



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

LARYSSA MAIA ROCHA AMARAL

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE CEPAS DE *Bacillus* NO MANEJO BIOLÓGICO
DO MAL DO PANAMÁ**

FORTALEZA

2025

LARYSSA MAIA ROCHA AMARAL

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE CEPAS DE *Bacillus* NO MANEJO BIOLÓGICO DO
MAL DO PANAMÁ

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao
Curso de Graduação em Biotecnologia, do
Centro de Ciências, da Universidade Federal do
Ceará, como requisito parcial à obtenção do
grau de Bacharelado em Biotecnologia.

Orientador: Christiana de Fátima Bruce da
Silva

FORTALEZA

2025

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

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

A515a Amaral, Laryssa Maia Rocha.

Atividade antifúngica de cepas de Bacillus no manejo biológico do mal do Panamá / Laryssa Maia Rocha Amaral. – 2025.

38 f. : il. color.

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

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

1. Musa spp.. 2. Mal do Panamá. 3. Antagonismo. 4. Atividade enzimática. I. Título.

CDD 661

LARYSSA MAIA ROCHA AMARAL

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE CEPAS DE *Bacillus* NO MANEJO BIOLÓGICO DO
MAL DO PANAMÁ

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao
Curso de Graduação em Biotecnologia, do
Centro de Ciências, da Universidade Federal do
Ceará, como requisito parcial à obtenção do
grau de Bacharelado em Biotecnologia.

Aprovada em 26/02/2025

BANCA EXAMINADORA

Dra. Christiana de Fátima Bruce da Silva

Embrapa Agroindústria Tropical

Prof. Dr. Humberto Henrique de Carvalho

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Cléberson de Freitas Fernandes

Embrapa Agroindústria Tropical

À minha mãe, minha avó Leda e meu avô Willame, por não deixarem nada faltar, por serem a melhor parte de mim e por me ensinarem a me amar, me amando.

Essa conquista é nossa!

AGRADECIMENTOS

À Embrapa Agroindústria Tropical e Universidade Federal do Ceará, que deu todo o suporte necessário para o trabalho ser realizado, e à Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo aporte financeiro à realização do projeto.

Aos doutores Christiana Bruce, Cléberson Fernandes, Wardsson Lustrino Borges e Humberto Henrique de Carvalho pela ótima orientação.

À toda equipe dos laboratórios de Fitopatologia e Microbiologia do Solo, por ajudarem e apoiarem no árduo dia a dia, em especial Regimara Bernardo e Alana Mara, obrigada pela ajuda, pela parceria de sempre e por todos os ensinamentos.

À minha família, que sempre apoiou meus sonhos e incentivou a alcançá-los, e por me fazerem ser quem eu sou hoje.

Ao meu namorado Luan, que me escuta, apoia e ajuda mais que ninguém. Sou grata por ter te conhecido, meu amor.

Aos meus amigos, por me escutarem e me darem conselhos, por estarem dispostos a ajudar e por serem pessoas com as quais eu posso sempre contar.

RESUMO

A bananicultura é de grande importância econômica e social para o Brasil, com uma produção de 6,8 milhões de toneladas, em 2023. Entretanto, a cultura é acometida pelo mal do Panamá, ocasionada pela espécie *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (FOC), e uma das alternativas para reduzir os impactos é o uso de agentes de controle biológico, como os *Bacillus*. O objetivo desse estudo foi investigar a atividade antifúngica de bactérias do gênero *Bacillus* no controle da doença, além de avaliar a atividade enzimática lítica das bananeiras inoculadas. Assim, foram usadas mudas micropropagadas de bananeira da cultivar ‘Prata Catarina’, quatro cepas de *Bacillus* (LPPC242, LPPC259, LPPC262 e LPPC283) e um isolado de FOC (RFB65), divididos em 5 tratamentos: T1: inoculação bacteriana, T2: inoculação fúngica, T3: inoculação da bactéria e fungo; T4: inoculação fúngica e fungicida tiabendazole; e T5: controle (sem inoculação). A inoculação bacteriana (concentração de 10^7 ufc mL⁻¹) foi aplicada no colo das mudas 7 dias antes da inoculação com o fungo e repetida a cada 15 dias. A inoculação do fungo foi feita através do corte e imersão das raízes em suspensão de esporos (concentração de 10^6 esporos mL⁻¹) por 30 minutos, enquanto que, as plantas controle foram imersas em água destilada estéril. As mudas foram mantidas em casa de vegetação durante 60 dias e, na última coleta, foram avaliados sintomas como a murcha, amarelecimento das folhas e rachaduras no pseudocaule (externos); e manchas avermelhadas ou necrose do rizoma (internos), com auxílio de escala descritiva de notas e, cálculo do índice de severidade da doença (ISD). Além disso, as mudas dos tratamentos T1B2, T2, T3B2, T4 e T5 foram inativadas com nitrogênio líquido, e foi feito um extrato proteico para cada, em 10 tempos de coleta distintos. Realizou-se um ensaio de proteínas totais e ensaio enzimático de quitinase e β-1,3-glucanase. Os tratamentos T1 e T5 não demonstraram sintomas do mal do Panamá, já o tratamento T2 teve 53,3 % de ISD para sintomas externos e 33,2 % para sintomas internos, e as mudas tratadas com fungicida e fungo (tratamento T4) obtiveram 30 % de ISD para sintomas externos e 28,5 % para sintomas internos. Por fim, as mudas submetidas a indução de resistência com as cepas de *Bacillus* obtiveram os seguintes ISD: 0% para sintomas externos e 14,2 % para sintomas internos (LPPC259), 6,6% para sintomas externos e 14,2 % para sintomas internos (LPPC283), 13,3 % para sintomas externos e 18,9 % para sintomas internos (LPPC242) e 26,6 % para sintomas externos e 28,5 % para sintomas internos (LPPC262). A análise enzimática indicou que a presença de *Bacillus* estimulou uma maior atividade de β-1,3-glucanase e quitinase. Os

tratamentos biológicos apresentaram uma indução mais precoce e constante da atividade enzimática, em comparação com as plantas apenas com o inóculo fúngico e as tratadas com fungicida, que mostraram flutuações na resposta de defesa. Os resultados desse estudo reforçam o uso de *Bacillus* como estratégia eficaz e sustentável para o manejo do mal do Panamá, promovendo maior resistência das plantas ao patógeno.

