



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA
CURSO DE AGRONOMIA

ALICE MARIA SILVA DE CARVALHO

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE ISOLADOS DE *Fusarium*
oxysporum ASSOCIADOS AO MAL DO PANAMÁ E INIBIÇÃO *in vitro* DO
CRESCIMENTO MICELIAL POR ISOLADOS DE *Bacillus***

FORTALEZA

2022

ALICE MARIA SILVA DE CARVALHO

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE ISOLADOS DE *Fusarium oxysporum* ASSOCIADOS AO MAL DO PANAMÁ E INIBIÇÃO *in vitro* DO CRESCIMENTO MICELIAL POR ISOLADOS DE *Bacillus*

Monografia apresentada ao Curso de Agronomia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Engenheira Agrônoma.

Orientador: Prof. Dr. Cristiano Souza Lima

Coorientadora: Dra. Christiana de Fátima Bruce da Silva

FORTALEZA – CEARÁ

2022

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)

C321c Carvalho, Alice Maria Silva de.
Caracterização morfológica de isolados de *Fusarium oxysporum* associados ao mal do Panamá e inibição *in vitro* do crescimento micelial por isolados de *Bacillus* / Alice Maria Silva de Carvalho. – 2022.
57 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Curso de Agronomia, Fortaleza, 2022.

Orientação: Prof. Dr. Cristiano Souza Lima.

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

1. Controle biológico. 2. Mal do Panamá. 3. Antibiose. I. Título.

CDD 630

ALICE MARIA SILVA DE CARVALHO

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE ISOLADOS DE *Fusarium oxysporum* ASSOCIADOS AO MAL DO PANAMÁ E INIBIÇÃO *in vitro* DO CRESCIMENTO MICELIAL POR ISOLADOS DE *Bacillus*

Monografia apresentada ao Curso de Agronomia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Engenheira Agrônoma.

Aprovada em: 28/01/2022.

BANCA EXAMINADORA

Prof. D.Sc Cristiano Souza Lima (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

D.Sc Christiana de Fátima Bruce da silva
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa)

Ms.Sa Regimara Francisca Bernardo da Silva
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Ms.Sa Diene Elen Miranda da Silva
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.

Aos meus pais, Janeide e Flávio.

Às minhas irmãs, Amanda e Ana
Sophia.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me permitiu aprender e amadurecer muito durante esses anos de graduação, conviver com tantas pessoas incríveis, superar tantas adversidades e ser grata por tudo o que vivi e otimista em relação ao meu futuro.

Aos meus pais Janeide e Flávio Carvalho que sempre acreditaram e apoiaram os meus estudos, e pelo suporte na realização deste trabalho, meu orgulho e amo muito vocês.

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.

Ao Prof. Dr. Cristiano Souza Lima, pela confiança, extrema paciência, disponibilidade e excelente orientação.

À minha coorientadora Dra. Christiana Bruce, por ter confiado em mim e dedicado bastante tempo para me orientar e ensinar. Por toda a paciência e ajuda durante todo o desenvolvimento do projeto e da escrita dessa monografia.

Ao Tiago de Souza, meu namorado, por sua compreensão, incentivo, amor e companheirismo durante os anos de graduação em Agronomia. Você sempre foi meu maior fã e esse apoio foi essencial para concluir essa jornada.

À minha família, em especial às minhas irmãs Amanda e Ana Sophia que sempre estiveram ao meu lado encorajando e consolando em todos os momentos.

À equipe do laboratório de Fitopatologia da Embrapa Agroindústria Tropical, em especial a Regimara e ao Wallysson pelo tempo e pela assistência durante a realização das análises.

A todos os meus amigos do curso, em especial, Ana Vigília, Daniele e Laylton, obrigada por todo apoio, ajuda, conselhos, risadas, amor e companheirismo. Vocês tornaram essa jornada acadêmica mais leve e me ensinaram muito sobre amizade verdadeira, serei eternamente grata a Agronomia por ter me dado esta família.

Aos meus amigos Letícia, Raquel, Amanda Ellen, Vitória Carolina e Oliver, graças a vocês eu pude manter o bom humor até nos momentos mais difíceis.

“Uma das lições com as quais eu cresci foi a de sempre permanecer verdadeira consigo mesma e nunca deixar que as palavras de alguém distraiam você dos seus objetivos.”

Michelle Obama

RESUMO

A banana (*Musa* spp.) é a fruta mais consumida *in natura* no mundo e o Brasil se destaca como o quarto maior produtor mundial. Entretanto, a sua produção tem sido afetada por várias doenças, dentre as quais destaca-se o mal do Panamá, cujos agentes causais são espécies filogenéticas de fungos que compreendem a morfoespécie *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (*Foc*), e atualmente destaca-se entre as maiores ameaças para a bananicultura mundial. O controle desta doença consiste no uso de variedades resistentes e controle cultural. Assim, estudos relacionados ao controle biológico tem se mostrado promissores e dentre os microrganismos utilizados no controle biológico destacam-se as bactérias do gênero *Bacillus*. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi caracterizar a morfologia de isolados de *Foc* e investigar a inibição *in vitro* do seu crescimento micelial por isolados de *Bacillus*. Para tal, cinco isolados de *Foc* foram obtidos de plantas sintomáticas e caracterizados quanto à variação de coloração da colônia, crescimento micelial e micromorfologia. Posteriormente, estes cinco isolados foram submetidos a dois testes de antibiose *in vitro* para verificação da atividade antagonista das cepas bacterianas LPPC159, LPPC170, LPPC265 e LPPC272. Todas as cepas bacterianas apresentaram capacidade de inibição do crescimento micelial dos isolados fúngicos quando comparados com a testemunha. Entretanto, os isolados LPPC170 e LPPC265 destacaram-se apresentando as maiores porcentagens de inibição. No primeiro teste a cepa LPPC170 apresentou inibição do crescimento micelial dos isolados fúngicos entre 47,3% e 72,1%, enquanto o isolado bacteriano LPPC265 apresentou inibição do crescimento micelial dos isolados fúngicos entre 47,8% e 70,4%. Já no segundo teste de antibiose *in vitro*, a cepa LPPC170 apresentou inibição do crescimento micelial dos isolados fúngicos entre 55,6% e 67,8%, enquanto a cepa LPPC265 apresentou inibição do crescimento micelial dos isolados fúngicos entre 54,7% e 64,8%. Conclui-se que os isolados do *Foc* apresentaram a maioria das características micromorfológicas típicas do complexo FOOSC, sendo que algumas variações podem ser causadas pela diferença entre as possíveis espécies e linhagens. As cepas de *Bacillus* inibiram o crescimento micelial *in vitro* dos isolados de *Foc*, sendo as cepas bacterianas mais promissoras LPPC170 e LPPC265.

Palavras-chave: Controle biológico, mal do Panamá, Antibiose.

ABSTRACT

Banana (*Musa* spp.) is the most consumed fresh fruit in the world and Brazil stands out as the fourth largest producer worldwide. However, its production has been affected by several diseases, among which stands out the Panama disease, whose causal agents are phylogenetic species of fungi that comprise the morphospecies *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (*Foc*), and currently stands out among the greatest threats to the world banana industry. The control of this disease consists of the use of resistant varieties and cultural control. Thus, studies related to biological control have shown promise and among the microorganisms used in biological control are bacteria of the genus *Bacillus*. Thus, the objective of this study was to characterize the morphology of *Foc* isolates and investigate the in vitro inhibition of mycelial growth by *Bacillus* isolates. To this end, five isolates of *Foc* were obtained from symptomatic plants and characterized as to colony coloration variation, mycelial growth and micromorphology. Subsequently, these five isolates were submitted to two in vitro antibiosis tests to verify the antagonist activity of the bacterial strains LPPC159, LPPC170, LPPC265 and LPPC272. All bacterial strains showed ability to inhibit mycelial growth of the fungal isolates when compared to control. However, isolates LPPC170 and LPPC265 showed the highest percentages of inhibition. In the first test, the LPPC170 strain presented inhibition of the mycelial growth of the fungal isolates between 47.3% and 72.1%, while the bacterial isolate LPPC265 presented inhibition of the mycelial growth of the fungal isolates between 47.8% and 70.4%. In the second in vitro antibiosis test, the LPPC170 strain inhibited the mycelial growth of fungal isolates between 55.6% and 67.8%, while the LPPC265 strain inhibited the mycelial growth of fungal isolates between 54.7% and 64.8%. It is concluded that *Foc* isolates showed most of the typical micromorphological characteristics of the FOOSC, and some variations may be caused by the difference between possible species and strains. *Bacillus* strains inhibited the in vitro mycelial growth of *Foc* isolates, the most promising bacterial strains being LPPC170 and LPPC265.

Key words: Biological control, Panama disease, Antibiosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Sintomatologia do mal do Panamá	21
Figura 2 - Isolados de <i>F. oxysporum</i> em meio de cultura BDA.	25
Figura 3 - Cepas de <i>Bacillus</i> cultivadas em meio de cultura 523.....	26
Figura 4 - Efeito das cepas de <i>Bacillus</i> na inibição do crescimento micelial de isolados de <i>Fusarium oxysporum</i>	29
Figura 5 - Pigmentação do micélio aéreo e reverso de colônias de <i>Fusarium oxysporum</i>	31
Figura 6 - Estruturas micromorfológicas do isolado RFB64 de <i>F. oxysporum</i>	33
Figura 7 - Estruturas micromorfológicas do isolado RFB65 de <i>F. oxysporum</i>	34
Figura 8 - Estruturas micromorfológicas do isolado RFB86 de <i>F. oxysporum</i>	35
Figura 9 - Estruturas micromorfológicas do isolado RFB95 de <i>F. oxysporum</i>	36
Figura 10 - Estruturas micromorfológicas do isolado RFB115 de <i>F. oxysporum</i> ...	37
Figura 11 - Porcentagem de inibição de crescimento micelial dos isolados RFB 64, RFB 65, RFB 86, RFB 95 e RFB 115 de <i>Fusarium oxysporum</i> pelas cepas LPPC159, LPPC170, LPPC265 e LPPC272 de <i>Bacillus</i>	43
Figura 12 - Teste de antibiose <i>in vitro</i> da inibição de crescimento micelial dos isolados RFB 64, RFB 65, RFB 86, RFB 95 e RFB 115 de <i>Fusarium oxysporum</i> pelas cepas LPPC159, LPPC170, LPPC265 e LPPC272 de <i>Bacillus</i>	44
Figura 13 - Crescimento micelial dos isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> RFB64, RFB65, RFB86, RFB95 e RFB115.	45
Figura 14 - Efeito das cepas bacterianas de <i>Bacillus</i> no crescimento micelial dos isolados de <i>Fusarium oxysporum</i>	46
Figura 15 - Interação entre as cepas LPPC159, LPPC170, LPPC265 e LPPC272 de <i>Bacillus</i> e o crescimento micelial dos isolados RFB 64, RFB 65, RFB 86, RFB 95 no primeiro teste de antibiose <i>in vitro</i>	47
Figura 16 - Interação entre as cepas LPPC159, LPPC170, LPPC265 e LPPC272 de <i>Bacillus</i> e o crescimento micelial dos isolados RFB 64, RFB 65, RFB 86, RFB 95 no segundo teste de antibiose <i>in vitro</i>	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Origem dos isolados de <i>F. oxysporum</i> utilizados no estudo.	25
Tabela 2 - Cepas de <i>Bacillus</i> utilizadas no estudo.	26
Tabela 3 - Coloração das colônias e crescimento micelial dos isolados de <i>F. oxysporum</i>	32
Tabela 4 - Tamanho mínimo, médio e máximo de comprimento e largura dos microconídios de isolados de <i>F. oxysporum</i>	38
Tabela 5 - Tamanho mínimo, médio e máximo de comprimento e largura dos macroconídios de isolados de <i>Fusarium oxysporum</i>	39
Tabela 6 - Porcentagem de inibição de crescimento micelial de isolados de <i>F. oxysporum</i> por cepas de <i>Bacillus</i> , no primeiro e segundo teste de antibiose <i>in vitro</i>	40
Tabela 7 - Composição do meio de cultivo Kado & Heskett 523 (1970).	56
Tabela 8 - Composição do meio de cultivo BDA.....	54
Tabela 9 - Composição do meio de cultivo SNA.	57
Tabela 10 - Influência das cepas bacterianas no crescimento micelial dos isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> , no primeiro teste de antibiose <i>in vitro</i>	55
Tabela 11 - Influência das cepas bacterianas no crescimento micelial dos isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> , no segundo teste de antibiose <i>in vitro</i>	56

LISTA DE SÍMBOLOS

g	Gramas
%	Porcentagem
mm	Milímetro
μm	Micrômetro

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGRIANUAL	Anuário estatístico da Agricultura Brasileira
BDA	Batata dextrose ágar
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
PIC	Porcentagem de crescimento micelial
SNA	<i>Spezieller Nährstoffarmer Agar</i>
TACO	Tabela brasileira de composição de alimentos

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1. Aspectos botânicos da banana.....	17
2.2. Aspectos econômicos da cultura da banana.....	18
2.3. Mal do Panamá na cultura da banana.....	19
2.4. Agente etiológico do mal do Panamá.....	19
2.5. Mal do Panamá: sintomatologia e controle.....	20
2.6. Controle biológico do mal do Panamá.....	21
3. OBJETIVOS.....	23
3.1. Objetivos gerais.....	23
3.2. Objetivos específicos.....	23
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
4.1. Origem dos isolados de <i>F. oxysporum</i> utilizados no estudo.....	24
4.2. Origem das cepas de <i>Bacillus</i> utilizadas no estudo.....	25
4.3. Caracterização morfológica dos isolados de <i>F. oxysporum</i>	27
4.4. Preparo dos isolados de <i>Foc</i> e <i>Bacillus</i> para o teste de antagonismo.....	27
4.5. Efeito das cepas de <i>Bacillus</i> na inibição do crescimento micelial de isolados de <i>F. oxysporum</i>	28
4.6. Porcentagem de inibição do crescimento micelial de isolados de <i>Foc</i>	29
4.7. Delineamento experimental.....	30
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
5.1. Caracterização morfológica dos isolados de <i>F. oxysporum</i>	31
5.2. Efeito de cepas de <i>Bacillus</i> no crescimento micelial de isolados de <i>Fusarium oxysporum</i>	40
6. CONCLUSÕES.....	50
REFERÊNCIAS.....	51
ANEXO.....	56

1. INTRODUÇÃO

A banana (*Musa* spp.) é uma fruta de grande importância por ser cultivada em grande parte dos países do mundo. Destaca-se com uma das frutas de maior consumo global *in natura* e apresenta-se como uma fonte de alimento de alto valor nutricional. Possui grande importância econômica e social em países em desenvolvimento como o Brasil. Isso se deve ao fato de que uma das principais características da bananicultura é que a atividade é formada principalmente por pequenos produtores. Embora a produção brasileira de banana seja a quarta maior do mundo, ainda apresenta dificuldades que afetam sua produtividade, dentre elas destacam-se as doenças (DONATO *et al.*, 2021).

