isolados de *Bacillus* spp. no crescimento micelial de múltiplos fitopatógenos

O efeito de antagonismo de isolados de *Bacillus* spp. no crescimento micelial de múltiplos fitopatógenos foi conduzido, conforme descrito no item 3.5. Os fitopatógenos que foram testados pertenciam aos seguintes patossistemas: *Alternaria* sp. x *Solanum lycopersicum*; *Alternaria* sp. x *Fragaria x ananassa*; *Colletotrichum gloeosporioides* x *Anacardium occidentale*; *Colletotrichum musae* x *Musa* spp.; *Colletotrichum* spp. x *Fragaria x ananassa*; *Colletotrichum phomoides* x *Solanum lycopersicum*; *Rhizoctonia solani* x *Cucumis melo*; *Lasiodiplodia theobromae* x *Cucumis melo*; *Lasiodiplodia theobromae* x *Anacardium occidentale*; e *Fusarium guttiforme* x *Ananas* spp. Todos os isolados foram obtidos da Coleção de trabalho de fungos e bactérias, do Laboratório de Patologia Pós-colheita, da Embrapa Agroindústria Tropical (CNPAT). Enquanto que, o isolado de *R. solani* foi cedido pela Coleção Maria Menezes, da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife-PE. Os isolados dos patógenos foram repicados inicialmente em placas de Petri, contendo meio BDA e incubados na temperatura de 28°C, com fotoperíodo de 12 h, por 7 dias, antes da montagem do experimento.

3.8. Porcentagem de inibição do crescimento micelial

Para todos os experimentos conduzidos foi calculado a porcentagem de inibição do crescimento micelial dos patógenos do teste, pela seguinte fórmula (MENTEN et al., 1976), onde:

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

3.9. Delineamento experimental

O delineamento experimental, em todos os experimentos, foi inteiramente casualizado, com 3 repetições (cada repetição = uma placa). As avaliações foram efetuadas, para todos os experimentos, durante sete dias. Foi calculado a inibição do crescimento micelial (conforme item 3.8), para tal foram efetuadas medições da

distância entre as colônias, em dois sentidos diametralmente opostos, com auxílio de paquímetro marca DIGIMESS.

Para o teste de antagonismo entre isolados de *Bacillus* spp. x *F. oxysporum* f.sp. *cubense* foi utilizado 24 tratamentos, cada tratamento contendo um isolado de *Bacillus* spp. com resultado positivo para inibição de *F. oxysporum* f.sp. *cubense* (isolados: 15, 24, 31, 42, 44, 52, 59, 61, 66, 67, 68, 69, 71, 78, 85, 92, 98, 99, 107, 123, 130, 186 e 188) e a testemunha (placa contendo apenas o disco do patógeno). Enquanto que, os testes de antagonismo pela produção de compostos voláteis e de antagonismo a múltiplos patógenos, o delineamento experimental apresentou 6 tratamentos, cada tratamento contendo os isolados de *Bacillus* spp. que mais se destacaram no teste descrito em 3.5 (isolados: 44, 59, 71, 99 e 186) e a testemunha.

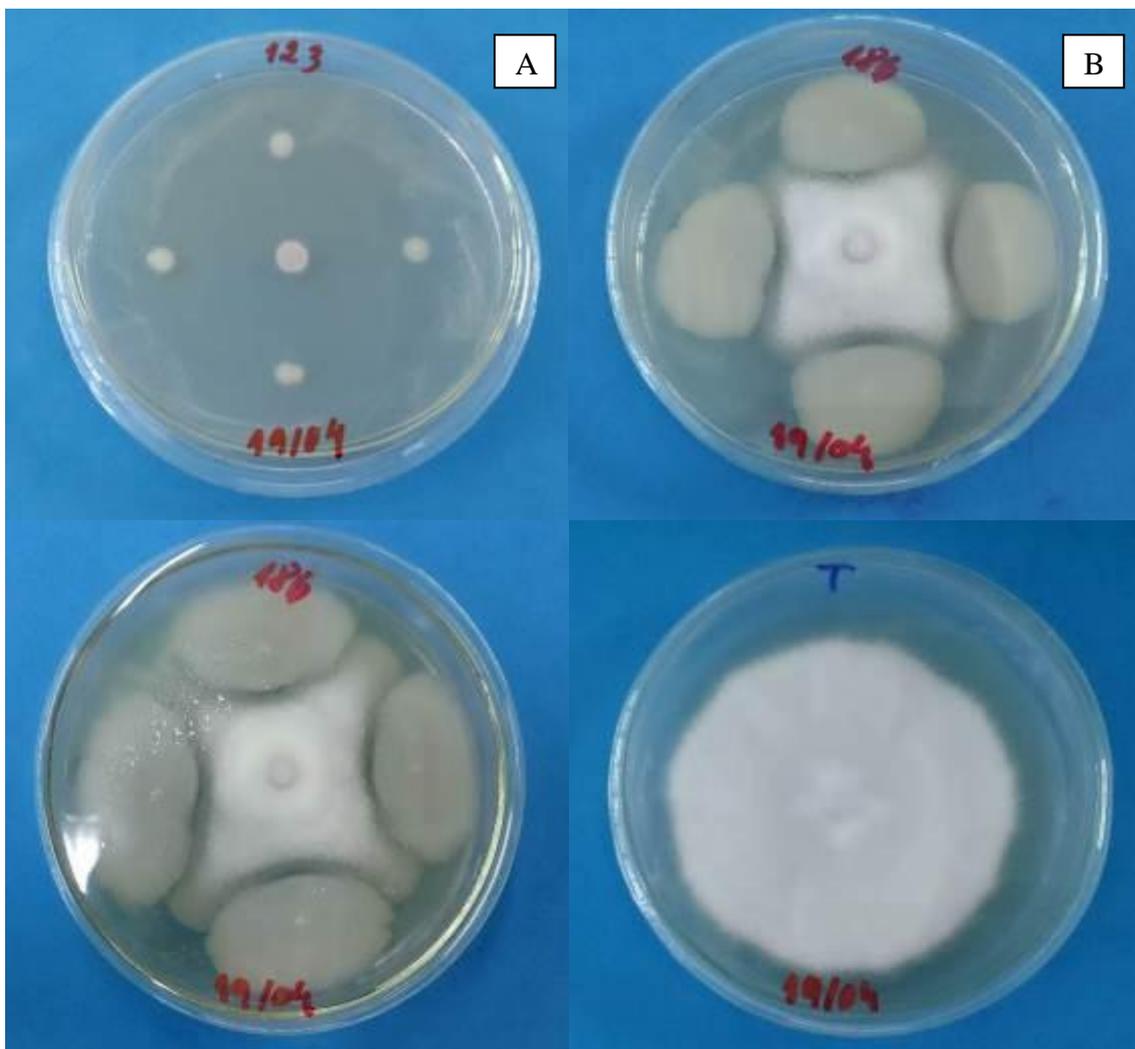
Todos os dados dos experimentos foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Scott Knott ($\alpha = 0,05\%$), utilizando o programa Assistat.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Efeito de isolados de *Bacillus* spp. no crescimento micelial de *F. oxysporum* f.sp. *ubense*