Palavras-chave: *Musa* spp., mal do Panamá, antagonismo, atividade enzimática.

ABSTRACT

Banana cultivation has great economic and social importance to Brazil, with a production of 6.8 million tons in 2023. However, the crop is affected by *Fusarium* wilt, caused by the species *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (FOC), and one of the alternatives to reduce the impacts is the use of biological control agents, such as *Bacillus*. The objective of this study was to investigate the antifungal activity of bacteria from the *Bacillus* genus in controlling the disease, as well as to evaluate the lytic enzymatic activity in inoculated banana plants. For this purpose, micropropagated banana seedlings of the 'Prata Catarina' cultivar, four strains of *Bacillus* (LPPC242, LPPC259, LPPC262, and LPPC283), and one FOC isolate (RFB65) were used, divided into five treatments: T1: bacterial inoculation, T2: fungal inoculation, T3: bacterial and fungal inoculation, T4: fungal inoculation and thiabendazole fungicide, and T5: control (without inoculation). Bacterial inoculation (concentration of 10^7 CFU mL $^{-1}$) was applied at the base of the seedlings seven days before fungal inoculation and repeated every 15 days. The fungal inoculation was performed by cutting and immersing the roots in a spore suspension (concentration of 10^6 spores mL $^{-1}$) for 30 minutes, while control plants were immersed in sterile distilled water. The seedlings were kept in a greenhouse for 60 days, and in the final collection, symptoms such as wilting, leaf yellowing, and pseudostem cracks (external) and reddish spots or rhizome necrosis (internal) were evaluated using a descriptive scoring scale and calculation of the disease severity index (DSI). Additionally, seedlings from treatments T1B2, T2, T3B2, T4, and T5 were inactivated with liquid nitrogen, and a protein extract was obtained for each, for 10 different harvesting times. Total protein assays and enzymatic assays for chitinase and β -1,3-glucanase were conducted. Treatments T1 and T5 showed no symptoms of *Fusarium* wilt, while treatment T2 had a 53.3 % DSI for external symptoms and 33.2 % for internal symptoms, and seedlings treated with fungicide and fungus (treatment T4) had a DSI of 30 % for external symptoms and 28.5 % for internal symptoms. Finally, seedlings subjected to resistance induction with *Bacillus* strains had the following DSI values: 0 % for external symptoms and 14.2 % for internal symptoms (LPPC259), 6.6 % for external symptoms and 14.2 % for internal symptoms (LPPC283), 13.3 % for external symptoms and 18.9 % for internal symptoms (LPPC242), and 26.6 % for external symptoms and 28.5 % for internal symptoms (LPPC262). Enzymatic analysis indicated that the presence of *Bacillus* stimulated greater activity of β -1,3-glucanase and chitinase. The biological treatments showed an earlier and more consistent induction of enzymatic activity compared to plants with only fungal inoculum and those treated

with fungicide, which showed fluctuations in the defense response. The results of this study reinforce the use of *Bacillus* as an effective and sustainable strategy for managing Panama disease, promoting greater resistance of plants to the pathogen.

Keywords: *Musa* spp., *Fusarium* wilt, antagonism, enzymatic activity.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	OBJETIVOS	13
2.1	Objetivo geral	13
2.2	Objetivos específicos	13
3	METODOLOGIA	14
3.1.	Obtenção do isolado de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> (Foc) e das cepas de <i>Bacillus</i> sp.	14
3.2	Cultivo das mudas micropropagadas de bananeira para o experimento	14
3.3	Inoculação bacteriana.....	15
3.4	Inoculação fúngica	16
3.5	Delineamento experimental.....	16
3.6	Avaliação dos sintomas	17
3.7	Extração de proteínas a partir de material vegetal.....	18
3.8	Quantificação de proteínas totais	18
3.9	Análise da atividade enzimática da quitinase (QUI).....	19
3.10	Análise da atividade enzimática da β -1,3-glucanase (GLU)	20
4	RESULTADOS	23
4.1	Avaliação da severidade da doença	23
4.2	Análise enzimática da quitinase (QUI)	29
4.3	Análise enzimática da β-1,3-glucanase (GLU)	31
5	DISCUSSÃO	34
6	CONCLUSÃO	35
	REFERÊNCIAS	36

1 INTRODUÇÃO

A banana (*Musa* spp.), é a fruta fresca mais consumida do mundo, sendo originária do continente asiático (Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2021). A cultura tem uma grande diversidade de cultivares, com mais de 700 cultivares conhecidas, o que reflete a adaptabilidade das bananeiras a diferentes condições de cultivo (Mata *et al.*, 2024). A bananicultura tem papel relevante na segurança alimentar brasileira, uma vez que é uma fonte acessível de nutrientes, como carboidratos, potássio, vitaminas e fibras (Rosso, 2013). Assim, é óbvio a relevância da cadeia produtiva da banana para a economia brasileira, sendo uma das frutíferas mais produzidas do agronegócio brasileiro (Vidal, 2021). Em 2023, a bananicultura no Brasil alcançou a produção de 6,8 milhões de toneladas, sendo o sexto maior produtor mundial, gerando R\$13,8 bilhões por ano e 500 mil empregos diretos, segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. O Ceará é responsável por 420 mil toneladas dessa produção, sendo o oitavo maior estado produtor de banana, sendo o Limoeiro do Norte, o município cearense de maior produção (IBGE, 2023).