As doenças que afetam a bananeira podem ser causadas por diferentes agentes etiológicos, como os fungos, vírus, bactérias, nematóides. Estes agentes afetam as raízes, rizoma, sistema vascular, folha e frutos da bananeira comprometendo diretamente sua produção. Entre as principais doenças que afetam a bananicultura estão: a murcha de *Fusarium*, sigatokas amarela e negra, moko da bananeira, nematoide cavernícola e vírus das estrias da bananeira (DONATO *et al.*, 2021).

A murcha de *Fusarium* ou mal do Panamá é causada por espécies filogenéticas de fungos pertencentes ao complexo de espécies *Fusarium oxysporum* (FOOSC) e identificadas morfológicamente e por patogenicidade como *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* W.C. Snyder & H.N. Hansen (*Foc*) e atualmente é considerada a maior ameaça para a bananicultura mundial, sendo causada por fungos de solo que possuem estruturas de resistência, os clamidósporos, que podem permanecer até 30 anos no solo, mesmo na ausência de hospedeiro. Atualmente o controle desta doença consiste no uso de variedades resistentes e controle cultural. Entretanto, estudos relacionados ao controle biológico têm se mostrado promissores (PLOETZ, 2015; MARYANI *et al.*, 2019).

O controle biológico consiste na utilização de microrganismos que tenham ação antagonista ao patógeno, causando a redução parcial ou total de sua população. Estudos relacionados ao biocontrole vêm sendo desenvolvidos no Brasil desde 1950, entretanto avanços consideráveis vêm sendo alcançados desde 2008. Dentre os micro-organismos utilizados no controle biológico destacam-se as

bactérias do gênero *Bacillus*. Estudos realizados por Rodríguez *et al.* (2017) e Alves (2017) demonstraram que a utilização de cepas de bactérias do gênero *Bacillus in vitro* reduziram o crescimento micelial do isolado de *F. oxysporum* f. sp. *cubense*.

Desta forma, visando alcançar uma medida de controle eficaz para o mal do Panamá e considerando que as bactérias *Bacillus* vêm apresentando ação antagonista ao fungo e uma capacidade promissora de controle, o objetivo deste estudo foi realizar a caracterização morfológica de isolados de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* e investigar a capacidade de antagonismo de bactérias do gênero *Bacillus* contra este fungo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Aspectos botânicos da banana

A bananeira (*Musa* spp.) é uma monocotiledônea herbácea perene pertencente à ordem *Zingiberales* e à família *Musaceae*. Tem como provável centro de origem o continente asiático. Entretanto, também são reconhecidos como centros de origem secundários desta frutífera, o continente africano e ilhas do Pacífico (D'HONT *et al.*, 2012; MARYANI *et al.*, 2019).

A banana apresenta um elevado valor nutricional e energético. É uma fruta de baixo teor calórico e de gordura, com níveis consideráveis das vitaminas tiamina, riboflavina, piridoxina, niacina e C, além de sais minerais como cálcio, potássio, fósforo, sódio e magnésio (TACO, 2011).

A bananeira apresenta um caule subterrâneo chamado de rizoma. No rizoma, se originam as raízes primárias, que possuem distribuição radial horizontal e são responsáveis pela estrutura geral do sistema radicular. O seu sistema radicular é fasciculado e a maior parte das raízes ficam concentradas na porção mais superficial do solo, nas profundidades de 40 cm. Do centro da sua copa, surge a inflorescência que se caracteriza por ser do tipo bráctea ovalada, de coloração roxo-avermelhada, em cujas axilas nascem as flores, de onde surgirão os frutos (BORGES *et al.*, 2014; DONATO *et al.*, 2021).

Quanto ao porte, a bananeira pode chegar até 3 m de altura, não apresentando lignificação ou espessamento secundário do caule. Isso se deve ao fato de apresentar um pseudocaule que é formado pela união das bainhas das folhas, cuja parte terminal é formada por uma copa de folhas compridas e largas, com nervura central desenvolvida (DONATO *et al.*, 2021).

É uma planta típica de regiões tropicais úmidas. A temperatura e a umidade são fatores muito importantes para o seu cultivo, sendo as faixas ideais de temperatura entre 26-28 °C e a umidade relativa acima de 80%. Além disso, alta luminosidade e ventos com velocidades inferiores a 40 km/h favorecem o seu cultivo (MATOS *et al.*, 2019).

2.2. Aspectos econômicos da cultura da banana

A bananicultura tem uma importância expressiva no setor agrícola mundial visto que a banana é a fruta *in natura* mais consumida no mundo. Com uma expressiva produção de bananas, o Brasil ocupou a quarta posição no ranking mundial em 2020 com uma produção de 6,63 milhões de toneladas de banana em uma área colhida de 455 mil hectares (ROCHA *et al.*, 2021; FAO, 2021).

Apesar da crise econômica que foi agravada pela pandemia da COVID-19, o setor agrícola manteve o crescimento e o mesmo se aplica ao setor da bananicultura. Na safra de 2020 a produção nacional foi de 6,71 milhões de toneladas e no ano de 2021 alcançou-se a marca de 7 milhões de toneladas produzidas (SCHNEIDER *et al.*, 2020; AGRIANUAL, 2021; IBGE, 2021).

A banana é cultivada em todas as regiões do país, sendo a região Nordeste a segunda maior produtora, com 2,28 milhões de toneladas produzidas, perdendo apenas para região Sudeste com 2,31 milhões de toneladas em 2020 (IBGE, 2020). Dentre os estados do Nordeste, o Ceará se destaca como terceiro maior produtor, com uma safra de 431,017 mil toneladas em 2020, atrás apenas do estado da Bahia cuja produção foi de 785 mil toneladas e do estado de Pernambuco cuja produção foi de 481,962 mil toneladas (IBGE, 2021).

No estado do Ceará, os municípios de Barbalha e Missão Velha destacam-se como produtores de banana, visto que nos últimos anos têm apresentado uma expansão na área cultivada. Estima-se que no período entre 2010 e 2018 houve um acréscimo de 1052 hectares nesta região do Cariri cearense (OLIVEIRA *et al.*, 2019).

Entretanto, os pequenos produtores têm sofrido com os impactos da pandemia da COVID-19, devido ao aumento dos custos de produção, dificuldades na distribuição e logística, bem como o aumento na oferta do produto que diminuiu o preço de mercado. A tendência mostra que o mercado está buscando uma produção de maior qualidade e para isso faz-se necessária a otimização das estruturas de produção com uso de tecnologias para melhorar o manejo no campo até a comercialização (SCHNEIDER *et al.*, 2020; AGRIANUAL, 2021).

2.3. Mal do Panamá na cultura da banana

A bananicultura enfrenta vários problemas no seu processo produtivo. Um dos principais empecilhos está associado ao manejo fitossanitário de doenças, visto que estas ocasionam danos e perdas consideráveis à cultura (DITA *et al.*, 2018).

O mal do Panamá é a principal doença associada à cultura da banana, sendo descrita como uma das doenças mais destrutivas que pode causar perdas de até 100% (PLOETZ, 2015; WARMAN *et al.*, 2018). Em plantações de banana na Indonésia, Taiwan e Malásia estimaram-se perdas de 121 milhões e 253 milhões de dólares, respectivamente (HERMANTO *et al.*, 2012).

O agente causal do mal do Panamá é o fungo *F. oxysporum* f. sp. *cubense*. Estima-se que a origem da doença seja no sudeste asiático, entretanto foi descrito pela primeira vez na Austrália em 1876 por Bancroft (PLOETZ, 2015; MARYANI *et al.*, 2019).

No Brasil, a doença foi relatada pela primeira vez em Piracicaba em 1930, infectando as cultivares Maçã, Prata e Ouro que são suscetíveis ao fungo, o que acarretou a inviabilização da produção na região (AMORIM *et al.*, 2018).

2.4. Agente etiológico do mal do Panamá

O agente causal do mal do Panamá, *F. oxysporum* f. sp. *cubense* é um fungo de solo, no qual apresenta capacidade de sobrevivência neste habitat. Esta sobrevivência é realizada através de clamidósporos, que são estruturas assexuais de resistência, constituídas de reserva nutritiva e parede celular espessa, permitindo resistir aos fatores externos. A formação dessas estruturas de resistência dificulta o controle da doença em áreas já afetadas pelo *Foc*. Estudos têm sugerido que, os clamidósporos podem ser capazes de permanecer viáveis no solo por até 30 anos, mesmo na ausência de hospedeiro (STOVER, 1972; PLOETZ, 2006).

As características micromorfológicas para espécies do complexo *Fusarium oxysporum* são a presença de esporodóquios de forma abundantes, com coloração variando entre branco e laranja. Entretanto, alguns isolados não apresentam esporodóquios. Os esporos formados nos esporodóquios (aqui denominados macroconídios) possuem comprimento de curto a médio, formato que tem variações entre reto e falcado, geralmente apresentando três septações. Normalmente, os macroconídios são formados em monofiálides em conidióforos ramificados presentes

nos esporodóquios, porém também podem ser formados de monofiálides em hifas. Enquanto que, os esporos do micélio aéreo (aqui denominados microconídios) geralmente possuem formato oval, elíptico ou reniformes e não possuem septações. São formados em falsas cabeças em monofiálides nas hifas, sua ocorrência é abundante no micélio aéreo. Já os clamidósporos têm formato circular, apresentam parede lisa ou áspera e são formados através da modificação das hifas em um período que pode variar entre 2 a 6 semanas (LESLIE & SUMMERELL, 2006). O fungo se caracteriza também por apresentar um micélio branco que varia de levemente amarelado a púrpuro (AMORIM *et al.*, 2018).

Pesquisas filogenéticas realizadas demonstram que o *F. oxysporum* f. sp. *cubense* contém diferentes linhagens filogenéticas e faz parte do complexo de espécies *Fusarium oxysporum* que apresenta diversas linhagens patogênicas (O'DONNELL *et al.*, 1998; MARYANI *et al.*, 2019).

2.5. Mal do Panamá: sintomatologia e controle

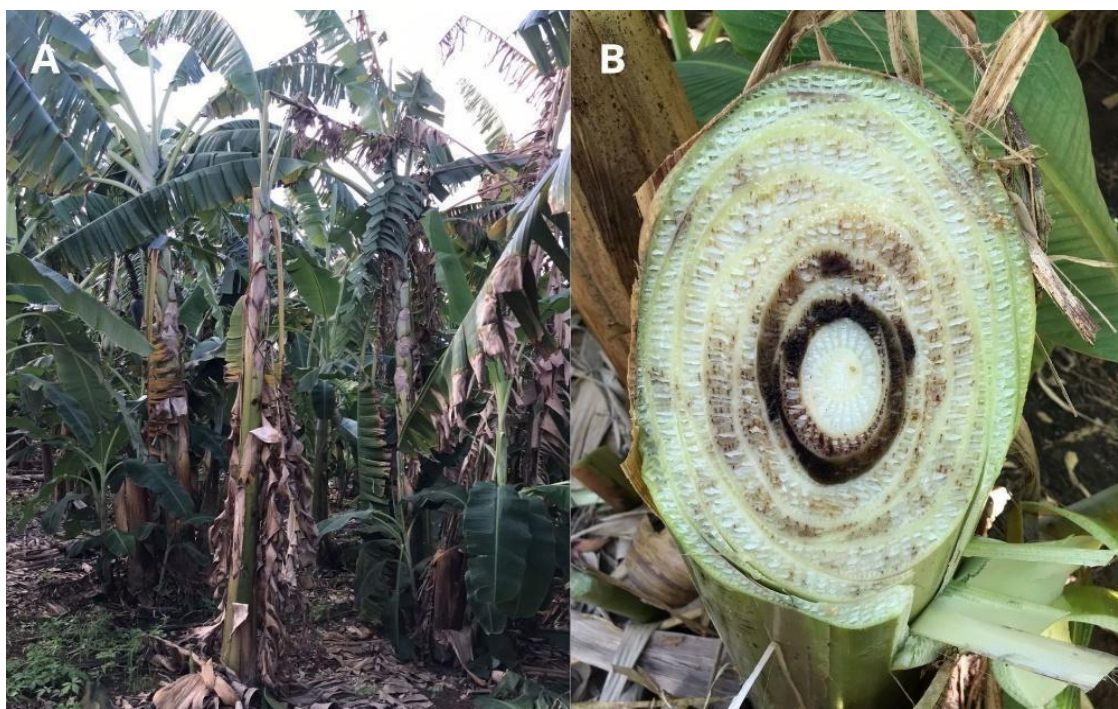
Os sintomas externos ou sintomas reflexos da doença incitada por *Foc* iniciam-se em plantas mais velhas, onde ocorre o amarelecimento das suas folhas, seguidas pelas folhas mais jovens. Os sintomas começam pelos bordos do limbo foliar e evoluem no sentido da nervura principal. Com a agravamento da doença ocorre a murcha, a necrose marginal e a queda de folhas. As flores e frutos podem cair e ocorrer também a divisão do pseudocaule. Já os sintomas internos são caracterizados pelo escurecimento dos vasos do xilema, o qual progride formando um círculo concêntrico periférico de coloração pardo avermelhada, que pode ser observado através de um corte transversal feito no pseudocaule e no rizoma (Figura 1) (AMORIM *et al.*, 2018; WARMAN, 2018).

O manejo eficaz e de longo prazo do mal do Panamá tem sido um desafio. Atualmente, as medidas de controle adotadas consistem no emprego de práticas culturais e a utilização de variedades resistentes como 'Nanica', 'Nanicão', 'Grande Naine', 'Terra', 'Caipira', 'Thap Maeo', 'Pacovan Ken', 'Preciosa' e 'Maravilha', dentre outras. Entre as práticas culturais, destacam-se: a) evitar instalar os novos plantios em áreas com histórico da doença; b) usar mudas oriundas da cultura de tecidos (micropropagadas) e sadias; c) fazer a correção do pH; d) dar preferência a solos ricos em matéria orgânica; e) adubar as plantas da maneira recomendada; e f) fazer o controle

de nematóides. Além disso, deve ser realizada a erradicação de plantas doentes (BORGES, 2006; BORGES, 2014).