Dos 50 isolados testados de *Bacillus* spp. isolados da rizosfera da bananeira, 23 isolados apresentaram redução no crescimento micelial do patógeno (FOC), quando em contato com o antagonista (Figura 5, Tabela 4).

Figura 5. Antagonismo de isolados de *Bacillus* spp. contra *F. oxysporum* f.sp. *ubense*, pelo Método do Pareamento de Culturas. Placa contendo o antagonista e o patógeno com 1 dia de crescimento (A). Placa com 5 dias de crescimento (B). Placa com 7 dias de crescimento (C). Placa contendo apenas o patógeno com 7 dias de crescimento (D).



Fonte: autoria própria (2017).

Tabela 4. Resultado positivo (+) e negativo (-) do antagonismo dos isolados de *Bacillus* spp. coletados da rizosfera da bananeira, cultivadas comercialmente e não cultivadas, nas diferentes áreas de produção dos Estados do Ceará, Rio Grande do Norte e Bahia.

Isolado	Localização	Teste de antagonismo	Isolado	Localização	Teste de antagonismo
1	Baturité	-	86	Mombaça	-
10	Guaramiranga	-	92	Iguatu	+
15	Pacoti	+	95	Iguatu	-
16	Pacoti	-	97	Iguatu	-
20	Limoeiro do Norte	-	98	Barro Alto-Iguatu	+
24	Limoeiro do Norte	+	99	Barro Alto-Iguatu	+
28	Limoeiro do Norte	-	105	Missão Velha	-
31	Russas	+	107	Missão Velha	+
42	Cruz das Almas	+	109	Missão Velha	-
44	Barbalha	+	111	Missão Velha	-
45	Ubajara	-	114	Missão Velha	-
48	Ubajara	-	115	Tabuleiro do Norte	-
52	Fortaleza	+	116	Tabuleiro do Norte	-
55	Canindé	-	121	Tabuleiro do Norte	-
59	Canindé	+	123	Tabuleiro do Norte	+
61	Canindé	+	124	Tabuleiro do Norte	-
66	Itatira	+	125	Tabuleiro do Norte	-
67	Aratuba	+	126	Limoeiro do Norte	-
68	Aratuba	+	127	Limoeiro do Norte	-
69	Aratuba	+	128	Quixeré	-
70	Redenção	-	130	Quixeré	+
71	Redenção	+	186	Assu	+
75	Quixeramobim	-	188	Assu	+
78	Quixeramobim	+	194	Ipanguaçu	-
85	Mombaça	+	RAB9*	UFRPE	-

* O isolado RAB9 foi obtido de folhas de rabanete.

Fonte: autoria própria (2017).

Dos 23 isolados de *Bacillus* spp. testados no teste de antibiose, cinco (44, 59, 71, 99 e 186) apresentaram as melhores inibições do crescimento micelial de FOC, quando comparados com a testemunha (Tabela 5). A porcentagem de inibição do crescimento variou de 44.29 a 61.95%, quando comparado com a testemunha.

Tabela 5. Inibição do crescimento micelial e porcentagem de inibição de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*, avaliada pelo método da dupla cultura, por isolados de *Bacillus* spp.