Entretanto, os fatores bióticos e abióticos são os principais responsáveis por grandes perdas no rendimento na bananicultura. Dentre eles, os fungos são os maiores causadores de doenças em bananeiras, afetando parte aérea, sistema radicular e ocasionando danos na pós-colheita (Ferreira, *et al.*, 2016).

Entre as doenças fúngicas que afetam a bananicultura tem-se a murcha do *Fusarium* ou mal do Panamá. A enfermidade é considerada a mais destrutiva da cultura e endêmica nas áreas produtoras de banana (Dita *et al.*, 2018). É ocasionada por uma forma *specialis* do complexo fúngico *Fusarium oxysporum*, que afeta especialmente plantas do gênero *Musa*, o *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (E.F. Smith) W.C. Snyder & H.N. Hansen (referido como Foc) (Ploetz, 2015).

O Foc é um patógeno de solo com alta capacidade de sobrevivência e de grande dificuldade de controle, uma vez que o fungo consegue sobreviver no solo, por mais de 20 anos, mesmo sem hospedeiro ou utilizando um hospedeiro alternativo (Ploetz, 2015), devido a uma estrutura de resistência, chamada clámidosporo (Dita *et al.*, 2018). Além disso, o fungo consegue dispersar-se pelo uso de rizomas de bananeira, por solo contaminado e pela água de irrigação (Bubici *et al.*, 2019).

O fungo infecta a bananeira penetrando as raízes e colonizando os tecidos de xilema, colonizando o rizoma e, posteriormente, infectando o pseudocaule (Ploetz, 2006). Dessa forma, os sintomas causados pela infecção podem ser tanto internos quanto externos, sendo eles: raízes

e rizomas infeccionados e com manchas vermelhas, rachadura do pseudocaule, quebra de folhas, murcha e amarelecimento foliar (Ploetz, 2015). Ademais, uma vez que o Foc se estabelece no solo, é praticamente impossível erradicá-lo por completo (Dita *et al.*, 2018), portanto, faz-se urgente o uso de práticas de manejo do patógeno.

A forma de controle mais utilizada é o uso de cultivares resistentes à doença, porém, devido ao surgimento de várias raças distintas de Foc, dificulta-se o uso da técnica (Ploetz, 2006). O uso de fungicidas, como o thiabendazole é também recomendado (AGROFIT, 2025), entretanto, estes produtos podem causar danos ambientais e na saúde humana e animal, e o patógeno pode adquirir resistência ao defensivo agrícola, devido ao uso excessivo deste (Boulahouat *et al.*, 2023). Dessa maneira, o controle biológico de doenças vem sendo considerado uma forma alternativa viável para tratamento, uma vez que é uma técnica sustentável e ecologicamente correta.

Um dos agentes de controle biológico mais estudados são as bactérias do gênero *Bacillus*, microrganismos associados a rizosfera das plantas (Xue *et al.*, 2015). Estas bactérias adaptam-se facilmente a ambientes hostis, por produzirem endósporos e, apresentam a capacidade de produção de diferentes compostos antimicrobianos (Boulahouat *et al.*, 2023). Os *Bacillus* apresentam diferentes mecanismos de ação, tais como: antibiose, parasitismo e competição por nutrientes e espaço na rizosfera. Estes mecanismos são diretos de ação. Enquanto os indiretos envolvem a indução de resistência sistêmica e local e promoção de crescimento, por meio de fixação de nitrogênio e solubilização de fosfato (Bubici *et al.*, 2019).

Dentre os mecanismos diretos de ação, a antibiose é um processo em que o agente de controle libera biomoléculas antimicrobianas para proteger contra patógenos. Entre essas moléculas antagonistas, tem-se as enzimas líticas (Boulahouat *et al.*, 2023), que tem papel importante no controle biológico de fitopatógenos, principalmente com a produção da quitinase e da β -1,3-glucanase. Os patógenos apresentam em sua parede celular, principalmente a quitina e a β -1,3-glucana. A quitina é um homopolímero insolúvel formado de subunidades de N-Acetyl-glucosamina, e age como suporte da parede celular. Já a β -1,3-glucana é considerada o componente principal da parede, se ligando covalentemente aos outros componentes, dando força e estabilidade para as células fúngicas (Carmona-Hernandez *et al.*, 2019). Dessa forma, os agentes de controle secretam as enzimas líticas, como a quitinase e β -1,3-glucanase, suprimindo o desenvolvimento dos patógenos fúngicos, atuando na degradação desses compostos (Narayanasamy, 2013). A quitinase atua na quebra de ligações glicosídicas da quitina, enquanto a β -1,3-glucanase realiza a hidrólise do polissacarídeo β -1,3-glucana, em sacarídeos monoméricos ou oligoméricos de glicose (Boulahouat *et al.*, 2023). Além da antibiose, as

enzimas líticas estão envolvidas no processo de indução de resistência, que pode ser por meio da indução de mecanismos naturais de resistência a doenças, no qual o indutor de resistência, como as bactérias, induz um aumento sistêmico significativo nas atividades das enzimas de defesa, como as enzimas líticas (Narayanasamy, 2013).