Entretanto, a longo prazo, essas medidas têm-se mostrado pouco eficazes, ainda mais com a expansão da raça tropical 4 (TR4) nas áreas de cultivo. Esta raça é ainda ausente no país, mas tem ocasionado apreensão devido à detecção de focos na América do Sul, em países como Colômbia e Peru (ACUÑA *et al.*, 2021). Dessa forma, a busca por alternativas para o manejo do mal do Panamá tem sido ação imperativa. Uma dessas alternativas viáveis seria o uso do controle biológico. Esse método de controle consiste na utilização de micro-organismos antagonistas que possuem ação biocontroladora aos microrganismos fitopatogênicos (COOK & BAKER, 1983).

Figura 1 - Sintomatologia do mal do Panamá



Fonte: Vieira, 2021.

A – Sintomas secundários da murcha de *Fusarium*, B - Sintomas primários da murcha de *Fusarium*.

2.6. Controle biológico do mal do Panamá

O controle biológico é a redução de inóculo das atividades determinantes da doença provocadas por um patógeno, realizada através de um ou mais microrganismos (COOK & BAKER, 1983). No Brasil, o primeiro relato do uso do controle biológico foi no ano de 1950. Entretanto, apenas em 2008 foi registrado o primeiro produto biológico para controle de doenças de plantas, o biofungicida contendo o fungo antagonista *Trichoderma harzianum* (MORANDI & BETTIOL, 2009).

Desde então, a utilização do biocontrole vem sendo cada vez constante, principalmente como estratégia de controle em situações em que o controle químico e genético não é viável ou é limitado, como no caso do mal do Panamá. Além disso, o controle biológico é uma alternativa sustentável que propicia o equilíbrio ecológico dos sistemas agrícolas (AMORIM *et al.*, 2018).

As bactérias estão entre os principais agentes antagonistas envolvidos no controle biológico, dentre as quais destacam-se as rizobactérias. Estes microrganismos são normalmente encontrados na rizosfera das plantas e quando inoculados nas plantas, seja por tratamento de sementes, aplicação no sulco de plantio, pulverização na parte aérea ou aplicação na água de irrigação são capazes de realizar o controle de enfermidades nas plantas (BETTIOL & GHINI, 2009; AMORIM *et al.*, 2018).

As rizobactérias do gênero *Bacillus* são umas das mais estudadas atualmente quando se trata de controle biológico. Grande parte dos produtos comerciais biológicos tem como princípio ativo os bacilos (LOPES, 2009). O sucesso dessas bactérias no controle de fitopatógenos está relacionado aos seus mecanismos de ação como a antibiose, indução de resistência, competição e promoção de crescimento (GANG *et al.*, 2013; AMORIM *et al.*, 2018).

Tratando-se das bactérias do gênero *Bacillus*, estudos constataram que um dos seus principais mecanismos de ação antagônica é a antibiose, que consiste na produção de uma ou mais moléculas com ação direta sobre o crescimento ou fisiologia dos fitopatógenos. Há relatos da produção de enzimas como quitinase, lipase e β 1,3-glucanase que são capazes de degradar as paredes celulares de fungos fitopatogênicos (GOWTHAM *et al.*, 2016; FREITAS, 2017; AMORIM *et al.*, 2018).

Estudos foram realizados com a utilização de *Bacillus* spp. para controle da raça 1 de *Foc* e foi possível verificar que algumas cepas bacterianas diminuiram o crescimento micelial do fungo (ALVES, 2017; RODRÍGUEZ *et al.*, 2017). Portanto, a investigação da relação de antagonismo entre as bactérias do gênero *Bacillus* e *F. oxysporum* f. sp. *cubense* oriundas do Nordeste brasileiro é de grande importância, visto que esta estratégia de controle se mostra promissora.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos gerais

Caracterizar a morfologia de isolados de *F. oxysporum* e investigar a inibição *in vitro* do seu crescimento micelial por cepas de *Bacillus*.

3.2. Objetivos específicos

Determinar as características morfológicas de isolados de *F. oxysporum*:

- a) Quanto a pigmentação do micélio, o crescimento micelial,
- b) Presença e coloração de esporodóquio;
- c) Tamanho e forma de microconídios;
- d) Tamanho e forma de macroconídios;
- e) Presença de falsas cabeças;
- f) Características de células conidiogênicas.

Identificar as cepas de *Bacillus* que apresentam antagonismo aos isolados de *F. oxysporum in vitro*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os experimentos foram desenvolvidos nos Laboratórios de Fitopatologia e Solos (Microbiologia do Solo), da Embrapa Agroindústria Tropical (CNPAT), localizado em Fortaleza – CE, no período de novembro a dezembro de 2021.

4.1. Origem dos isolados de *F. oxysporum* utilizados no estudo.

Os isolados de *Foc* foram obtidos de pseudocaule de bananeiras sintomáticas. Para tal, a coleta foi realizada executando um corte longitudinal no pseudocaule entre 50 e 100 cm da base, com o auxílio de ferramentas cortantes previamente desinfetadas. Após esse corte, foi retirado um fragmento do pseudocaule aproximadamente com as seguintes dimensões: 15 cm de altura x 10 cm de largura x 3-5 cm de profundidade, evitando áreas de avançada decomposição dos tecidos. Ainda em campo, a partir desse fragmento foram retirados os feixes vasculares e subsequentemente retirou-se o excesso de umidade dos feixes coletados com o auxílio de papel toalha estéril. Por fim, o armazenamento dos feixes sem o excesso de umidade foi feito em tubos tipo Falcon (GASPAROTTO *et al.*, 2020).

Com o material coletado em campo, seguiu-se para o laboratório para proceder o isolamento indireto do fungo (ALFENAS & MAFFIA, 2007). Após esse procedimento, foi feita uma sequência de isolamentos. O reisolamento consistiu na retirada de um disco de micélio de 5 mm da placa resultante do isolamento indireto, esse disco foi repicado em uma placa de Petri contendo meio de cultura BDA. Com o crescimento de sete dias do fungo nesta placa se observou a homogeneidade da cultura e posteriormente repicou-se um disco de micélio da placa reisolada em uma nova placa de Petri contendo meio de cultura BDA. Os isolados fúngicos foram repicados consecutivamente seguindo essa metodologia a fim de se obter uma cultura visualmente homogênea. Em seguida, foi realizado o cultivo monospórico para a obtenção de cultura pura (Figura 2).

Tabela 1 - Origem dos isolados de *F. oxysporum* utilizados no estudo.

Código de coleta	Espécie	Município	Material coletado	Coordenadas Geográficas	Cultivar
RBF64	<i>F. oxysporum</i>	Limoeiro do Norte-CE	Pseudocaule	5° 6.3120' S 38° 2.3080' W	Maçã
RBF65	<i>F. oxysporum</i>	Limoeiro do Norte-CE	Pseudocaule	5° 6.3120' S 38° 2.3080' W	Maçã
RBF86	<i>F. oxysporum</i>	Russas-CE	Pseudocaule	-	Maçã
RBF95	<i>F. oxysporum</i>	Ipanguaçu-RN	Pseudocaule	-	Maçã
RBF 115	<i>F. oxysporum</i>	Alto do Rodrigues-RN	Pseudocaule	5° 23' 27, 149" S 36° 44' 31,735" W	Maçã

Fonte: Vieira, 2021. *Dados de coordenadas não obtidos.

Figura 2 - Isolados de *F. oxysporum* em meio de cultura BDA.

Fonte: Autora, 2021.

A - Isolado RFB64; B - Isolado RFB65; C - Isolado RFB86; D - Isolado RFB95; E - Isolado RFB115.

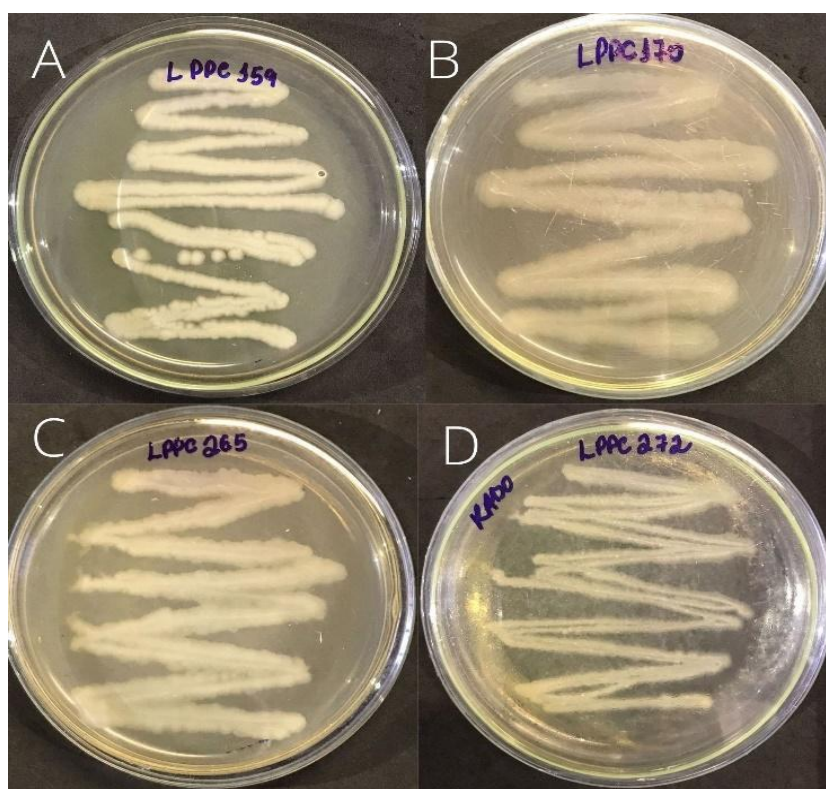
4.2. Origem das cepas de *Bacillus* utilizadas no estudo

As cepas de *Bacillus* utilizadas no estudo foram previamente identificadas por sequenciamento de DNA, após serem obtidas da rizosfera de bananeiras, e estão depositadas na Coleção de trabalho do Laboratório de Solos (Microbiologia dos Solos) (Figura 3 e Tabela 2).

Tabela 2 - Cepas de *Bacillus* utilizadas no estudo.

Código	Código de coleta	Espécie	Município	Coordenadas Geográficas	Cultivar
LPPC 159	61	<i>B. altitudinis</i> complex	Canindé- CE	S04°20'47,88"W039°17'57,9"	Maçã
LPPC 170	186	<i>B. cereus</i> group	Assu - RN	S05°31'33,5"W36°55'44,7"	Williams
LPPC 265	71	<i>Bacillus</i> sp.	Redenção - CE	S04°13'39"W38°43'45,7"	Pacovan
LPPC 272	99	<i>Bacillus</i> sp.	Iguatu - CE	S06°26'49,4"W039°22'27,6"	Pacovan

Fonte: Silva, 2015.

Figura 3 - Cepas de *Bacillus* cultivadas em meio de cultura 523.

Fonte: Autora, 2021.

A - Cepa de *Bacillus* LPPC159; B - Cepa de *Bacillus* LPPC170;

C - Cepa de *Bacillus* LPPC265; D - Cepa de *Bacillus* LPPC272.

4.3. Caracterização morfológica dos isolados de *F. oxysporum*

A caracterização morfológica dos cinco isolados de *Foc* foi realizada quanto à pigmentação da colônia, crescimento micelial e micromorfologia (LESLIE & SUMMERELL, 2006).

Para a avaliação da pigmentação da colônia foram utilizadas três repetições para cada isolado (cada repetição= uma placa de Petri). Em câmara de fluxo laminar, um disco de micélio de 5 mm foi transferido para placas de Petri de 90 mm contendo meio de cultura BDA. Posteriormente, estas placas foram incubadas durante 12 dias a 23 °C de temperatura e com um fotoperíodo de 12 horas. A avaliação desse experimento foi feita por comparação visual com a cartela de coloração de Rayner (1970). Para a avaliação do crescimento micelial seguiu-se a mesma metodologia para repicagem dos isolados. Entretanto, as colônias ficaram incubadas por três dias na temperatura de 25 °C e no escuro. Após os três dias, o experimento foi avaliado medindo-se o diâmetro das colônias com o auxílio de paquímetro marca DIGIMESS.

Já para a caracterização micromorfológica, utilizou-se três repetições de cada um dos cinco isolados, onde os discos de micélio de 5 mm foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura SNA e fragmentos secos e esterilizados de folhas de cravo (*Dianthus caryophyllus* L.). A incubação foi feita por 10 a 14 dias a 20 °C de temperatura e com fotoperíodo de 12 horas. As características micromorfológicas observadas foram: a) presença ou não de esporodóquios e sua coloração; b) tipos de fiálides; c) presença ou não de clamidósporos; d) tamanho, formato e septação de microconídios e de macroconídios através da medição de 50 estruturas; e) presença ou não de falsas cabeças. As dimensões dos macroconídios e microconídios foram obtidas por meio do programa Motic Images Plus 2.0.

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

Os isolados de *Foc* estavam preservados em tubos de ensaio contendo o meio de cultura SNA. Enquanto, os isolados de *Bacillus* estavam preservados em tubos de ensaio contendo meio de cultura 523 inclinado e mantidos sob refrigeração a 10 °C.

Os isolados de *Bacillus* foram ativados realizando o repique dos mesmos, para placas de Petri de 90 mm de diâmetro, contendo meio 523 e incubados por 24h na temperatura de 28 °C, com fotoperíodo de 12 horas. Ao mesmo tempo que 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 de 12 h e incubados por um período de 7 dias.

4.5. Efeito das cepas de *Bacillus* na inibição do crescimento micelial de isolados de *F. oxysporum*

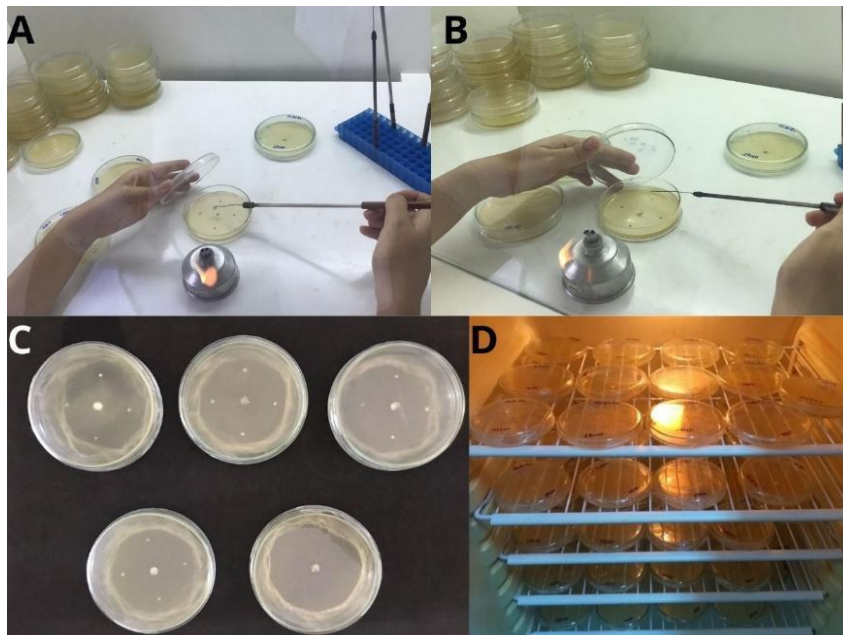
Para o estudo do efeito antagonista das cepas de *Bacillus* contra os isolados de *Foc*, foi utilizada uma adaptação do método de BHARAT *et al.* (1980).