Isolado	Crescimento micelial (cm)*	% da inibição	Isolado	Crescimento micelial (cm)*	% da inibição
15	45.34b	46.72	71	32.38c	61.95
24	43.59b	48.77	78	46.55b	45.29
31	40.85b	51.99	85	44.82b	47.33
42	44.67b	47.50	92	41.43b	51.31
44	38.6c	54.64	98	45.91b	46.05
52	47.4b	44.29	99	39.3c	53.81
59	35.23c	58.60	107	45.54b	46.48
61	46.12b	45.80	123	42.16b	50.45
66	42.99b	49.48	130	40.49b	52.42
67	43.39b	49.01	186	34.9c	58.98
68	41.16b	51.63	188	41.57b	51.15
69	41.99b	50.65	Testemunha**	85.09a	

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si, pelo Teste de Scott Knott, ao nível de 5% $p < 0,5$ de significância. CV (%) = 8,62. ** Testemunha consistiu apenas do disco do fungo em placa.

Fonte: autoria própria (2017).

Os cinco isolados de *Bacillus* spp. que destacaram-se com as menores médias de crescimento micelial da colônia de FOC foram: isolado 44 (Barbalha), 59 (Canindé), 71 (Redenção), 99 (Barro Alto-Iguatu) e 186 (Assu). Os demais isolados diferiram estatisticamente da testemunha que continha apenas o patógeno, entretanto apresentaram as maiores médias de crescimento micelial, quando comparados a estes cinco isolados.

Tem-se constatado em vários trabalhos que, o principal mecanismo de ação dos microrganismos envolvidos no controle biológico é a antibiose (ROMEIRO, 2007). Na antibiose, ocorre a interação entre organismos, e, um metabólito produzido por um deles

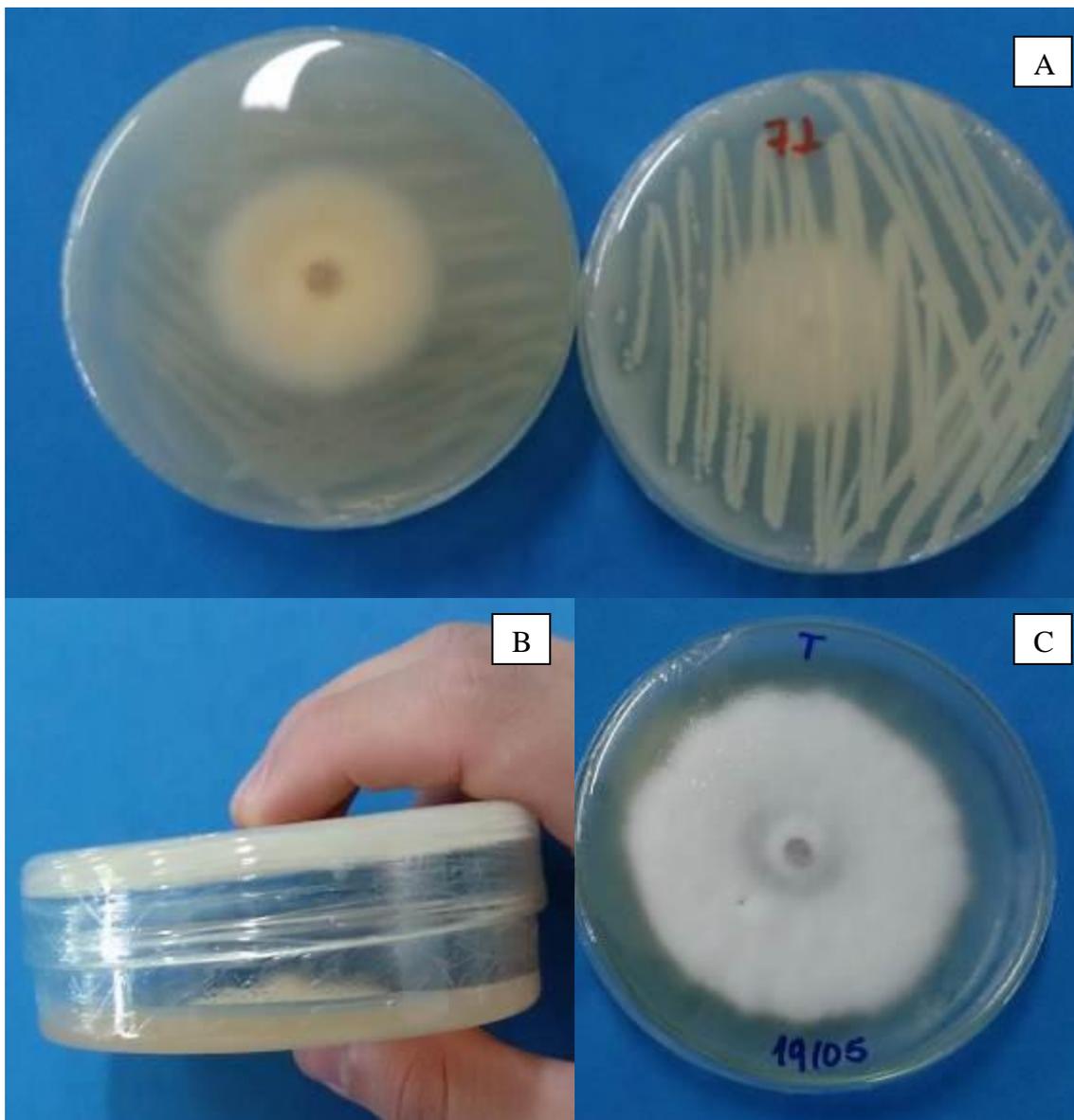
tem um efeito inibidor sobre o outro. O isolado 186 (Assu) produz sideróforo, protease, lipase, amilase e esterase se destacando em produção de enzimas com relação aos demais isolados, que produziram apenas urease, protease ou esterase, como observado por Lopes (2016). Essas enzimas degradam componentes da parede celular de fungos, como glucanas e quitinas, resultando na destruição de hifas e propágulos (CHIN-A-WOENG et al., 2003), o que pode justificar a ação destes isolados, no presente estudo. Oliveira (2011), testando 10 isolados de *Bacillus* spp. no controle do crescimento micelial de *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*, observou que todos os isolados inibiram o crescimento micelial do patógeno. Os isolados que destacaram-se foram o B12 (*Bacillus* sp.), B41 (*B. cereus*), B22 (*B. pentothenicus*), B45 (*B. cereus*), B47 (*B. cereus*) que apresentaram as menores médias de diâmetro da colônia. Enquanto que, Nascimento (2009) no ensaio com dezoito isolados de *Bacillus* spp. no controle do crescimento micelial de *Pyricularia grisea*, visualizou que quinze isolados promoveram uma maior inibição do crescimento micelial. Os isolados que mereceram destaque foram o B41 (*B. cereus*), B33 (*B. polymyxa*), BSB1 (*B. lentus*), B6 (*Bacillus* sp.) e B31 (*B. pumilus*).