Considerando o impacto econômico do mal do Panamá, a nível de produção nacional, buscam-se formas de manejo mais sustentáveis e eficientes a longo prazo. Uma vez que as alternativas existentes apresentam limitações, o controle biológico surge como alternativa promissora, principalmente utilizando as bactérias do gênero *Bacillus*. Dessa forma, propõe-se comprovar a hipótese de que o inóculo de cepas de *Bacillus* sp., atuam no controle biológico do mal do Panamá, em bananeiras *in vivo*, a partir do mecanismo de antibiose e aumento na indução de atividade quitinásica e β -1,3-glucanásica.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Investigar a interação de cepas de *Bacillus* na infecção por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, para o manejo do mal do Panamá.

2.2 Específicos

1. Quantificar a severidade do mal do Panamá em bananeiras, quando submetidas a inoculação com cepas de *Bacillus*;
2. Quantificar a atividade das enzimas β -1,3-glucanase e quitinase, quando submetidas a inoculação com cepas de *Bacillus*.

3 METODOLOGIA

3.1. Obtenção do isolado de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) e das cepas de *Bacillus* sp.

O isolado do patógeno fúngico utilizado foi obtido a partir de amostras de rizoma e pseudocaule de bananeiras infectadas com o mal do Panamá. As amostras foram coletadas de áreas produtoras de banana da região Nordeste. A cultura pura do isolado foi obtida a partir do cultivo monospórico, de acordo com a metodologia de Leslie e Summerell (2008), recebendo, posteriormente, o código RFB65.

As cepas bacterianas foram obtidas a partir de amostras de rizosfera de bananeiras assintomáticas (tabela 1). As quatro cepas de *Bacillus* sp. utilizadas durante o experimento foram testadas previamente, em estudos preliminares *in vitro*, contra o Foc.

Tabela 1: Cepas de *Bacillus* sp. coletadas de rizosfera de bananeiras assintomáticas, em estados produtores de banana, da região Nordeste.

Código	Local de coleta	Cultivar
LPPC 242	Barbalha - CE	-
LPPC 259	Umirim - CE	-
LPPC 262	Russas – Agrícola	Banana Cavendish
LPPC 283	Assu – RN	Banana Cavendish

Fonte: elaborado pela autora.

3.2 Cultivo das mudas micropagadas de bananeira para o experimento

O experimento foi conduzido em casa de vegetação da Embrapa Agroindústria Tropical (CNPAT), localizada em Fortaleza-CE, de março a setembro de 2023.

As mudas micropagadas de bananeira cv. Prata Catarina retiradas das condições *in vitro* foram cultivadas em tubetes plásticos (288 cm³) contendo substrato constituído de fibra de coco esterilizada. Foram utilizadas 330 mudas de bananeira, sob condições de casa de vegetação (50% de sombreamento e irrigação por nebulização), e adubadas no momento do plantio com adubo de liberação lenta Osmocote (14-14-14).

Após aproximadamente quatro meses de cultivo, as plantas foram transferidas para sacos plásticos (4L) contendo solo arenoso fumigado. Neste período iniciou-se a adubação das plantas com soluções de macro e micronutrientes (Cometti *et al.*, 2006)

A solução de macronutrientes foi preparada com 250 gramas de Monoamônio fosfato (MAP), 85 gramas de Ureia e 135 gramas de Cloreto de Potássio (KCl). Os reagentes foram dissolvidos em 10 litros de água destilada, e foram aplicados 20 mililitros de solução por muda. Já a solução de micronutrientes foi preparada com 5,5 gramas de ácido bórico (H_3BO_3), 10 gramas de Sulfato de Cobre ($CuSO_4 \cdot H_2O$), 133,5 gramas de TensoFe, 18,5 gramas de Sulfato de Manganês ($MnSO_4 \cdot H_2O$) e 0,75 gramas de Molibdato de Sódio ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$). Os reagentes foram diluídos em 1 litro de água destilada, e a partir dessa solução estoque, foi coletado 166 mililitro e diluídos novamente em 5 litros de água destilada, e foram aplicados 10 mililitros de solução por muda. Essa adubação foi repetida 6 vezes, a cada quinze dias.

3.3 Inoculação bacteriana

A inoculação bacteriana foi realizada uma semana antes da montagem do experimento, sendo repetida a cada quinze dias. Inicialmente, em laboratório, foi feito um pré-inóculo, no qual se transferiu um pouco do microrganismo mantido em meio de cultura Kado & Heskett (10 g/L de sacarose, 8 g/L de caseína hidrolisada, 4 g/L de extrato de levedura, 2 g/L de K_2HPO_4 , 0,3g/L de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ e 15 g/L de ágar) para um erlenmeyer de 100mL, contendo 50mL de meio NYD, que foi incubado em shaker a 200 rpm a 30 °C, por 24 horas. Em seguida, transferiu-se 10mL do pré-inóculo para erlenmeyer contendo 90mL de meio NYD, que foi novamente incubado em incubadora tipo shaker a 200 rpm a 30 °C, por 16 horas. Para a obtenção da biomassa pura, foi necessário centrifugar o inóculo presente nos erlenmeyers duas vezes, a primeira por 15 minutos a 4400 rpm, e, em seguida, descartou-se o sobrenadante, adicionou-se 250 mL de água destilada estéril (ADE) e homogeneizou, e a segunda centrifugação por 23 minutos a 4400 rpm. Depois, o sobrenadante foi descartado, e adicionou-se 200 mL de ADE e homogeneizou, obtendo a biomassa pura. Em seguida, foram inoculados 6mL da biomassa pura em cada muda, com concentração de 10^7 ufc/mL, nos tratamentos que receberam o inóculo bacteriano.