Os isolados de *Bacillus* e *Foc* foram cultivados de acordo com o item 4.4. Posteriormente, em câmara de fluxo laminar, transferiu-se um disco de 5 mm de diâmetro do crescimento micelial de *Foc*, para placas de Petri com 90 mm de diâmetro, contendo meio 523. Os discos de *Foc* foram depositados no centro das placas de Petri. Nesta mesma placa, com auxílio de uma agulha flambada, repicou-se as cepas bacterianas em quatro pontos equidistantes de 25 mm do disco de *Foc* (MARIANO, 1993). Assim, cada tratamento foi representado por uma placa Petri com um isolado de *Foc* e uma cepa de *Bacillus*. A testemunha consistiu em uma placa de Petri contendo apenas o disco de crescimento micelial de *Foc*, cultivado em meio de cultura 523 (Figura 4).

Foram utilizadas 3 repetições (cada repetição = uma placa de Petri). As placas foram mantidas a 28 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 h, durante um período de 6 a 10 dias em incubadora tipo BOD (Figura 4).

Subsequentemente, o experimento foi repetido no tempo, seguindo a mesma metodologia.

Figura 4 - Efeito das cepas de *Bacillus* na inibição do crescimento micelial de isolados de *Fusarium oxysporum*.



Fonte: Autora, 2021.

A – Disco de micélio do isolado de *Foc* posicionado no centro da placa de Petri; B – Cepa de *Bacillus* posicionado em quatro pontos equidistantes de 25 mm do disco de micélio de *Foc*; C – Quatro placas contendo um isolado de *Foc* submetido ao antagonismo com quatro cepas de *Bacillus* e testemunha; D – Experimento disposto em incubadora tipo BOD, na temperatura $28 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12h, durante um período de 6 a 10 dias.

4.6. Porcentagem de inibição do crescimento micelial de isolados de *Foc*

A medição do crescimento micelial foi realizada diariamente durante o período de 6 a 10 dias, até que o crescimento micelial das testemunhas atingisse a borda da placa de Petri. Efetuou-se as medições do crescimento micelial, em dois sentidos diametralmente opostos, com auxílio de paquímetro marca DIGIMESS.

Para o cálculo da porcentagem de inibição do crescimento micelial dos isolados de *Foc*, utilizou-se a seguinte fórmula onde o crescimento corresponde a área de crescimento micelial (MENTEN et al., 1976):

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

4.7. Delineamento experimental

O delineamento experimental utilizado no experimento foi inteiramente casualizado, com três repetições, sendo que cada repetição corresponde a uma placa de Petri. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Scott Knott ($\alpha= 0.05\%$) utilizando o programa RStudio.

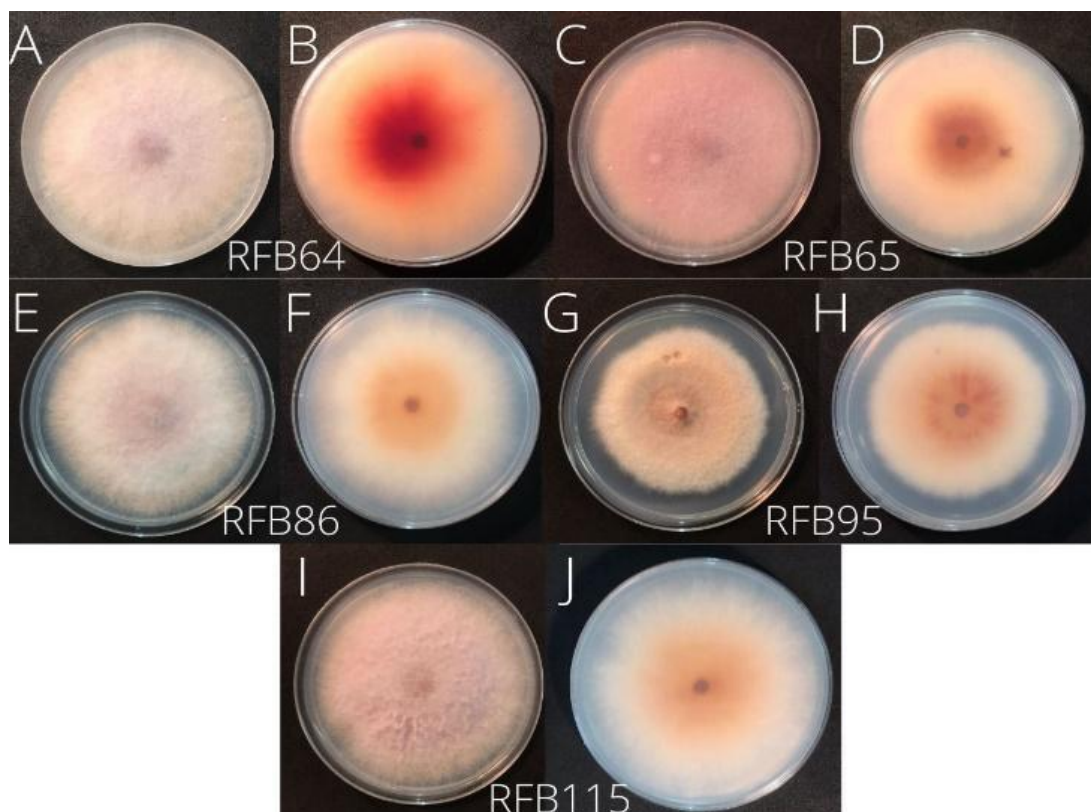
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização morfológica dos isolados de *F. oxysporum*

Neste estudo foram obtidos cinco isolados do morfotipo *Fusarium oxysporum*, estes apresentaram variação quanto à coloração das colônias e crescimento micelial (Figura 5 e Tabela 3). Variações foram também observadas nos tamanhos de microconídios e macroconídios.

Quanto ao aspecto do micélio em meio de cultura BDA, os cinco isolados apresentaram micélio flocoso com coloração variando entre branco, alaranjada e violeta pálido (Figura 5 e Tabela 3).

Figura 5 - Pigmentação do micélio aéreo e reverso de colônias de *Fusarium oxysporum*.



Fonte: Autora, 2021.

A - Coloração do micélio aéreo do isolado RFB64; B - Coloração do micélio reverso do isolado RFB64;
C - Coloração do micélio aéreo do isolado RFB65; D - Coloração do micélio reverso do isolado RFB65;
E - Coloração do micélio aéreo do isolado RFB86; F - Coloração do micélio reverso do isolado RFB86;
G - Coloração do micélio aéreo do isolado RFB95; H - Coloração do micélio reverso do isolado RFB95;
I - Coloração do micélio aéreo do isolado RFB115, J - Coloração do micélio reverso do isolado RFB115.

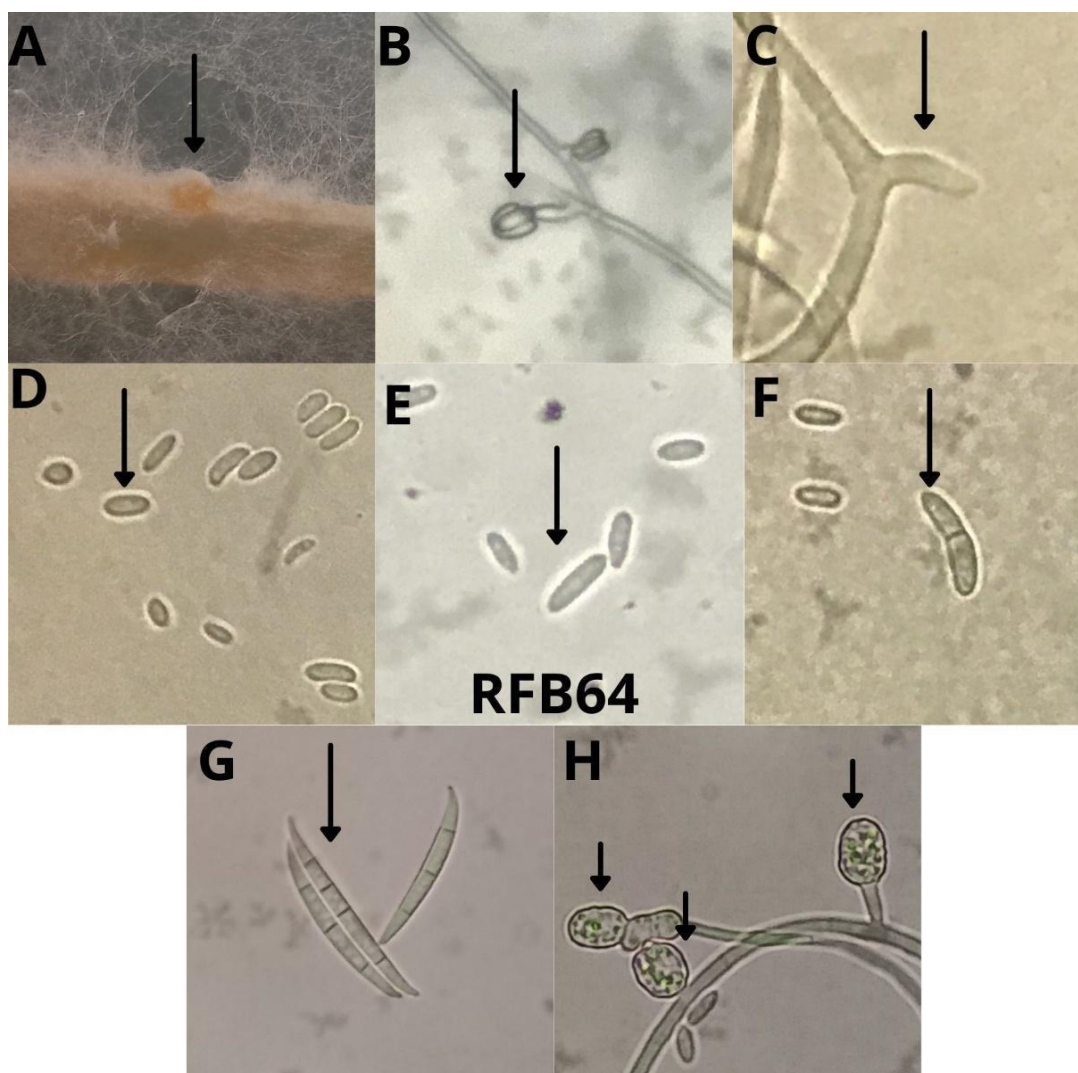
Tabela 3 - Coloração das colônias e diâmetro de crescimento micelial dos isolados de *F. oxysporum*.

Isolado	Pigmentação do micélio aéreo em BDA	Pigmentação do micélio reverso em BDA	Diâmetro do crescimento micelial (mm)
RFB64	85. <i>Pale Vinaceous</i>	5. <i>Scarlet</i>	40,48
RFB65	85. <i>Pale Vinaceous</i>	57. <i>Vinaceous</i>	38,69
RFB86	85. <i>Pale Vinaceous</i>	10. <i>Saffron</i>	38,90
RFB95	37. <i>Flesh</i>	4. <i>Peach</i>	36,85
RFB115	100. <i>Greyish Lilae</i>	4. <i>Peach</i>	40,10

Fonte: Rayner, 1970.

Através da caracterização micromorfológica realizada nesse estudo, foi possível observar que os isolados RFB64, RFB65 e RFB86 apresentaram esporodóquios nos fragmentos de folhas de cravo. Estes apresentaram-se com coloração laranja e em quantidade numerosa. Enquanto os isolados RFB95 e RFB115 não apresentaram tal estrutura. Os isolados RFB64, RFB65 e RFB86 também apresentaram a formação de macroconídios com formato falcado e geralmente 3 septações, podendo ocasionalmente apresentar 4 septações (Figura 6, Figura 7 e Figura 8).

Em todos os isolados foi observada a presença de microconídios tendo formatos ovais e elípticos. Os microconídios elípticos apresentaram-se sem septação e com 1 septação. Características como a formação de falsas cabeças e monofiálides simples também foram observadas e todos os isolados de *F. oxysporum*. Verificou-se a presença de clamidósporos, esporos assexuais de resistência, em todos os isolados. A formação dos clamidósporos foi observada na parte terminal e intercalar das hifas. Geralmente, formados isoladamente ou em pares. Apenas os clamidósporos do isolado RFB64 exibiram uma superfície levemente rugosa, os clamidósporos dos demais isolados demonstraram uma superfície lisa (Figura 6).

Figura 6 - Estruturas micromorfológicas do isolado RFB64 de *F. oxysporum*.