No presente estudo, a porcentagem de inibição do crescimento micelial (P.I.C) de FOC atingiu valor máximo de 61.95%. Esta inibição foi proporcionada pelo isolado 71 (Redenção), 58.98%; pelo 186 (Assu), 58.60%; pelo 59 (Canindé), 54.64%; pelo 44 (Barbalha) e 53.81% pelo isolado 99 (Barro Alto-Iguatu). O menor percentual observado foi do isolado 52 (Fortaleza) com 44.29%. Soares et al. (2009), trabalhando com isolados de *Streptomyces* contra *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, obteve valores de inibição do crescimento micelial variando de 49.1% (isolado AC-26) até 94.2% (isolado AC-92). Os resultados indicam a capacidade dos isolados de *Bacillus* spp. coletados da rizosfera de bananeira, em controlar o fungo fitopatogênico *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, sendo fortes candidatos a serem utilizados em programas de controle biológico.

4.2. Antagonismo de isolados de *Bacillus* spp. contra *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*, pela produção de compostos orgânicos voláteis

Dos cinco isolados testados de *Bacillus* spp. isolados da rizosfera da bananeira, todos apresentaram redução no crescimento micelial do patógeno (FOC), através da produção de compostos orgânicos voláteis (Figura 6).

Figura 6. Antagonismo de isolados de *Bacillus* spp. contra *F. oxysporum* f.sp. *cubeense*, pela produção de compostos orgânicos voláteis. Placas contendo o antagonista e o patógeno com 7 dias de crescimento (A). Placa com vista lateral (B). Placa contendo apenas o patógeno com 7 dias de crescimento (C).



Fonte: autoria própria (2017).

Dos cinco isolados (44, 59, 71, 99 e 186) de *Bacillus* spp. testados no teste de compostos orgânicos voláteis, quatro (59, 71, 99 e 186) apresentaram as melhores inibições do crescimento micelial de FOC, quando comparados com a testemunha (Tabela 7). A porcentagem de inibição

do crescimento variou de 34.45 a 49.7%, quando comparado com a testemunha que continha apenas o disco do patógeno.

Tabela 6. Inibição do crescimento micelial e porcentagem de inibição de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*, avaliada pela produção de compostos orgânicos voláteis, por isolados de *Bacillus* spp.

Isolado	Crescimento micelial (cm)*	% da inibição
44	52,82b	34,46
59	42,43c	47,35
71	42,46c	47,31
99	44,24c	45,10
186	40,8c	49,37
Testemunha**	80,59a	

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si, pelo Teste de Scott Knott, ao nível de 5% ($p < 0,5$) de significância. CV (%) = 10,00. ** Testemunha consistiu apenas do disco do fungo em placa.

Fonte: autoria própria (2017).