3.4 Inoculação fúngica

O inóculo fúngico foi preparado com placas do isolado RFB65, crescido em meio Batata Dextrose Ágar (BDA), por 7 dias. Em seguida, foi adicionado água destilada esterilizada (ADE)+Tween (2,5%) na superfície da colônia fúngica, feito uma raspagem com escova de cerdas macias e a suspensão foi filtrada em dupla camada de gaze. Depois, realizou-se o ajuste da concentração de esporos para 10^6 esporos por mL, com o auxílio de hemacitômetro. Para inocular o fungo nas mudas, as raízes foram cortadas com auxílio de tesoura desinfestada, com álcool 70%, e imersas na suspensão de esporos por 30 minutos. Depois, as mudas foram retransplantadas para sacos com solo arenoso fumigado e mantidas em câmara úmida por 72 horas iniciais do experimento sob elevada umidade relativa (maior igual a 80%) e temperatura de 30 $\pm 2^\circ\text{C}$.

Para as análises das atividades enzimáticas, as mudas foram coletadas em 10 tempos diferentes, sendo eles 0, 12, 24, 48, 72 e 96 horas e 15, 30, 45 e 60 dias, após o início do experimento (conforme descrito no item delineamento experimental). Foram coletadas 3 mudas de cada tratamento, mantidas inicialmente em nitrogênio líquido, para serem inativadas, e, em seguida, armazenadas em ultrafreezer (a -80°C).

3.5 Delineamento experimental

O delineamento experimental consistiu no plantio das 360 mudas micropropagadas de bananeira cv. Prata Catarina, divididas igualmente em 11 tratamentos. Os tratamentos foram os seguintes (T- tratamento; B- bactéria):

- T1B1: planta inoculada com a cepa bacteriana LPPC242;
- T1B2: planta inoculada com a cepa bacteriana LPPC259;
- T1B3: planta inoculada com a cepa bacteriana LPPC262;
- T1B4: planta inoculada com a cepa bacteriana LPPC283;
- T2: planta inoculada com o fungo RFB65;
- T3B1: planta inoculada com a cepa bacteriana LPPC242 e fungo RFB65;
- T3B2: planta inoculada com a cepa bacteriana LPPC259 e fungo RFB65;
- T3B3: planta inoculada com a cepa bacteriana LPPC262 e fungo RFB65;
- T3B4: planta inoculada com a cepa bacteriana LPPC283 e fungo RFB65;
- T4: planta inoculada com fungo RFB65 e fungicida tiabendazol (0,92 mL/L);
- T5: planta controle, sem nenhuma inoculação.

3.6 Avaliação dos sintomas

Ao final do período do experimento, após 60 dias, foram quantificadas a severidade da doença em cada um dos tratamentos, utilizando uma escala de notas (tabelas 2 e 3). Com a escala foram avaliados os sintomas internos (raízes e rizomas infecionados e necróticas) e externos (rachadura do pseudocaule, quebra de folhas, murcha e amarelecimento foliar) do mal do Panamá (Fortunato *et al.*, 2012).

Tabela 2: Método de avaliação de sintomas externos.

Nota	Avaliação do sintoma externo
1	Plantas saudáveis;
2	Folhas com amarelecimento parcial, sem necrose;
3	Amarelecimento intenso das folhas e início de necrose;
4	Amarelecimento intenso das folhas, necrose intensa e deformação foliar;
5	Plantas mortas.

Fonte: Fortunato *et al*, 2012.

Tabela 3: Método de avaliação de sintomas internos.

Nota	Avaliação do sintoma interno
1	Rizoma sem manchas;
2	Região central do rizoma sem manchas, mas escurecimento da região entre o rizoma e as raízes;
3	5 % de escurecimento na região central do rizoma;
4	6 a 20% de escurecimento na região central do rizoma;
5	21 a 49% de escurecimento na região central do rizoma;
6	Mais que 50% de escurecimento na região central do rizoma;
7	Plantas mortas

Fonte: Fortunato *et al*, 2012.

A partir dessas notas, pode-se calcular o índice de severidade da doença (ISD) em porcentagem (McKinney, 1923), para cada sintoma (interno e externo), baseado na fórmula seguinte:

$$\text{ISD}(\%) = \frac{\sum(\text{Nota} * \text{frequência da nota})}{\text{Nota máxima da escala} * \text{Número de repetições por tratamento}} * 100$$

Os dados de ISD (%) obtidos foram submetidos a análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott ($\alpha = 0,05\%$), utilizando o programa estatístico Sisvar.

3.7 Extração de proteínas a partir de material vegetal

A extração foi realizada a partir da maceração de pedaços de raízes e rizoma de cada muda coletada dos tratamentos, com nitrogênio líquido. Em seguida, foi feita a adição de tampão acetato de sódio (50mM, pH 5,2) na concentração de 10:1, e agitação do macerado por 10 minutos. Logo após, o líquido foi filtrado e armazenado em tubos Falcon para serem centrifugados a 10000 g por 20 minutos, a 4 °C. Após essa etapa, o extrato foi dialisado contra o tampão acetato de sódio, por 24 horas, e depois, armazenado em ultrafreezer.

Com os resultados obtidos do experimento *in vivo* (descrito no item 4.1. dos resultados), o restante das análises enzimáticas foi realizada com foco na cepa bacteriana LPPC259, uma vez que esta foi a cepa que apresentou os melhores resultados no experimento de casa de vegetação. Assim, foram feitas análises enzimáticas para os tratamentos T1B2, T2, T3B2, T4 e T5.