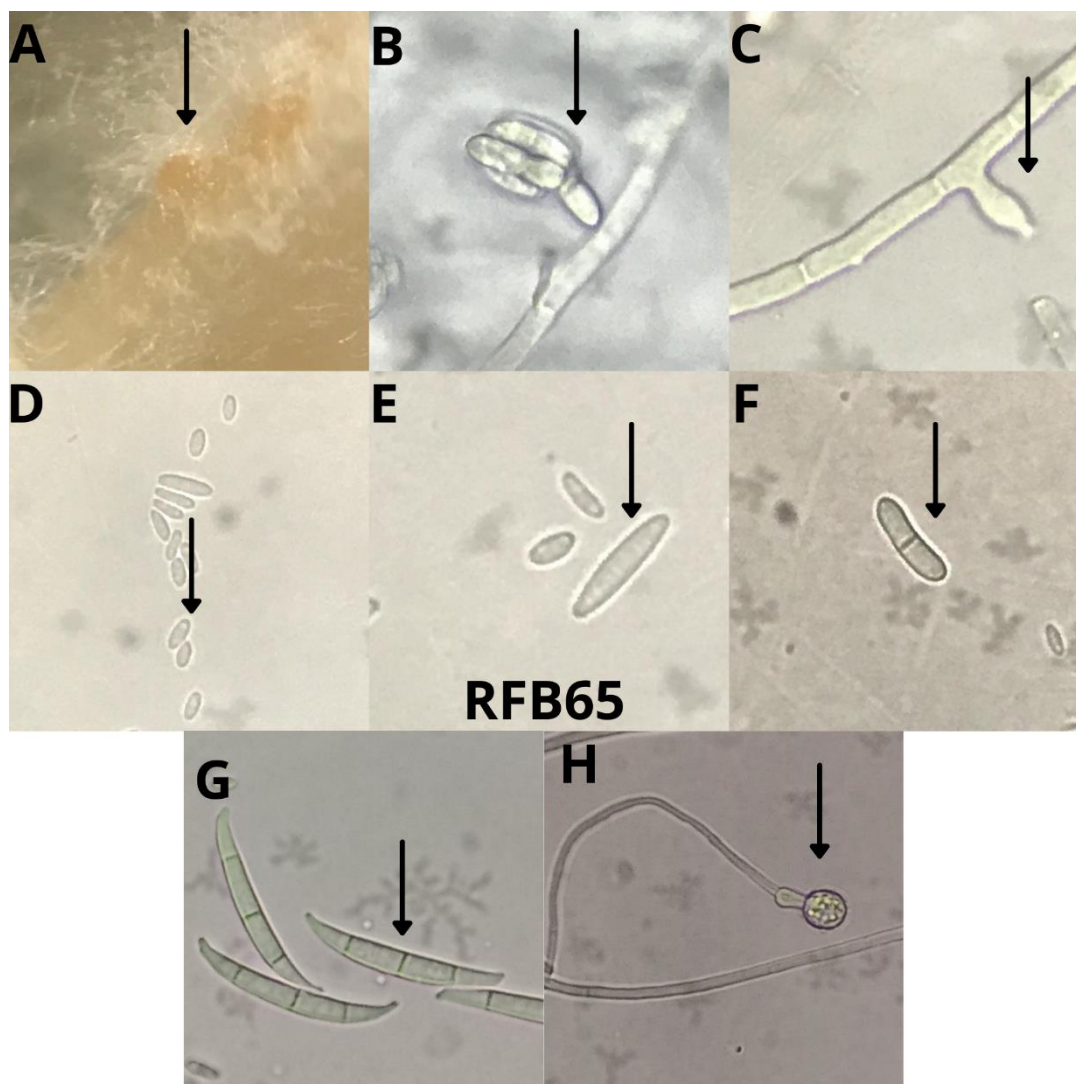
Fonte: Autora, 2021.

A – Esporodóquio, B – Falsas cabeças, C – Monofiálides simples, D – Microconídios ovais,

E – Microconídios elípticos sem septação, F – Microconídios elípticos com 1 septação,

G – Macroconídios falcados com 3 e 4 septações, H – Clamidósporos.

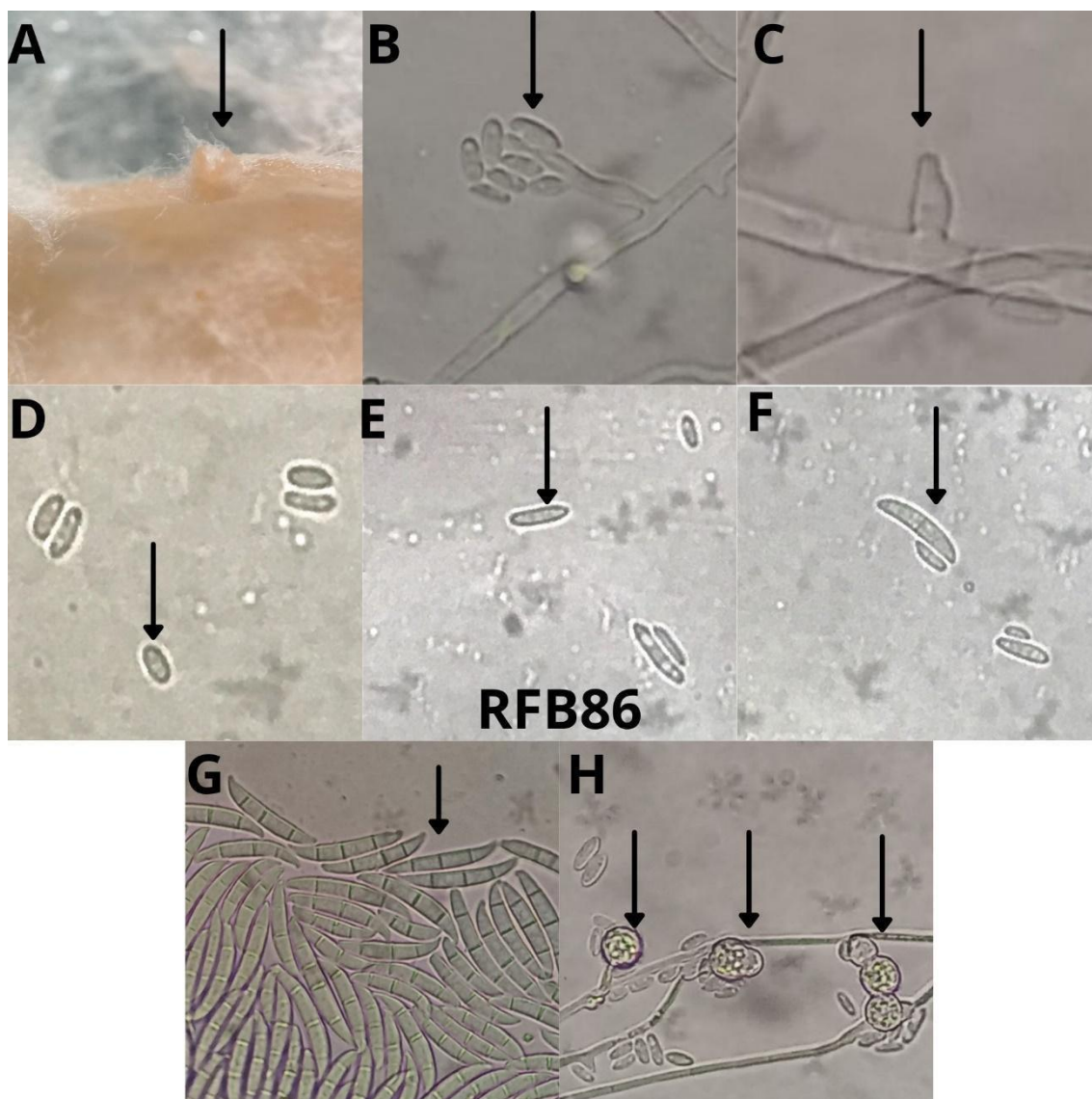
Figura 7 - Estruturas micromorfológicas do isolado RFB65 de *F. oxysporum*.



Fonte: Autora, 2021.

A – Esporóquio, B – Falsas cabeças, C – Monofíalides simples, D – Microconídios ovais, E – Microconídios elípticos sem septação, F – Microconídios elípticos com 1 septação, G – Microconídios elípticos com 2 septações, H – Macroconídios falcados com 3 septações, I – Clamidósporos terminal.

Figura 8 - Estruturas micromorfológicas do isolado RFB86 de *F. oxysporum*.



Fonte: Autora, 2021.

A – Esporódóquio, B – Falsas cabeças, C – Monofiálides simples, D – Microconídios ovais,

E – Microconídios elípticos sem septação, F – Microconídios elípticos com 1 septação,

G – Macroconídios falcados com 3 septações, H – Clamidósporos intercalares.

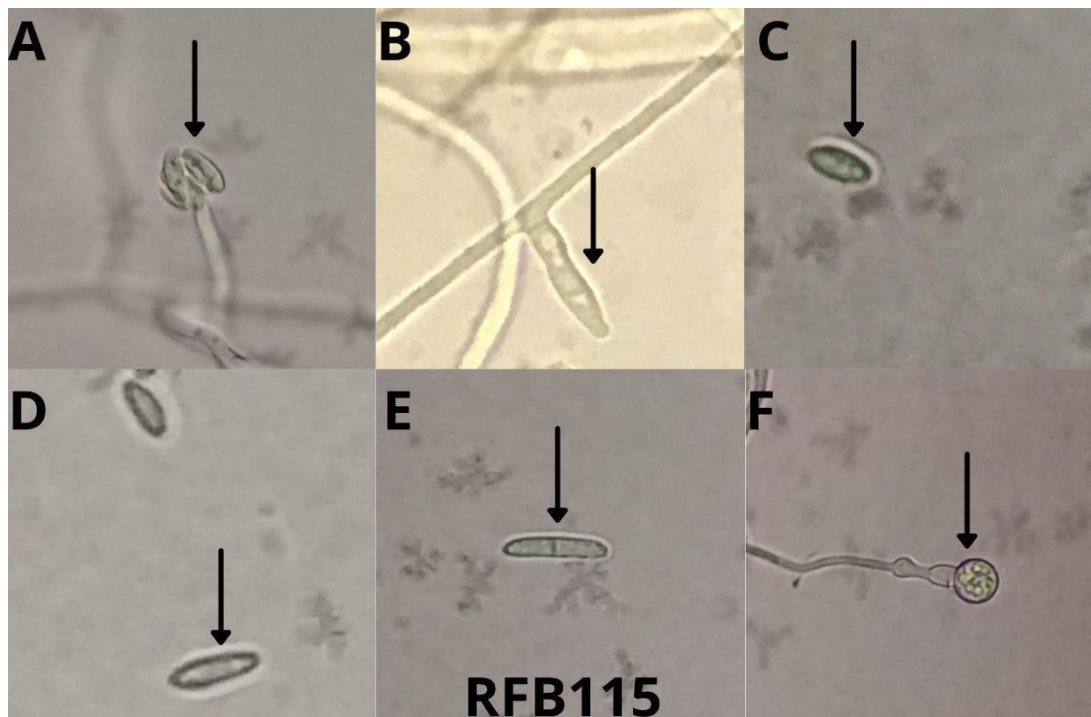
Figura 9 - Estruturas micromorfológicas do isolado RFB95 de *F. oxysporum*.



Fonte: Autora, 2021.

A – Falsas cabeças, B – Monofíalides simples, C – Microconídios ovais, D – Microconídios elípticos sem septação, E – Microconídios elípticos com 1 e 2 septações, F – Clamidósporos terminal e intercalar.

Figura 10 - Estruturas micromorfológicas do isolado RFB115 de *F. oxysporum*.



Fonte: Autora, 2021.

A – Falsas cabeças, B – Monofiálides simples, C – Microconídios ovais, D – Microconídios elípticos sem septação, E – Microconídios elípticos com 1 septação, F – Clamidósporos terminal.

Tabela 4 - Tamanho mínimo, médio e máximo de comprimento e largura dos microconídios de isolados de *F. oxysporum*.

Microconídios (μm)						
Isolados	Ovóides		Elipsóides sem septação		Elipsóides com 1 septação	
	C	L	C	L	C	L
RFB64	2,3	0,9	3,7	1,1	6,7	1,3
	(3,7)	(1,6)	(6,1)	(2,8)	(11,0)	(2,1)
	4,9	2,6	9,2	1,9	13,6	3,4
RFB65	2,5	1,45	6,6	1,8	10,2	2,2
	(5,1)	(2,4)	(8,4)	(2,5)	(16,3)	(2,9)
	6,27	3,2	11,9	3,6	19,4	3,7
RFB86	2,6	1,9	5,8	2,1	12,01	2,3
	(5,8)	(2,7)	(9,6)	(2,7)	(15,4)	(2,9)
	8,6	3,3	11,7	3,5	21,2	3,7
RFB95	5,3	2,1	8,0	2,2	16,5	3,0
	(6,2)	(2,6)	(10,2)	(3,0)	(20,1)	(3,1)
	8,6	3,4	17,8	4,4	25,9	4,3
RFB115	4,9	2,4	8,1	1,8	9,9	2,4
	(5,6)	(2,9)	(8,4)	(2,6)	(14,4)	(2,9)
	6,8	3,4	12,0	3,5	20,5	3,7

Fonte: Autora, 2021.

Tabela 5 - Tamanho mínimo, médio e máximo de comprimento e largura dos macroconídios de isolados de *Fusarium oxysporum*.

Macroconídios (μm)		
Isolados	Comprimento	Largura
RFB64	32	3,27
	(43,0)	(3,8)
	50,8	4,3
RFB65	34,8	3,2
	(38,7)	(4,0)
	42,1	4,91
RFB86	21,0	3,0
	(28,1)	(3,9)
	34,6	4,7

Fonte: Autora, 2021.

Segundo Leslie & Summerell (2006), as características micromorfológicas típicas para espécies do complexo *Fusarium oxysporum* são a presença de clamidósporos com formato circular, que apresentam parede lisa ou áspera e são formados através da modificação das hifas em um período que pode variar entre 2 a 6 semanas. Apresenta também esporodóquios de forma abundante, com coloração variando entre branco e laranja. Entretanto, alguns isolados não apresentam esporodóquios. Também compoendo o conjunto de características micromorfológicas tem-se a presença de macroconídios e microconídios. Os macroconídios têm comprimento de curto a médio, formato que tem variações entre reto e falcado, geralmente apresentando 3 septações. Os macroconídios são formados nos esporodóquios. Enquanto que, os microconídios geralmente tem formato oval, elíptico ou reniformes e não possuem septações. Estes são formados em falsas cabeças em monofiálides em hifas, sua ocorrência é abundante no micélio aéreo.

No presente estudo, alguns microconídios apresentaram 1 septação. Maryani *et al.* (2019), atribuem as variações nas características micromorfológicas às diferentes linhagens filogenéticas que compõem o complexo de espécies *Fusarium oxysporum*.

5.2. Efeito de cepas de *Bacillus* no crescimento micelial de isolados de *Fusarium oxysporum*.

No estudo foram realizados dois testes idênticos com as quatro cepas de *Bacillus* e os cinco isolados de *Foc*. A porcentagem de inibição do crescimento micelial variou de acordo com a interação entre cada cepa bacteriana e cada isolado de *Foc*. A porcentagem de inibição variou de 11,64% a 72,17%, quando comparado com a testemunha. As cepas bacterianas apresentaram algum efeito de diminuição no crescimento micelial demonstrando o seu potencial antagonismo (Tabela 6).

Tabela 6 - Porcentagem de inibição de crescimento micelial de isolados de *F. oxysporum* por cepas de *Bacillus*, no primeiro e segundo teste de antibiose *in vitro*.