Dias (2011), trabalhando com o agente de biocontrole *Trichoderma* spp. contra o patógeno *Sclerotium rolfii*, obteve resultados que chegaram em até 55% (isolado T-12) da redução do crescimento micelial de *S. rolfii*. Segundo Lopes (2016) os isolados de *Bacillus* spp., utilizados no presente trabalho, não produzem HCN e Amônia, dois grandes inibidores microbianos. Embora os isolados 44, 59, 71, 99 e 186 não produzam HCN e amônia, compostos voláteis como os álcoois, aldeídos, cetonas e sulfetos também apresentam atividade antagonista (WHEATLEY, 2002) e poderiam estar sendo produzidos pelos isolados. Yuan et al., (2012), estudando a atividade de produção de compostos orgânicos voláteis por *Bacillus amyloliquefaciens* (isolado NJN-6) contra *F. oxysporum* f.sp. *cubense* obteve resultados de inibição do crescimento micelial que variaram de 30 a 40%, durante 3 dias de avaliação, com relação a testemunha. Ainda segundo o autor, foi detectado 36 compostos produzidos pelo isolado NJN-6, incluindo 12 benzenos, sete alquilas, três álcoois, sete cetonas, dois aldeídos, três naftilos (radical derivado da naftalina), um éster e um éter.

4.3. Antagonismo de isolados de *Bacillus* spp. no crescimento micelial de múltiplos fitopatógenos

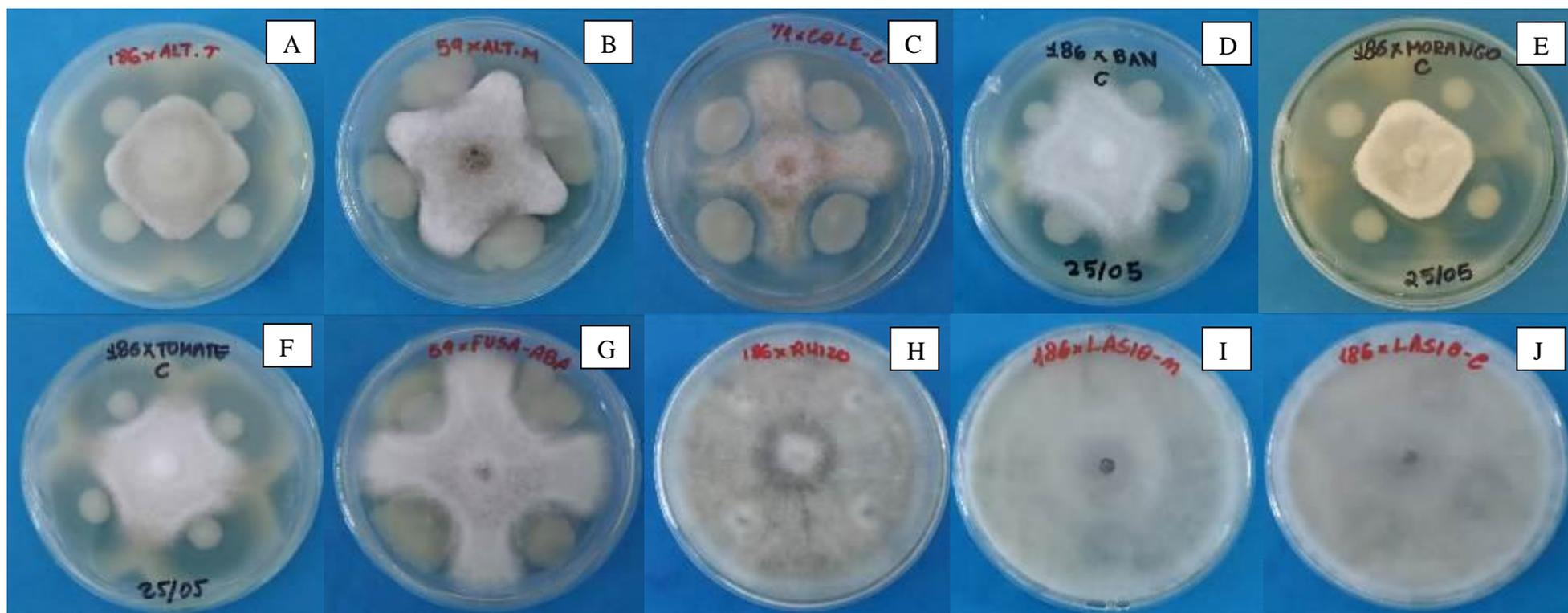
Dos cinco isolados testados (44, 59, 71, 99 e 186) de *Bacillus* spp. nenhum reduziu o crescimento micelial dos patógenos: *R. solani* x *C. melo*, *L. theobromae* x *C. gloeosporioides* e *L. theobromae* x *C. melo*. Os demais patógenos foram controlados pelos isolados testados (Figura 7. Tabela 7 e 8).

O isolado 59 diferiu estatisticamente na inibição do crescimento micelial com relação aos demais isolados, apresentando uma redução de 53.62% no crescimento de *Alternaria* sp. x *S. lycopersicum*. O isolado 44 diferiu estatisticamente dos demais isolados, com uma redução de 48.52% no crescimento de *Alternaria* sp. x *F. x ananassa*. Os isolados 44, 59, 99 e 186 não diferiram entre si no controle de *C. gloeosporioides* x *A. occidentale*, tendo uma redução do crescimento micelial variando entre 54.68% (isolado 99) a 59.42% (isolado 186). Os isolados 59, 71 e 186 não diferiram entre si no controle de *Colletotrichum* spp. x *F. x ananassa*, variando entre 54.09% (isolado 59) a 55.50% (isolado 71). Os isolados não diferiram entre si, embora da testemunha, no controle in vitro de *C. musae* x *Musa* spp., *C. phomoides* x *S. lycopersicum*, e *F. guttiforme* x *Ananas* spp.