3.8 Quantificação de proteínas totais

Após o término da extração de todas as amostras biológicas, foi feito a dosagem de proteínas totais obtidas pelo método descrito por Bradford (1976). A quantificação foi realizada em microplacas, com triplicatas de cada amostra biológica. Foi adicionado 10 µL de amostra e 250 µL do reagente de Bradford em cada poço, sendo usado 10 µL de água Milli-Q e mesma quantidade do reagente como branco. Em seguida, a microplaca foi lida em espectrofotômetro a 595 nanômetros. Assim, com os resultados das absorbâncias, foi possível calcular a média, desvio padrão, coeficiente de variância, quantidade de miligramas de proteína por mL de amostra, e por grama de amostra.

3.9 Análise da atividade enzimática da quitinase (QUI)

O ensaio enzimático da quitinase foi baseado no protocolo de Boller (1992), que tem como base a capacidade da amostra, que contenha a enzima, de liberar N-acetil-D-glucosamina (NAG), a partir da ação hidrolítica sobre a quitina coloidal.

Para iniciar o ensaio, foi obtida a curva padrão do NAG, que consiste na adição, em tubos eppendorf com tampa rosqueada, de

- 100 µL do reagente NAG (1mM), nas concentrações de 100, 200, 300, 400, 500 e 600 µM;
- 400 µL de tampão Acetato de Sódio (50mM, pH 5,2);
- 100 µL de Solução de Tetraborato de Potássio (0,6M).

Após misturar os reagentes acima, os tubos foram incubados em banho-maria, a 100 °C por 5 minutos, e resfriados em banho de gelo, também por 5 minutos. Em seguida, adicionou-se 1000 µL do Reagente DMAB (10%), dissolvido em ácido acético glacial contendo 12,5% (v/v) de ácido clorídrico (11,5M), diluído 2x com ácido acético glacial.

Em seguida, os tubos foram agitados em vórtex, para homogeneizar, e incubados em banho-maria a 37 °C por 20 minutos. Então, a absorbância das misturas reacionais foi lida a 585 nm, em cubeta de acrílico. Para cada ponto da curva, foram feitas 3 repetições. Por fim, foi construída a curva padrão [Abs585nm (ordenada) versus concentração (nmoles/1600 µL) de NAG (abscissa)] e calculada a cotangente da reta para obtenção do fator de conversão (Fc). Para realizar o ensaio enzimático, foi adicionado, em tubos eppendorf, 250 µL da amostra e 250 µL da solução de quitina coloidal (10 mg/mL). Esses tubos foram homogeneizados, em vórtex, e incubados em banho-maria, a 37 °C, por 60 minutos. Em seguida, foram incubados a 100 °C por 5 minutos, e resfriados em banho de gelo, também por 5 minutos. Após essa etapa, os tubos foram centrifugados a 10.000 x g, por 10 minutos.

Em seguida, foram resgatados 300 µL do sobrenadante final para um novo tubo eppendorf, e adicionou-se 10 µL de solução contendo β-Glucoronidase, diluída 10x. Esses tubos retornaram novamente para o banho-maria a 37 °C, por 60 minutos, e foram levados, depois, para incubação a 100 °C por 5 minutos, e resfriados em banho de gelo, por 5 minutos.

Posteriormente, adicionou-se 190 µL do Tampão Acetato de Sódio (50mM, pH 5,2) e 100 µL da solução de Tetraborato de Potássio (0,6M), levando novamente os tubos para incubação a 100 °C por 5 minutos, e resfriamento em banho de gelo, por 5 minutos. Por fim, foram adicionados 1000 µL da solução de DMAB (10%) nos tubos, que foram homogeneizados, em vórtex, e incubados a 37 °C, por 20 minutos. Assim, as misturas reacionais contidas nos tubos

tiveram suas absorbâncias lidas, em espectrofômetro, a 585 nm. Além das leituras, em triplicata, das amostras biológicas, foi feito o controle do branco da amostra, na qual a alíquota da quitina coloidal foi substituída por solução tampão Acetato de Sódio.

A atividade da QUI foi determinada, pelo cálculo da ΔAbs das amostras, a partir da fórmula:

$$\Delta\text{Abs}_{585\text{nm}} = \text{Abs}_{\text{amostra}} - \text{Abs}_{\text{branco amostra}}$$

Após isso, foi feito o cálculo do resultado corrigido para volume de 1 mL, do resultado expresso por segundo, do resultado expresso em nmoles de NAG liberado/mL/min, a partir do fator de conversão, do resultado expresso em nmoles de NAG liberado/mL/min/mg de proteína e em nmoles de NAG liberado/mL/min/g de massa fresca do tecido. Os resultados expressos em nmoles de NAG liberado/mL/min/mgP para cada tratamento, em cada tempo de coleta, foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey com $p \leq 0,05$, utilizando uma comparação entre os tratamentos, por meio do programa estatístico Sisvar.

3.10 Análise da atividade enzimática da β -1,3-glucanase (GLU)

O ensaio enzimático da β -1,3-glucanase foi baseado no protocolo de Boller (1992), que tem como base a capacidade da amostra, que contenha a enzima, de liberar glucose, a partir da degradação de laminarina, polissacarídeo utilizado como substrato.

Para iniciar o ensaio, foi obtida a curva padrão da glucose, que consistiu na adição, em tubos de ensaio (20mL), de:

- 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80 e 100 μL de solução padrão de glucose (300 $\mu\text{g}/\text{mL}$);
- 1000, 990, 980, 970, 960, 950, 940, 920 e 900 μL de tampão Acetato de Sódio (50mM, pH 5,2), a fim de que a mistura dos reagentes adicionados complete 1000 μL ;
- 1000 μL do Reagente E, que é composto de 25mL do Reagente C (25 g de Na_2CO_3 (anidro), 25 g de $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 20 g de NaHCO_3 , 200 g de Na_2SO_4 (anidro) e 1000mL de H_2O deionizada) e por 1 mL do Reagente D (15 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 1 a 2 gotas de H_2SO_4 e 100 mL de H_2O deionizada).