Isolados de <i>Foc</i>	Cepas de <i>Bacillus</i>	% de inibição de crescimento micelial (1° teste)	% de inibição de crescimento micelial (2° teste)
RFB64	LPPC159	46,18	45,14
	LPPC170	69,22	67,82
	LPPC265	70,45	55,25
	LPPC272	41,46	35,21
RFB65	LPPC159	49,39	49,80
	LPPC170	72,14	55,67
	LPPC265	64,27	54,78
	LPPC272	39,11	32,33
RFB86	LPPC159	34,49	61,20
	LPPC170	59,93	66,66
	LPPC265	52,58	63,21
RFB95	LPPC272	11,67	39,26
	LPPC159	30,92	57,65
	LPPC170	63,06	65,05

	LPPC265	56,75	58,52
	LPPC272	18,36	30,84
	LPPC159	42,18	35,47
	LPPC170	47,37	57,53
RFB115	LPPC265	47,81	64,89
	LPPC272	22,77	18,35

Fonte: autora, 2021

O isolado RFB64 teve o menor crescimento micelial nos dois experimentos, quando submetido ao teste de antagonismo com a cepa bacteriana LPPC170, que proporcionou uma diminuição de 69,22% do crescimento micelial no primeiro experimento e 67,82% no segundo experimento. Seguiu-se um padrão semelhante também com a cepa bacteriana LPPC265 que também se destacou na diminuição do crescimento micelial do fungo, 70,45% no primeiro experimento e 55,25% no segundo experimento (Figura 11).

Semelhantemente, o isolado RFB65 apresentou o menor crescimento micelial quando submetido aos testes com a cepa bacteriana LPPC170. As reduções foram de 72,14% no primeiro experimento e 55,67% no segundo experimento. Já a cepa bacteriana LPPC265 proporcionou uma diminuição no crescimento micelial de 64,27% no primeiro experimento e 54,78% no segundo experimento (Figura 11).

O isolado RFB86 de *Foc* teve seu controle *in vitro* apresentando resultados promissores, com a cepa bacteriana LPPC170. O isolado reduziu o crescimento micelial de *Foc* em 59,93% no primeiro teste e 66,66% no segundo teste. A cepa bacteriana LPPC265 diminuiu o crescimento micelial em 52,58% no primeiro experimento e 63,21% no segundo experimento (Figura 11).

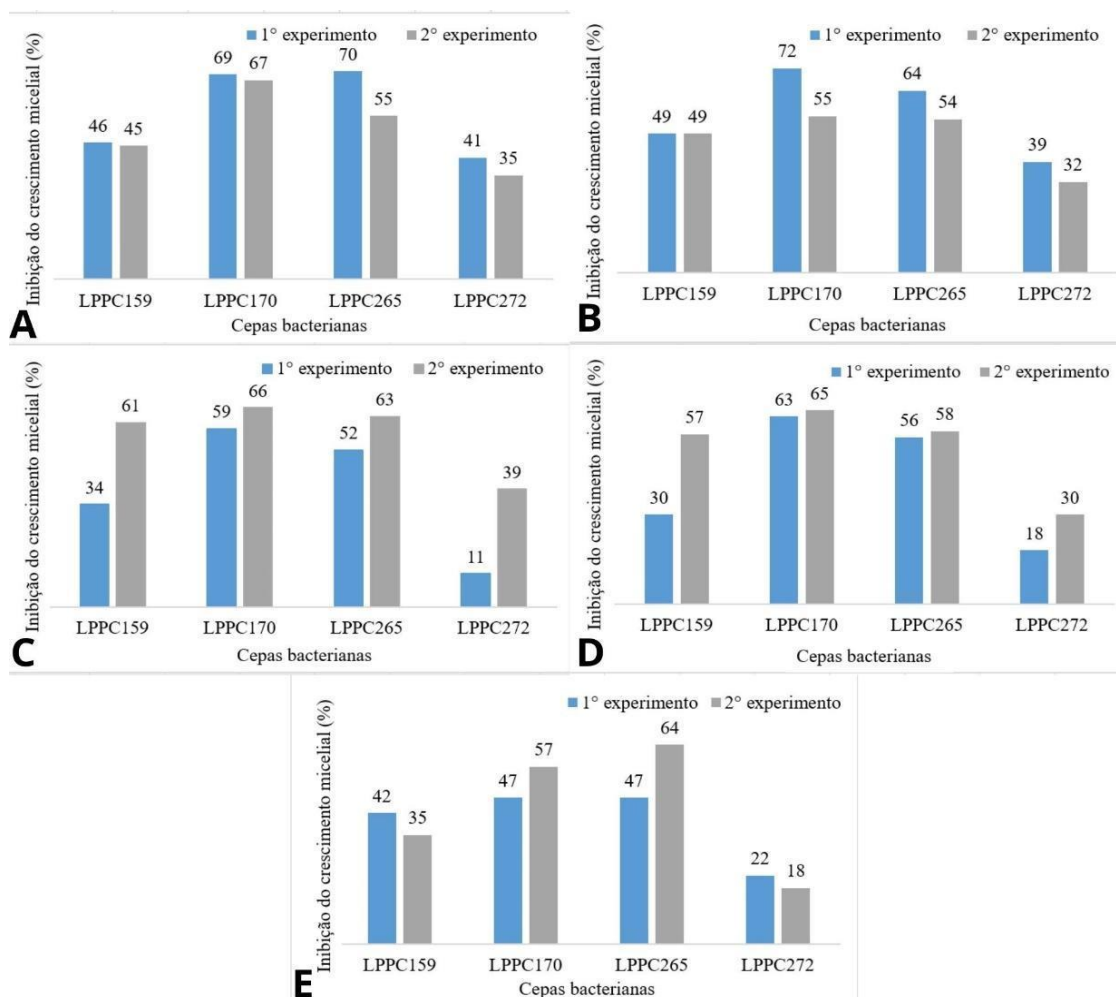
O isolado RFB95 teve seu crescimento micelial reduzido principalmente pela cepa bacteriana LPPC170. No primeiro experimento, o isolado bacteriano reduziu o crescimento micelial em 63,04% e no segundo experimento a redução foi de 65,05%. Outra cepa que apresentou uma redução significativa no crescimento foi o LPPC265, que no primeiro experimento diminuiu o crescimento micelial de *Foc* em 56,75% e no segundo experimento diminuiu 58,52% do crescimento micelial. Além desses dois

isolados, o LPPC159 também se destacou reduzindo o crescimento micelial em 57,65% (Figura 11).

Na inibição do crescimento micelial *in vitro* do isolado RFB115 de *Foc* as cepas LPPC170 e LPPC265 destacaram-se com reduções de 47,37% e 47,81% no primeiro experimento e 57,53% e 64,89% no segundo experimento, respectivamente. Contudo a cepa bacteriana LPPC159 também apresentou bons resultados no primeiro experimento reduzindo o crescimento micelial em 42,18%, assemelhando-se com as cepas LPPC170 e LPPC265 de *Bacillus* (Figura 11).

Segundo Brzezinska & Jankiewicz (2012), a porcentagem de inibição do crescimento micelial se enquadra em quatro critérios: sem inibição (0 – 20%), inibição moderada (21-30%), inibição forte (31-50%) e inibição muito forte (> 50%). Assim, as cepas LPPC170 e LPPC265 que se destacaram com as maiores porcentagens de inibição de crescimento micelial de todos os isolados fúngicos apresentaram uma inibição que variou entre forte e muito forte. Enquanto que de acordo com esse critério, a cepa LPPC272 não apresentou inibição aos isolados RFB115 no segundo teste, RFB86 no primeiro teste e RFB95 no primeiro teste (Figura 11).

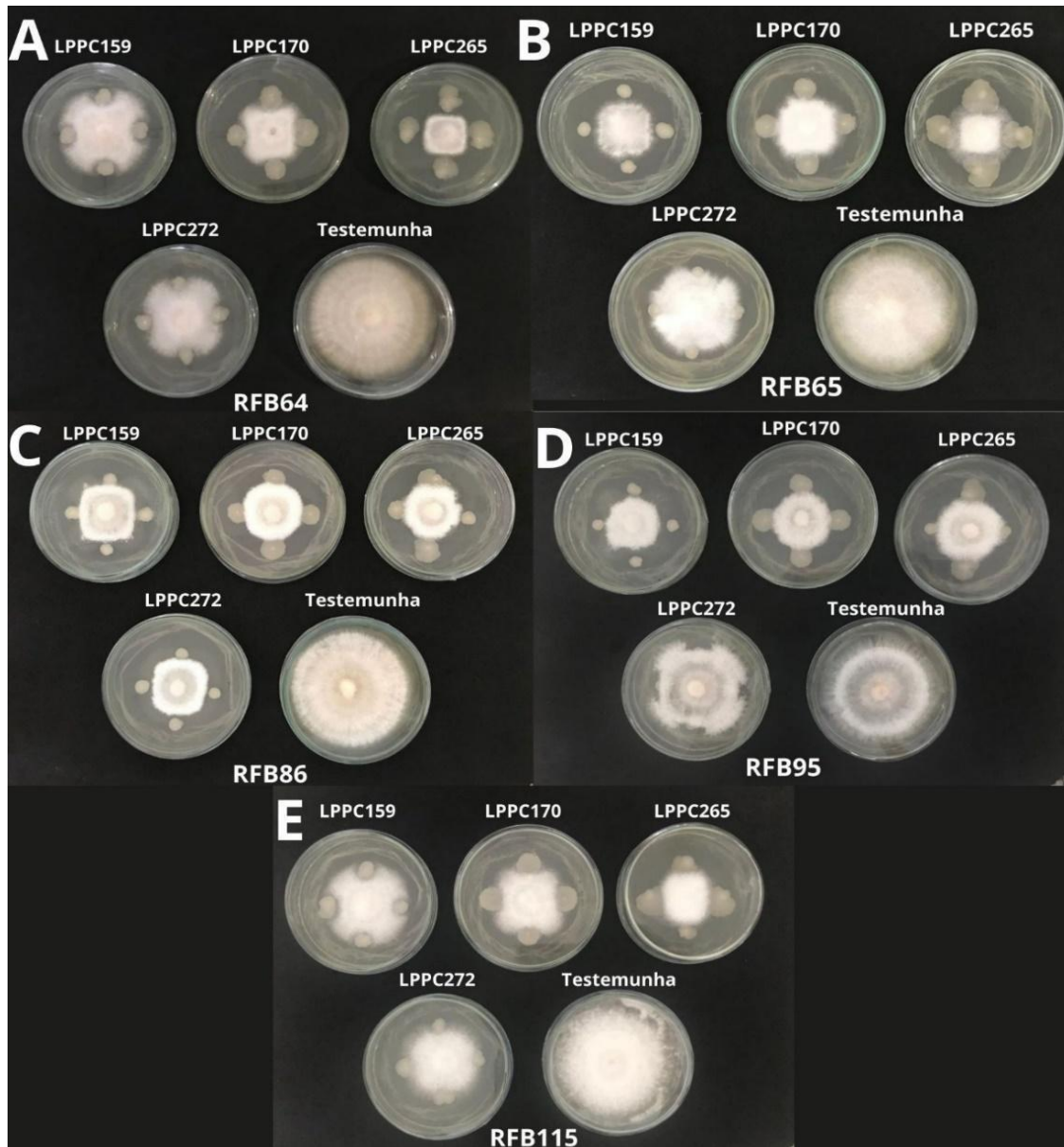
Figura 11 - Porcentagem de inibição de crescimento micelial dos isolados RFB 64, RFB 65, RFB 86, RFB 95 e RFB 115 de *Fusarium oxysporum* pelas cepas LPPC159, LPPC170, LPPC265 e LPPC272 de *Bacillus*.



Fonte: Autora, 2021.

A – Porcentagem de inibição de crescimento micelial do isolado RFB64 de *Fusarium oxysporum* pelas cepas LPPC159, LPPC170, LPPC265 e LPPC272 de *Bacillus*, B - Porcentagem de inibição de crescimento micelial do isolado RFB65 de *Fusarium oxysporum* pelas cepas LPPC159, LPPC170, LPPC265 e LPPC272 de *Bacillus*, C – Porcentagem de inibição de crescimento micelial do isolado RFB86 de *Fusarium oxysporum* pelas cepas LPPC159, LPPC170, LPPC265 e LPPC272 de *Bacillus*, D – Porcentagem de inibição de crescimento micelial do isolado RFB95 de *Fusarium oxysporum* pelas cepas LPPC159, LPPC170, LPPC265 e LPPC272 de *Bacillus*, E – Porcentagem de inibição de crescimento micelial do isolado RFB115 de *Fusarium oxysporum* pelas cepas LPPC159, LPPC170, LPPC265 e LPPC272 de *Bacillus*.

Figura 12 - Teste de antibiose *in vitro* da inibição de crescimento micelial dos isolados RFB 64, RFB 65, RFB 86, RFB 95 e RFB 115 de *Fusarium oxysporum* pelas cepas LPPC159, LPPC170, LPPC265 e LPPC272 de *Bacillus*.



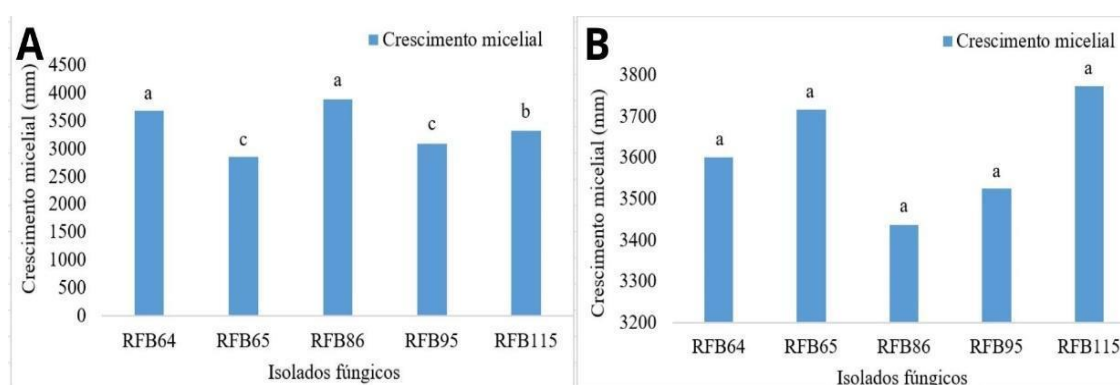
Fonte: Autora, 2021.