Zhang et al (2016), trabalhando com *Bacillus amyloliquefaciens* (IBFCBF-1) no controle de *Phytophthora capsici*, na cultura do pimentão (*Capsicum annum*) observou a capacidade do biocontrolador em inibir o crescimento micelial também de fungos pertencentes a diferentes patossistemas, como *R. solani* x *Linum usitatissimum*, *F. oxysporum* f.sp. *cucumerinum* x *Cucumis sativus*, *Rhizoctonia solani* x *Solanum tuberosum*, *Rhizoctonia solani* x *Oryza sativa* e *Sclerotinia sclerotiorum* x *Capsicum annum*, obtendo halos de inibição de até 40 mm contra *S. sclerotiorum*.

Os resultados do presente trabalho demonstram a capacidade de bactérias do gênero *Bacillus* spp. em controlar fungos fitopatogênicos, até mesmo em diferentes patossistemas, o que ressalta as vantagens da sua utilização em programas de controle biológico. Tamanho potencial explica o fato de que, cada vez mais, se tem grupos de pesquisa voltando seus interesses com a bioprospecção e *screening* de microrganismos procariontes, visando selecionar os mais promissores para biocontrole de enfermidade de plantas.

Figura 7. Antagonismo de isolados de *Bacillus* spp. no crescimento micelial de múltiplos fitopatógenos: *Alternaria* sp. x *Solanum lycopersicum* (A). *Alternaria* sp. x *Fragraria x ananassa* (B). *Colletotrichum gloeosporioides* x *Anacardium occidentale* (C), *Colletotrichum musae* x *Musa* spp. (D). *Colletotrichum* spp. x *Fragraria x ananassa* (E). *Colletotrichum phomoides* x *Solanum lycopersicum* (F). *Fusarium guttiforme* x *Ananas* spp. (G). *Rhizoctonia solani* x *Cucumis melo* (H). *Lasiodiplodia theobromae* x *Cucumis melo* (I). *Lasiodiplodia theobromae* x *Anacardium occidentale* (J).



Fonte: autoria própria (2017).

Tabela 7. Antagonismo de isolados de *Bacillus* spp. no crescimento micelial de fitopatógenos: *Alternaria* sp. x *Solanum lycopersicum* (A). *Alternaria* sp. x *Fragraria x ananassa* (B). *C. gloeosporioides* x *A. occidentale* (C), *C. musae* x *Musa* spp. (D).

Isolado	Crescimento micelial (cm)							
	A*	% da inibição	B*	% da inibição	C*	% da inibição	D*	% da inibição
44	41.32b	47.38	39.58c	48.52	35.32c	58.18	52.74b	32.64
59	36.42c	53.62	43.24b	43.76	35.77c	57.65	44.48b	43.19
71	42.33b	46.09	43.64b	43.24	42.20b	50.04	50.58b	35.40
99	42.23b	46.22	46.39b	39.67	38.28c	54.68	SC	SC
186	41.72b	46.87	43.39b	43.57	34.27c	59.42	45.78b	41.53
Testemunha**	78.52a		76.89a		84.46a		78.30a	
CV (%)	3.63		4.22		10		6.62	

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si, pelo Teste de Scott Knott, ao nível de 5% ($p < 0,5$) de significância. SC = Sem controle. Fungo não apresentou controle positivo. ** Testemunha consistiu apenas do disco do fungo em placa.

Fonte: autoria própria (2017).

Tabela 8. Antagonismo de isolados de *Bacillus* spp. no crescimento micelial de fitopatógenos: *Colletotrichum* spp. x *Fragraria x ananassa* (E), *Colletotrichum phomoides* x *Solanum lycopersicum* (F), *Fusarium guttiforme* x *Ananas* spp. (G).

Isolado	Crescimento micelial (cm)					
	E*	% da inibição	F*	% da inibição	G*	% da inibição
44	41.04b	47.84	49.62b	40.22	42.48b	48.04
59	36.12c	54.09	47.67b	42.57	40.48b	50.49
71	35.01c	55.50	47.32b	42.99	43.69b	46.56
99	45.99b	41.55	SC	SC	SC	SC
186	35.23c	55.22	48.68b	41.35	44.54b	45.52
Testemunha**	78.68a		83a		81.76a	
CV	7.14		6.68		5.55	

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si, pelo Teste de Scott Knott, ao nível de 5% ($p < 0,5$) de significância. SC = Sem controle. Fungo não apresentou controle positivo. ** Testemunha consistiu apenas do disco do fungo em placa.

Fonte: autoria própria (2017).

5. CONCLUSÕES

Os isolados de *Bacillus* spp. apresentaram resultados positivos, *in vitro*, para controle de *F. oxysporum* f. sp. *cubense*, agente causal do mal do Panamá.

Os isolados foram capazes de produzir compostos orgânicos voláteis e controlar o crescimento micelial de *F. oxysporum* f. sp. *cubense*.

Os isolados controlaram o crescimento micelial *in vitro* de outros fitopatógenos, de importância agrícola.