Após misturar os reagentes acima, os tubos foram incubados em banho-maria, a 100 °C por 30 minutos, e resfriados em água, por 5 minutos. Em seguida, adicionou-se:

- 1000 µL do Reagente H, que é composto pelo Reagente F (21 mL de H₂SO₄, 25 g de (NH₄)₆Mo₇O₂₄·5H₂O e 450 mL de H₂O deionizada) e pelo Reagente G (3 g de Na₂HAsO₄·7H₂O e 25 mL de H₂O deionizada).

Em seguida, os tubos foram agitados em vórtex, até remover completamente os gases formados, e deixados em repouso por 5 minutos. Então, a absorbância das misturas reacionais foi lida a 520 nm, em cubeta de acrílico. Para cada ponto da curva, foram feitas 3 repetições. Por fim, foi construída a curva padrão [Abs_{520nm} (ordenada) versus concentração (µg/mL) de glucose (abscissa)] e calculada a cotangente da reta para obtenção do fator de conversão (Fc).

Para realizar o ensaio enzimático, foi adicionado, em tubos de ensaio (20 mL), 100 µL da amostra e 900 µL da solução de Laminarina (2mg/mL). Essa mistura foi incubada em banho-maria, a 50 °C, por 30 minutos. Em seguida, foi adicionado 1000 µL do reagente E, e novamente incubado em banho-maria, mas a 100 °C, por 30 minutos, e posteriormente resfriado em água por 5 minutos. Após, foi adicionado 1000 µL do reagente H, e os tubos foram agitados em vórtex, para remover os gases formados, e deixados em repouso por 5 minutos.

Além das leituras, em triplicata, das amostras biológicas, foram feitos os seguintes controles:

- (a) Branco dos reagentes: Alíquota da amostra e da laminarina substituída por Tampão Acetato de Sódio (50mM, pH 5,2);
- (b) Branco da laminarina: Alíquota da amostra foi substituída por Tampão Acetato de Sódio;
- (c) Branco da amostra: Alíquota da laminarina foi substituída por Tampão Acetato de Sódio.

Em seguida, os tubos tiveram a absorbância lida em espectrofotômetro, a 520 nm.

A atividade da GLU foi determinada, pelo cálculo da ΔAbs das amostras, a partir da fórmula:

$$\Delta Abs_{520nm} = [(Abs_{amostra} - Abs_{branco\ amostra}) \\ - (Abs_{branco\ laminarina} - Abs_{branco\ reagente})]$$

Após isso, foi feito o cálculo do resultado corrigido para volume de 1 mL, do resultado expresso por segundo, do resultado expresso em µg de glucose liberada/mL/min, a partir do fator de conversão, do resultado expresso em nanomol de glucose liberada/mL/min, que

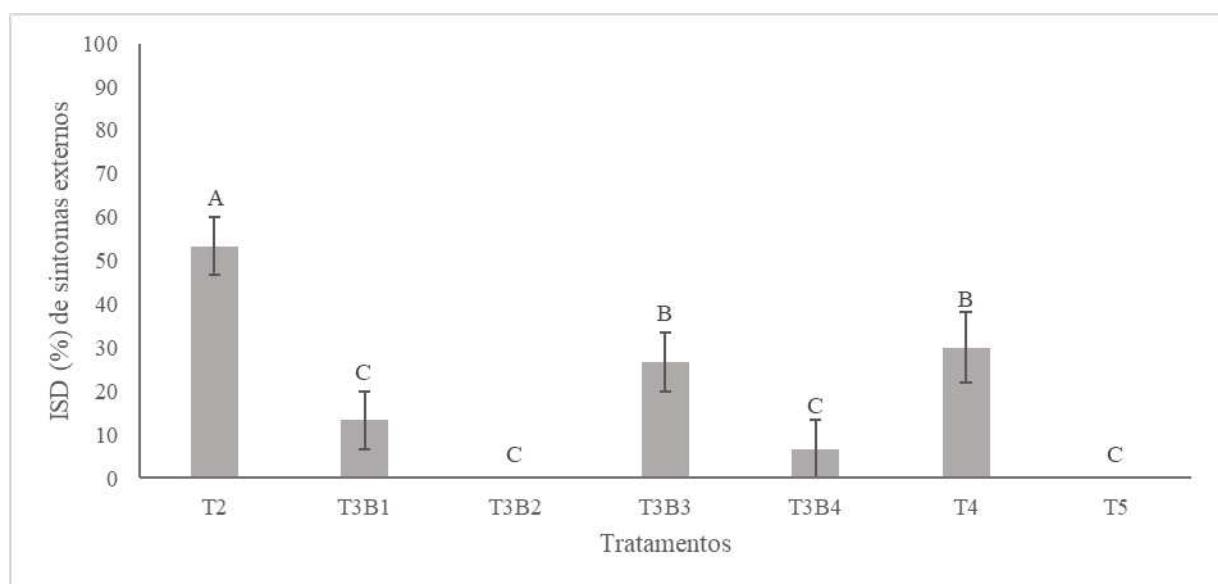
equivale ao resultado expresso por nkat, do resultado expresso em nkat/mg de proteína e em nkat/g de massa fresca do tecido. Os resultados expressos em nkat/mgP para cada tratamento, em cada tempo de coleta, foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey com $p \leq 0,05$, utilizando uma comparação entre os tratamentos, por meio do programa estatístico Sisvar.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação da severidade da doença

Após 60 dias de experimento, foram avaliados os sintomas externos e internos, sendo possível a quantificação da severidade da doença, para cada tratamento (figuras 1 e 2).