A – Teste de antibiose *in vitro* da inibição de crescimento micelial do isolado RFB 64 de *Fusarium oxysporum* pelas cepas LPPC159, LPPC170, LPPC265 e LPPC272 de *Bacillus*, B - Teste de antibiose *in vitro* da crescimento micelial do isolado RFB 65 de *Fusarium oxysporum* pelas cepas LPPC159, LPPC170, LPPC265 e LPPC272 de *Bacillus*, C – Teste de antibiose *in vitro* da crescimento micelial do isolado RFB 86 de *Fusarium oxysporum* pelas cepas LPPC159, LPPC170, LPPC265 e LPPC272 de *Bacillus*, D – Teste de antibiose *in vitro* da crescimento micelial do isolado RFB 95 de *Fusarium oxysporum* pelas cepas LPPC159, LPPC170, LPPC265 e LPPC272 de *Bacillus*, E – Teste de antibiose *in vitro* da inibição de crescimento micelial do isolado RFB 115 de *Fusarium oxysporum* pelas cepas LPPC159, LPPC170, LPPC265 e LPPC272 de *Bacillus*.

in vitro da crescimento micelial do isolado RFB 115 de *Fusarium oxysporum* pelas cepas LPPC159, LPPC170, LPPC265 e LPPC272 de *Bacillus*.

Comparando separadamente como cada isolado fúngico sem diferir as cepas bacterianas utilizadas, avaliando apenas o crescimento do isolado, no primeiro teste o isolado RFB65 apresentou a menor crescimento micelial. Entretanto, no segundo teste de antibiose *in vitro* não houveram diferenças significativas entre o crescimento micelial dos isolados fúngicos (Figura 13).

Figura 13 - Crescimento micelial dos isolados de *Fusarium oxysporum* RFB64, RFB65, RFB86, RFB95 e RFB115.



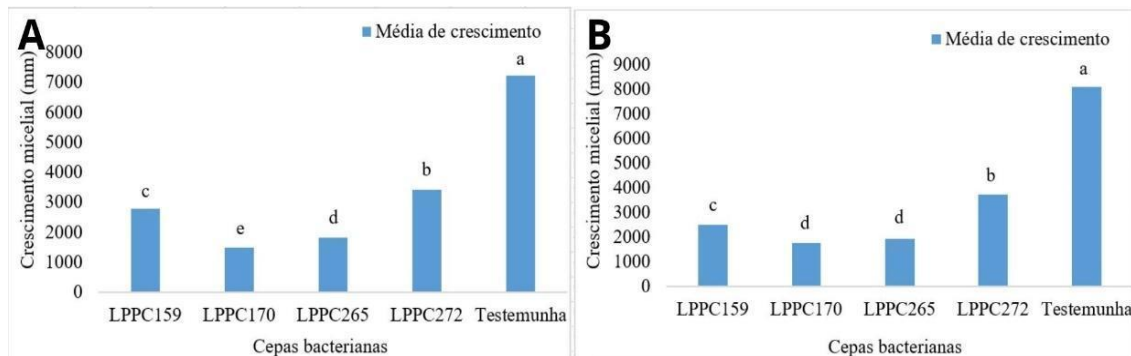
Fonte: Autora, 2021.

A - Crescimento micelial dos isolados fúngicos do primeiro teste de antibiose *in vitro*, B - Crescimento micelial dos isolados fúngicos do segundo teste de antibiose *in vitro*.

Médias seguidas de pela letra mesma não diferem entre si, pelo teste de Scott Knott, ao nível de 5% de probabilidade.

Analisando o efeito das cepas bacterianas individualmente sem diferir os isolados fúngicos, ou seja, tratando dos os isolados como se fossem apenas um e avaliando seu crescimento micelial de acordo com cada cepa bacteriana a qual foi submetido, pode-se observar que no primeiro teste de antibiose as cepas LPPC170 e LPPC265 foram as que mais diminuíram o crescimento micelial, sendo que houve diferença estática entre as cepas e a LPPC170 gerou a menor taxa de crescimento micelial. Entretanto, no segundo teste de antibiose as LPPC170 e LPPC265 também causaram as menores taxas de crescimento micelial, mas não foram estatisticamente diferentes (Figura 14).

Figura 14 - Efeito das cepas bacterianas de *Bacillus* no crescimento micelial dos isolados de *Fusarium oxysporum*.



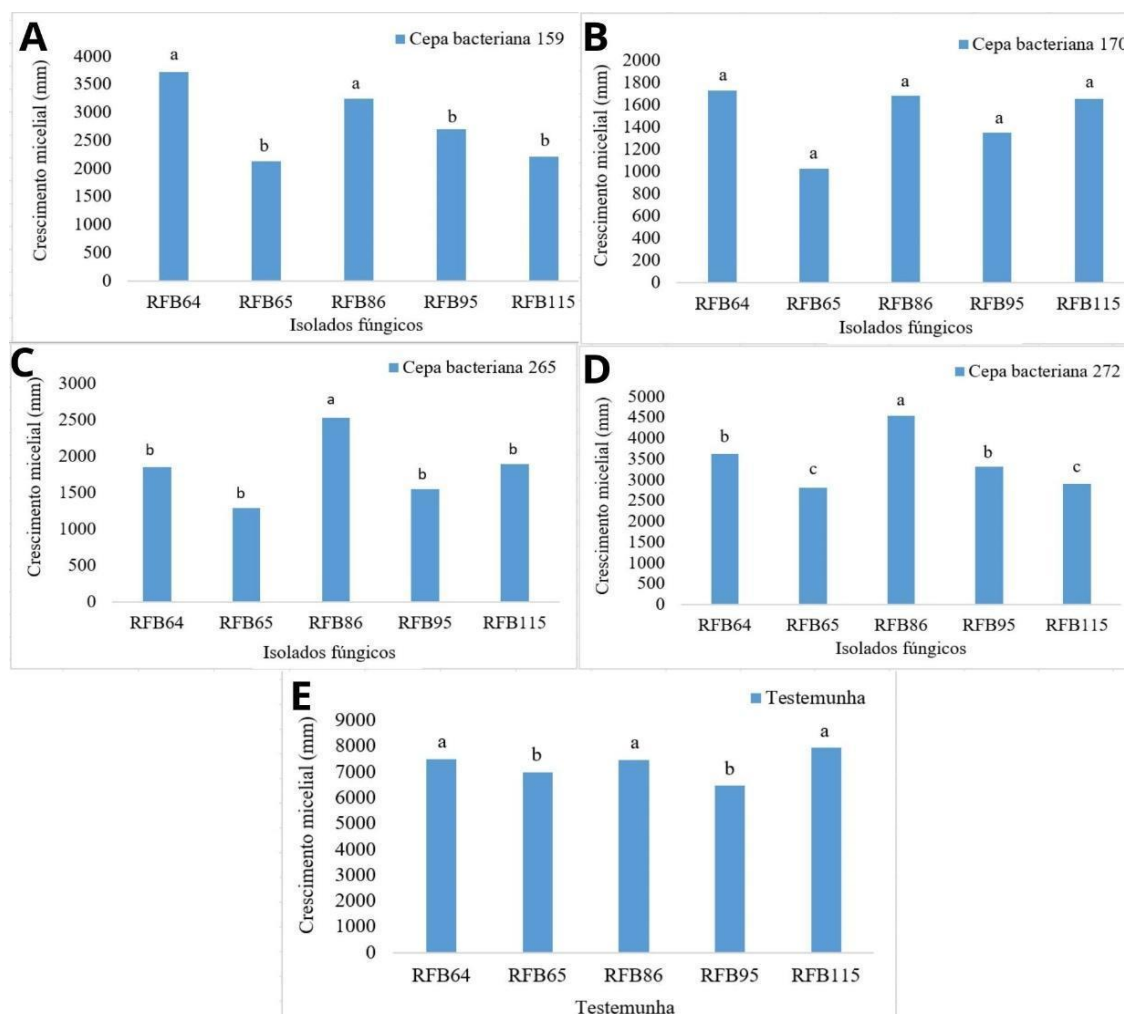
Fonte: Autora, 2021.

A - Efeito das cepas bacterianas no crescimento micelial dos isolados fúngicos do primeiro teste de antibiose *in vitro*, B - Efeito das cepas bacterianas no crescimento micelial dos isolados fúngicos do segundo teste de antibiose *in vitro*.

Médias seguidas de pela letra mesma não diferem entre si, pelo teste de Scott Knott, ao nível de 5% de probabilidade.

Avaliando independentemente o efeito de cada cepa bacteriana em cada isolado fúngico no primeiro teste de antagonismo a cepa LPPC159 controlou melhor o crescimento *in vitro* dos isolados RBF65, RFB95 e RFB 115 que não diferiram estatisticamente entre si. A cepa LPPC170 não apresentou diferença estatística, ou seja, estatisticamente controlou todos os isolados de forma igual. A cepa LPPC265 obteve os melhores resultados de controle com os isolados RFB64, RFB65, RFB95 e RFB115, que não diferem estatisticamente entre si. Por fim, a cepa LPPC272 apresentou melhor efeito controlador quando submetida aos isolados fúngicos RFB65 e RFB115 que não diferiram estatisticamente entre si (Figura 15).

Figura 15 - Interação entre as cepas LPPC159, LPPC170, LPPC265 e LPPC272 de *Bacillus* e o crescimento micelial dos isolados RFB 64, RFB 65, RFB 86, RFB 95 no primeiro teste de antibiose *in vitro*.



Fonte: Autora, 2021.

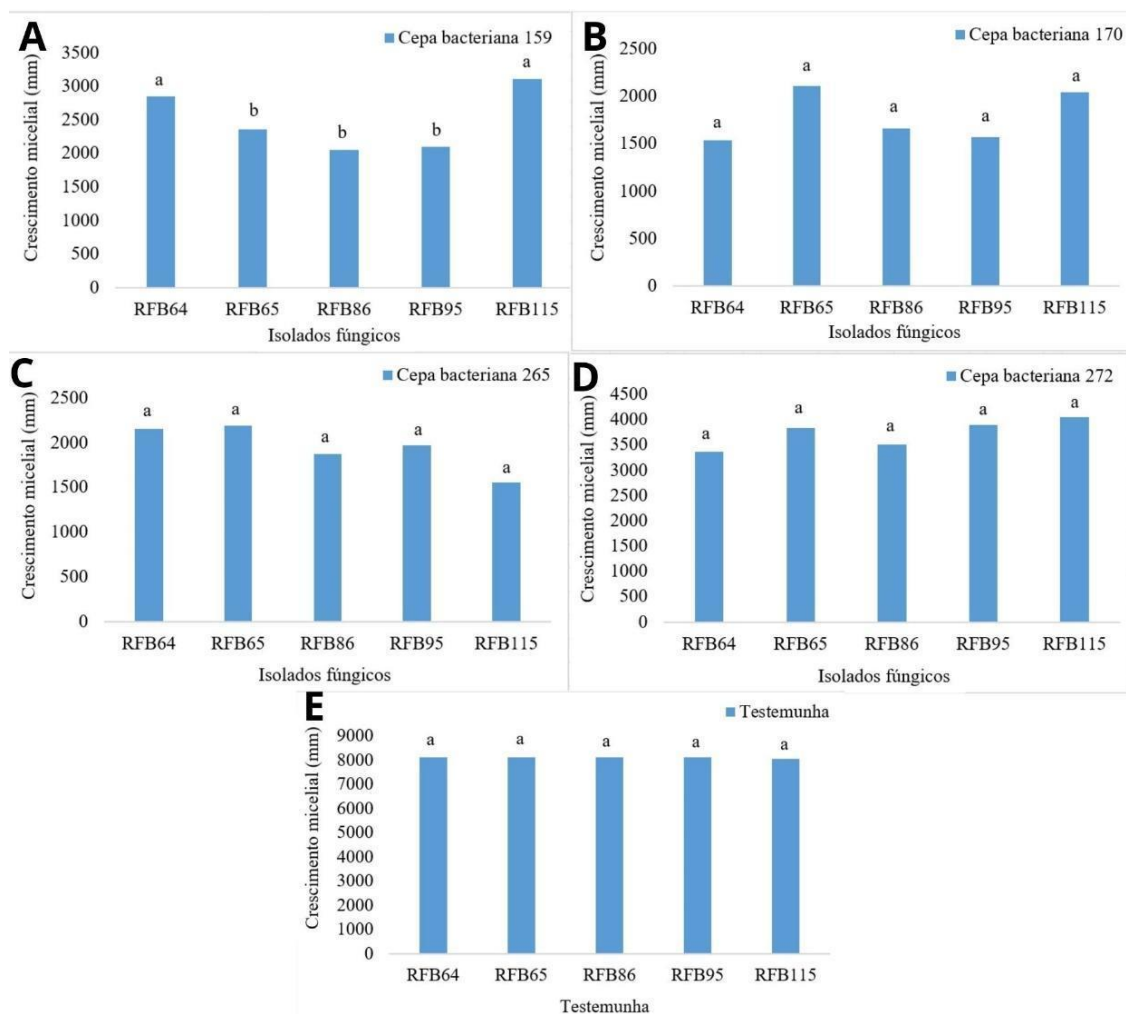
A - Interação entre a cepa LPPC159 e o crescimento micelial dos isolados RFB64, RFB65, RFB86, RFB95 e RFB115 de *Fusarium oxysporum*, B - Interação entre a cepa LPPC170 e o crescimento micelial dos isolados RFB64, RFB65, RFB86, RFB95 e RFB115 de *Fusarium oxysporum*, C - Interação entre a cepa LPPC265 e o crescimento micelial dos isolados RFB64, RFB65, RFB86, RFB95 e RFB115 de *Fusarium oxysporum*, D - Interação entre a cepa LPPC272 e o crescimento micelial dos isolados RFB64, RFB65, RFB86, RFB95 e RFB115 de *Fusarium oxysporum*, E - Testemunhas contendo apenas os isolados RFB64, RFB65, RFB86, RFB95 e RFB115 de *Fusarium oxysporum*.

Médias seguidas de pela letra mesma não diferem entre si, pelo teste de Scott Knott, ao nível de 5% de probabilidade.

No segundo teste de antagonismo *in vitro* quando se analisa independentemente o efeito de cada cepa bacteriana em cada isolado fúngico, a cepa LPPC159 controlou melhor o crescimento *in vitro* dos isolados RFB65, RFB86 e RFB 95 que não

diferiram estatisticamente entre si. As cepas LPPC170, LPPC265 e LPPC272 não apresentaram diferença estatística no controle dos isolados fúngicos, ou seja, estatisticamente controlaram todos os isolados de forma igual. (Figura 16).

Figura 16 - Interação entre as cepas LPPC159, LPPC170, LPPC265 e LPPC272 de *Bacillus* e o crescimento micelial dos isolados RFB 64, RFB 65, RFB 86, RFB 95 no segundo teste de antibiose *in vitro*.



Fonte: Autora, 2021.