Dessa forma pode-se recomendar os isolados 44, 59, 71, 99 e com destaque para o 186, como promissores para uso futuro, *in vivo*, no controle do mal do Panamá da bananeira.

REFERÊNCIAS

- AGROFIT.** <Disponível em: http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons> Acesso em: 13/06/2017.
- FAO.** <Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#home>> Acesso em: 10/05/2017.
- IBGE-SIDRA.** <Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/>> Acesso em: 10/05/2017.
- MIDIC-ALICEWEB.** <Disponível em: <http://aliceweb.mdic.gov.br/>> Acesso em: 10/05/2017.
- AMORIM, L.; REZENDE, J. A.; FILHO, A. B. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos.** 4. ed. Piracicaba: Agronômica Ceres, 704p. 2011.
- BAKKER, P. A. H. M.; RAN, L. X.; PIETERSE, C. M. J.; LOON, L. C. Understanding the involvement of rhizobacteria mediated induction of systemic resistance in biocontrol of plant diseases. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 25, p, 5-9, 2003.
- BASHAN, Y. Inoculants of plant growth promoting bacteria for use in agriculture. **Biotechnology Advances**, v. 16, n. 4, p. 729-770, 1998.
- BELL, D.K.; WELLS, H.D.; MARKHAM, C.R. In vitro antagonismo of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. **Phytopathology**. v. 72, p. 379 – 382, 1982.
- BERG, G. Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. **Applied Microbiology Biotechnology**. v. 84, p. 11-18, 2009.
- BHARAT, R.; SINGH, V.N. SING, D.B. *Trichoderma viride* as a mycoparasite of *Aspergillus* spp. **Plant and Soil**, v.57, p. 131-135, 1980.
- BONATERRA, A.; MARI, M.; CASALINI, L.; MONTESINOS, E. Biological control of *Monilia laxa* and *Rhizopus stolonifer* in postharvest of stone fruit by *Pantoea agglomerans* EPS125 and putative mechanisms of antagonismo, **International Journal of Food Microbiology**, v. 84, n.1, p. 93-104, 2003.
- BORGES, A. L. Cultivo da Bananeira para o Agropolo Jaguaribe-Apodi. **Sistema de Produção**, p. 1–84, 2014.
- CARVALHO, F. W.; BATISTA, M.A.; OLIVEIRA, J.B.; PEREIRA, A.N.; GONÇALVES, J.L. Estudo do Mercado da Banana no estado do Ceará de 1974 a 1995. **Escola Agrotécnica Federal de Iguatu**, 2007.
- CHIN-A-WOENG, T. F. C.; BLOEMBERG, G. V.; LUGTENBERG, B. J. Phenazines and their role in biocontrol by *Pseudomonas* bacteria. **New Phytologist**, v. 157, n. 3, p. 503-523, 2003.
- COOK, R.J.; BAKER, K.F. **The nature and practice of biological control of plant pathogens.** St. Paul, Minnesota: APS Press, American phytopathological. Society, p. 539, 1983.

- DIAS, P.P. Controle biológico de fitopatógenos de solo por meio de isolados de fungos do gênero *Trichoderma* e sua contribuição no crescimento de plantas. 2011. 114 f. **Tese (Doutorado em Ciências)**. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, RJ. 2011.
- DUFFY, B.K. SCHOUTEN, A.; RAAIJMAKERS, J. M. Pathogen self defense: mechanisms to counteract microbial antagonism. **Annual Review Phytopathology**, v. 41, p. 501-538, 2003.
- ERRINGTON, J. Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. **Nature Reviews Microbiology**. v. 1, p. 117-126, 2003.
- FRAVEL, D.R. Role in antibiosis in the biocontrol of plant diseases. **Annual Review of Phytopathology**, v. 26, p. 75-91, 1988.
- FRAVEL, D. R. 2005. Commercialization and implementation of biocontrol. **Annual Reviews Phytopathology**. V. 43, p. 337-359, 2005.
- HAMDACHE, A.; LAMARTI, A.; ALEU, J.; COLLADO, I. G. Non peptide metabolites from the genus *Bacillus*. **Journal of Natural Products**. V. 74, p. 893 – 899, 2011.
- HESLOP-HARRISON J.S.; SCHWARZACHER T. Domestication, genomics and the future for banana. **Annual of Botany**, v. 100, p. 1073–1084, 2007.
- KHAN, A. M.; SAXERNA, S.K.; SIDDIQI, Z. A. Efficacy of *Tagetes erecta* in reduction root infesting nematodes of tomato and okra. **Indian Phytopathology**, v. 24, p. 166-169, 1971.
- LEE, G. W.; KO, J. A.; OH, B.T., CHOI, J. R.; LEE, K. J.; CHAE, J. C; HAMALA, S. Biological control of postharvest diseases of apples, peaches and nectarines by *Bacillus subtilis* S16 isolated from halophytes rhizosphere. **Biocontrol Science and Technology**. V. 22, p. 351-361, 2012.
- LIM, H. S.; LEE, J. M.; KIM, S. D. A plant growth-promoting *Pseudomonas fluorescens* GL20: Mechanism for disease suppression, outer membrane receptors for ferric siderophore, and genetic improvement for increase and biocontrol efficacy. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 12, n. 2, p. 249-257, 2002.
- LOPES, L. A. Seleção de espécies de *Bacillus* com potencial para promoção de crescimento de mudas micropropagadas de bananeira. **Monografia (Biotecnologia)** Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016. 87p.
- LUCY, M.; REED, E.; GLICK, B-R. Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 86, n. 1, p.1-25, 2004.
- MADIGAN, M.D.; ROMEIRO, R.S.; POMELLA, A.W.V.; SILVA, G.B.S.; DEUNER, C.C. Detecção de compostos antifúngicos produzidos por bactérias residentes de filoplano de cacaueteiro contra *Crinipellis pernicioso* em condições de laboratório. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, p. 386, 2001.
- MARIANO, R.L.R. Métodos de seleção *in vitro* para o controle microbiológico de patógeno de plantas. **Revisão Annual de Patologia de Plantas**, v.1, p. 369-409, 1993.

- MATHRE, D.E.; COOK, R.J.; CALLAN, N.W. Traversing the world of commercializing biocontrol agents for plant disease control. **Plant Disease**, v. 83, p 972-983, 1999.
- MENTEN, J.O.M.; MINUSSI, C.C.; CASTRO, C.; KIMATI, H. Efeito de alguns fungicidas no crescimento micelial de *Macrophominia phaseolina* (Tass.) Goid. “in vitro”. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 1, n. 2, p. 57-61, 1976.
- NASCIMENTO, I. O. Isolamento, identificação e seleção de *Bacillus* spp. para o biocontrole de fitopatógenos do arroz. **Dissertação** (Mestrado em Agroecologia) Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, 2009. 109p.
- NEILANDS, J.B.; Perspectives in biochemistry and biophysics – Siderophores. **Archives in Biochemistry and Biophysics**, v. 302, p. 1-3, 1993.
- NEILANDS, J.B. Siderophores: Structure and functions of microbial iron transport compounds. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, p. 26723-26726, 1995.
- NICHOLSON, W.L. Roles of *Bacillus* endospores in the environment. **Cellular and Molecular Life Sciences**. v. 59, p. 410 – 416, 2002.
- NOBBE, F.; HILTNER, L. Inoculation of the soil for cultivating leguminous plants, **US Patent No. 570.813**, 1896.
- OLIVEIRA, L.J.M.G.; SILVA, M.S.B.S.; LIMA, O.D.R.; ROCHA, E.R.C.; SANTOS, L.V.S. RODRIGUES, A.A.C. Avaliação in vitro do antagonismo de *Bacillus* spp. a *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopercisi*. **Caderno de Agroecologia**. v. 6, p. 1-5, 2011.
- PLOETZ, R.C.; ZENTMYER, G.A.; NISHIJIMA, W.T.; ROHRBACH, K.G.; OHR, H.D. **Compendium of tropical fruit diseases**. St. Paul: APS Press/American Phytopathology Society, p 88, 1994.
- RIKKEN, G. G.; KROON, A.G.M., VAN GINKEL, C.G. Transformation of (per) chlorate into chloride by a newly isolated bacterium: reduction and dismutation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 45, p. 420-426, 1996.
- ROMEIRO, R.S. **Bactérias fitopatogênicas**. Viçosa, MG: Editora UFV. v. 1, 2005. 409p.
- ROMEIRO, R.S. **Controle biológico de enfermidades de plantas: fundamentos**. Viçosa, UFV, 2007.
- SANTOYO, G.; OROZCO, M. D.; GOVINDAPPA, M. Mechanisms of biocontrol and plant growth-promoting activity in soil bacterial species of *Bacillus* and *Pseudomonas*: a review. **Biocontrol Science Technology**. V.22, p. 855-872, 2012.
- SIMMONDS, N.W, SHEPHERD, K. The taxonomy and origins of the cultivated bananas. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 55, p. 302–312, 1955.
- SIMOONDS N.W, WEATHERUP STC. Numerical taxonomy of the wild bananas (*Musa*). **New Phytologist**, v. 155, p. 567-571, 1990.

SONG, Y.; LOGAN, B.E. Inhibition of aerobic respiration and dissimilatory perchlorate reduction using cyanide. **FEMS Microbiology Letters**, v. 239, p. 229-234, 2004.

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

WHIPPS, J. M. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, p. 487-511, 2001.

YIN, S. W.; CHANG, J.K.; XUN, P. C. Studies in the mechanisms of antagonistic fertilizer "5406" IV. The distribution of the antagonist in soil and its influence on the rhizosphere. **Acta Microbiologica Sinica**, v. 11, p. 259-288, 1965.

YUAN, J.; RAZA, W.; SHEN, Q.; HUANG, Q. Antifungal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 volatile compounds against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 78, p. 5942-5944, 2012.

ZHANG, M.; LI, J.; SHEN, A., TAN, S.; YAN, Z., YU, Y. XUE, Z., TAN, T., ZENG, L. Isolation and identification of *Bacillus amyloliquefaciens* IBFCBF-1 with potential for biological control of *Phytophthora* blight and growth promotion of pepper. **Journal of Phytopathology**, v 164, p. 1012-1021, 2016.