A - Interação entre a cepa LPPC159 e o crescimento micelial dos isolados RFB64, RFB65, RFB86, RFB95 e RFB115 de *Fusarium oxysporum*, B - Interação entre a cepa LPPC170 e o crescimento micelial dos isolados RFB64, RFB65, RFB86, RFB95 e RFB115 de *Fusarium oxysporum*, C - Interação entre a cepa LPPC265 e o crescimento micelial dos isolados RFB64, RFB65, RFB86, RFB95 e RFB115 de *Fusarium oxysporum*, D - Interação entre a cepa LPPC272 e o crescimento micelial dos isolados RFB64, RFB65, RFB86, RFB95 e RFB115 de *Fusarium oxysporum*, E - Testemunhas contendo apenas os isolados RFB64, RFB65, RFB86, RFB95 e RFB115 de *Fusarium oxysporum*.

Médias seguidas de pela letra mesma não diferem entre si, pelo teste de Scott Knott, ao nível de 5% de probabilidade.

Das quatro cepas bacterianas, as LPPC170 e LPPC265 destacaram-se no controle de todos os isolados de *Foc*. Contudo, estatisticamente a cepa bacteriana LPPC170 foi a que proporcionou menor crescimento micelial do todos os isolados fúngicos quando comparada com a testemunha nos primeiros e segundos testes de antibiose *in vitro*. Entretanto, no segundo teste as cepas LPPC170 e LPPC265 não diferiram estatisticamente, proporcionando as menores taxas crescimento micelial para todos os isolados fúngicos quando comparada com a testemunha. Este resultado, assemelha-se a vários trabalhos na literatura com o uso de isolados de *Bacillus* para o controle *in vitro* de espécies de *Fusarium*.

Em pesquisa realizada por Alves (2017) foram avaliados os efeitos de 50 cepas de *Bacillus* contra um isolado de *F. oxysporum* f. sp. *cubense*. O autor constatou que 23 isolados bacterianos foram capazes de inibir o crescimento micelial do patógeno. O estudo em questão demonstrou a capacidade de isolados de *Bacillus* em reduzirem o crescimento micelial de isolados de *Foc*. O autor também relata que os mecanismos envolvidos no controle biológico em questão, poderiam ser a antibiose e a produção de compostos orgânicos voláteis.

Já Rodríguez (2017) testou cepas de *Bacillus* na inibição do crescimento micelial de *Foc* raça 1. Das dezessete cepas bacterianas utilizadas, nove apresentaram redução do crescimento micelial do fungo. Entre elas, foram encontradas cepas identificadas como *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis* e *B. amyloliquefaciens*. Em outro estudo, Pacífico (2021) verificou que três isolados de *B. velezensis* apresentavam o potencial antagônico a *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. Os resultados desses trabalhos assemelham-se com os obtidos no presente estudo.

Diante disso, os resultados do presente estudo demonstraram a viabilidade da utilização de bactérias do gênero *Bacillus*, oriundas da rizosfera de bananeiras, para o controle *in vitro* de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*.

6. CONCLUSÕES

Os isolados de *Fusarium oxysporum* de bananeiras com o mal do Panamá apresentaram a maioria das características micromorfológicas típicas desse complexo.

As cepas de *Bacillus* inibiram o crescimento micelial *in vitro* dos isolados de *Fusarium oxysporum*, em especial as cepas LPP170 e LPP265 apresentaram as maiores taxas de inibição crescimento micelial.

REFERÊNCIAS

- ACUÑA, R., ROUARD, M., LEIVA, A. M., MARQUES, C., OLORTEGUI, A., URTEA, C., CABRETA-PINTADO, R. M., ROJAS, J. C. LOPEZ, D., CENCI, A., CUELLAR, W. J., DITA, M. First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4, causing *Fusarium* wilt in Cavendish bananas in Peru. **APS Publications**. Disponível em: <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-21-1951-PDN>. Acesso em: 13/01/2022.
- AGRIANUAL 2021: ANUÁRIO ESTATÍSTICO DA AGRICULTURA BRASILEIRA. São Paulo: FNP Consultoria & Comércio, 2021. p. 169-176.
- ALFENAS, A.C., MAFIA, R.G. **Métodos em Fitopatologia**. Viçosa, UFV, 382p. 2007.
- ALVES, F. H. N. da Silva. **Seleção de espécies de *Bacillus* com potencial antagonista para controle do mal do Panamá**. 2017. 43 f. Monografia (Agronomia), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.
- AMORIM, L., REZENDE, J. A., FILHO, A. B. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 5. Ed. Piracicaba: Agronômica Ceres, 528p. 2018.
- BETTIOL, W., GHINI, R. Impactos das mudanças climáticas sobre o controle biológico de doenças de plantas. In: BETTIOL, W., MORANDI, M. A. B. **Biocontrole de Doenças de Plantas: Uso e Perspectivas**. Embrapa Meio Ambiente, p. 29-48, 2009.
- BHARAT, R., SINGH, V. N. SING, D. B. *Trichoderma viridae* as a mycoparasite of *Aspergillus* spp. **Plant and Soil**, v. 57, p. 131-135, 1980.
- BORGES, A. L.; MATOS, A. P. **Banana: Instruções Práticas de cultivo**. Cruz das Almas: Embrapa, 2006. 29 p.
- BORGES, A. L. **Cultivo da Bananeira para o Agropolo Jaguaribe-Apodi**. Sistema de Produção, p. 1-84, 2014.
- BRZEZINSKA, M. S., JANKIEWIEZ, U. Production of antifungal chitinase by *Aspergillus niger* LOCK 62 and its potential role in the biological control. **Curr Microbiol**, 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, 539 p. 1983.

- HERMANTO, C.; DJATNIKA, E.I.; EMILDA, D.; MUJIMAN; SUBHAN. Pre-planting treatments for management of banana fusarium wilt. **ARPN Journal of Agriculture and Biological Science**, v. 7, n. 4, p. 260-265, 2012.
- DITA, M., BARQUERO, M, HECK, D., MIZUBUTI, E. S. G., STAVER, C. P. *Fusarium* wilt of banana: Current knowledge on epidemiology and research needs toward sustainable disease management. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, n. 1468, p. 1-21, 2018.
- DONATO, S. L. R., BORÉM, A., RODRIGUES, M. G. V. **Banana: do Plantio à Colheita**. Belo Horizonte: EPAMIG, 2021, 376 p.
- D'HONT, A., DENOUE, F., AURY, J-M., BAURENS, F-C., CARREEL, F. GARSMEUR, O., NOEL, B., BOCS, S., DROC, G., ROUARD, M., SILVA, C., JABBARI, K., CARDI, C. The banana (*Musa acuminata*) genome and the evolution of monocotyledonous plants. **Nature**. v. 488, p, 213-219, 2012.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (2020). Disponível em: <<https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>> Acesso em: 03/02/2022.
- FREITAS, N. V. **Seleção de isolados de *Bacillus* sp. com potencial para promoção de crescimento e antagonismos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense*, agente causador do mal do Panamá na bananeira**. 2017. 59 f. Monografia (Agronomia), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.
- GANG, G., BIZUN, W., WEIHONG, M., XIAOFEN, L., XIAOLIN, Y., CHAOHUA, Z., JIANHONG, M., HUICAI, Z. Biocontrol of *Fusarium* wilt of banana: Key influence factors and strategies. **African Journal of Microbiology Research**. v. 7 n. 41, p. 4835-4843, 2013.
- GASPAROTTO, L., DITA, M., ALEXANDRE, J. R., SCHURT, D. A., LEITE, R. S. **V. *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* raça 4 tropical: Perigo para a bananicultura nacional**. Manaus: Embrapa, 2020. 20 p.
- GERLACH W, NIRENBERG H. **The genus *Fusarium*: a pictorial atlas** (Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem). Berlin: Parul Parey, 406p. 1982.

GOWTHAM, H. G.; HARIPRASAD, P.; NAYAK, S. C. Application of rhizobacteria antagonistic to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* for the management of *Fusarium* wilt in tomato. **Rhizosphere**, v. 73, n. 2, p. 72-74, 2016.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (2020). < Disponível em: https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/2415/epag_2020_nov.pdf Acesso em: 01/02/2022.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (2021). < Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/home/lspa> > Acesso em: 13/01/2022.

KADO, E. I., HESKETT, M. G. Factores affecting direct recovery of *Phytophthora cinamomi* from soil. **Phytopathology** v. 55, p. 1183-7, 1970.

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B.A. **The Fusarium laboratory manual**. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd. p. 388. 2006.

LOPES, R. B. A Indústria no controle biológico: Produção e comercialização de microrganismos no Brasil. In: BETTIOL, W., MORANDI, M. A. B. **Biocontrole de Doenças de Plantas: Uso e Perspectivas**. Embrapa Meio Ambiente, p. 15-28, 2009.

MATOS, A. P., VASCONCELOS, J. A. R., SIMÃO, A. H. **Práticas de cultivo para a cultura da banana no estado do Tocantins**. Embrapa Mandioca e Fruticultura, 43p. 2019.

MARIANO, R. L. R. Métodos de seleção in vitro para o controle microbiológico de patógeno de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 1, p. 369-409, 1993.

MARYANI, N., LOMBARD, L., SUBANDIYAH, S., CROUS, P. W., KEMA, G. H. J. Phylogeny and genetic diversity of the banana *Fusarium* wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* in the Indonesian centre of origin. **Studies in Mycology**, v. 92: p. 155–194, 2019.

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**, v. 1, n. 2, p. 57-61, 1976.

MORANDI, M. A. B., BETTIOL, W. **Biocontrole de Doenças de Plantas: Uso e Perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009, 341 p.

O'DONNELL, Kerry et al. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 5, p. 2044-2049, 1998.

OLIVEIRA, C. W., SILVA, W. N., CAMPOS, P. E. R., MEIRELES, A. C. M., BATISTA, D. S. Detecção da expansão do cultivo de banana no Cariri cearense por imagens orbitais. **Revista Brasileira Agricultura Irrigada** v.13, n. 5, p. 3676 - 3682, 2019.

PACÍFICO, M. G. **Bacillus spp. no controle biológico do complexo de doenças causadas por *Fusarium-Meloidogyne* em algodoeiro**. 2021. 127 f. Tese (Doutorado em Agronomia), Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2021.

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

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.

RAYNER, R.W. A mycological color chart. **Commonwealth Mycological Institute and British Mycological Society**, Kew, Surrey, UK, p.34, 1970.

ROCHA, S. L., GERUM, A. F. A. de A., SANTANA, M. A. **Canais de comercialização de banana in natura no Brasil**. Embrapa Mandioca e Fruticultura, 16p. 2021.

RODRÍGUES, L. L., CRUZ-MARTIN, M., ACOSTA-SUÁREZ, M., PICHARDO, T., BERMÚDEZ-CARABALLOSO, I., ALVARADO-CAPÓ, Y. 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.

ROMEIRO, R. S. **Controle biológico de enfermidades de plantas: fundamentos**. Viçosa, UFV, 269p. 2007.

SCHNEIDER, S., CASSOL, A., LEONARDI, A., MARINHO, M. M. Os efeitos da pandemia da Covid-19 sobre o agronegócio e a alimentação. **Estudos avançados** 34 (100), 2020.

STOVER, R. H. Banana, Plantain, and Abaca Diseases. Kew: **Commonwealth Mycological Institute**, 316p. 1972

TABELA BRASILEIRA DE COMPOSIÇÃO DE ALIMENTOS, 2011. Disponível em:http://www.cfn.org.br/wpcontent/uploads/2017/03/taco_4_edicao_ampliada_e_revisada.pdf . Acesso em: 27/12/2021.

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, 2018.

ANEXO

Meios de cultura utilizados no estudo

Meio Kado & Hekett 523

O meio de cultura proposto por Kado & Heskett (1970) foi um dos utilizados no experimento. É um meio de cultura padrão amplamente adotado para isolamento e cultivo de bactérias que proporciona o crescimento rápido dos microrganismos (Tabela 9).

Tabela 7 - Composição do meio de cultivo Kado & Heskett 523 (1970).

Meio Kado&Heskett 523	(g)
Sacarose	10
Caseína	8
Extrato de levedura	4
Fosfato de potássio dibásico anidro	2
Sulfato de magnésio heptahidratado	0,3
Ágar	18

Fonte: Adaptado de Kado & Heskett, 1970.

Meio batata dextrose ágar (BDA)

O meio de cultura batata dextrose ágar (BDA) é tradicionalmente utilizado em diferentes análises em Fitopatologia. É ideal para o isolamento e crescimento de fitopatógenos, como os fungos e bactérias (Tabela 10).

Tabela 8 - Composição do meio de cultivo BDA.

Meio BDA	(g)
Batata	225
Dextrose	20
Ágar	15

Fonte: Romeiro, 2007.

Meio de cultura *spezieller nährstoffarmer agar* (SNA)

O SNA é um meio de cultura geralmente utilizado para esporulação de fungos fitopatogênicos e obtenção de cultura monospórica.

Tabela 9 - Composição do meio de cultivo SNA.

Meio SNA	g
KH₂PO₄	1,0
KNO₃	1,0
Glicose	0,2
Sacarose	0,2
Ágar	15,0

Fonte: Gerlach, 1982.

Análise de variância - ANOVA

Houveram diferenças significativas entre as cepas bacterianas, os isolados fúngicos e a interação entre estes dois fatores, para os dois testes de inibição do crescimento micelial de isolados de *Fusarium oxysporum*, pelas cepas de *Bacillus* (Tabela 11 e Tabela 12).

Tabela 11 - Influência das cepas bacterianas no crescimento micelial dos isolados de *Fusarium oxysporum*, no primeiro teste de antibiose *in vitro*.

	Grau de liberdade (GL)	Soma dos quadrados	Quadrados médios	Valor de F	p > F
Cepas bacterianas	4	321687907	80421976.6**	477.5715	<0.001
Isolados fúngicos	4	10793746	2698436.6**	16.0242	<0.001
Cepas bacterianas x Isolados	16	7968284	498017.8**	2.9574	0.0017

fúngicos					
Resíduo	50	8419889	168397.8	-	-
CV(%)			12,8		

**significativo ao nível de 1% de probabilidade, pelo teste F.

Tabela 12 - Influência das cepas bacterianas no crescimento micelial dos isolados de *Fusarium oxysporum*, no segundo teste de antibiose *in vitro*.

	Grau de liberdade (GL)	Soma dos quadrados	Quadrados médios	Valor de F	p>F
Cepas bacterianas	4	413008281	103252070.2**	418.7689	<0.001
Isolados fúngicos	4	1119157	279789.3**	1.1384	0.3509
Cepas bacterianas x Isolados fúngicos	16	4157490	259843.1**	1.0539	0.4212
Resíduo	50	12328049	246561.0	-	-
CV(%)			13,7		

**significativo ao nível de 1% de probabilidade, pelo teste F.