Figura 1 - Quantificação do índice de severidade da doença (ISD), por tratamento, a partir da avaliação de sintomas externos, após 60 dias de inoculação.

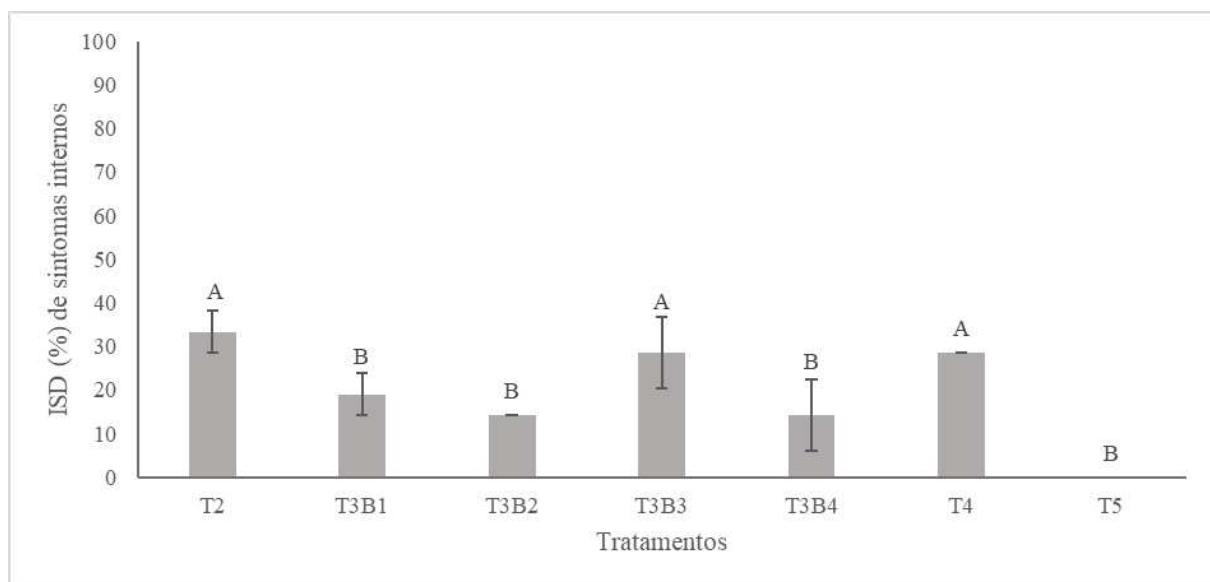


Fonte: elaborado pela autora

T2: planta inoculada com o fungo RFB65; T3B1: planta inoculada com a cepa bacteriana LPPC242 e fungo RFB65; T3B2: planta inoculada com a cepa bacteriana LPPC259 e fungo RFB65; T3B3: planta inoculada com a cepa bacteriana LPPC262 e fungo RFB65; T3B4: planta inoculada com a cepa bacteriana LPPC283 e fungo RFB65; T4: planta inoculada com fungo RFB65 e fungicida tiabendazole; T5: planta controle, sem nenhuma inoculação.

Os resultados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas utilizando teste de Scott-Knott com $p \leq 0,05$. O erro padrão está indicado em cada barra.

Figura 2 - Quantificação do índice de severidade da doença (ISD), por tratamento, a partir da avaliação de sintomas internos, após 60 dias de inoculação.



Fonte: elaborado pela autora

T2: planta inoculada com o fungo RFB65; T3B1: planta inoculada com a cepa bacteriana LPPC242 e fungo RFB65; T3B2: planta inoculada com a cepa bacteriana LPPC259 e fungo RFB65; T3B3: planta inoculada com a cepa bacteriana LPPC262 e fungo RFB65; T3B4: planta inoculada com a cepa bacteriana LPPC283 e fungo RFB65; T4: planta inoculada com fungo RFB65 e fungicida tiabendazole; T5: planta controle, sem nenhuma inoculação.

Os resultados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas utilizando teste de Scott-Knott com $p \leq 0,05$. O erro padrão está indicado em cada barra.

As plantas inoculadas apenas com as cepas bacterianas de *Bacillus* utilizadas no presente estudo, assim como o tratamento controle (inoculado com água destilada estéril), não causaram sintomas visíveis do mal do Panamá nas mudas micropropagadas de bananeira cv. Prata Catarina (tabela 4; figuras 3 e 4 – a, b, c, d e k). Entretanto, o tratamento com as mudas inoculadas com o fungo RFB65 foi patogênico e, apresentou alta severidade de doença, quando comparado com as mudas não inoculadas (tabela 4; figuras 3 e 4 - e).

Ademais, sobre as formas de controle utilizadas, pode-se afirmar que as mais eficientes foram as cepas LPPC259 (tabela 4; figuras 3 e 4 – g) e LPPC283 (tabela 4; figuras 3 e 4 – i). Em seguida, tem-se os seguintes tratamentos restantes, em ordem crescente de ISD: LPPC242 (tabela 4; figuras 3 e 4 – f); LPPC262 (tabela 4; figuras 3 e 4 – h); e, por fim, o fungicida (tabela 4; figuras 3 e 4 - j).

Tabela 4 - Índice de severidade da doença, a partir da avaliação dos sintomas internos e externos das plantas após 60 dias da inoculação fúngica.

Tratamentos		T1B1	T1B2	T1B3	T1B4	T2	T3B1	T3B2	T3B3	T3B4	T4	T5
Índice de Severidade da Doença - ISD (%)	Sintomas externos	0	0	0	0	53,3	13,3	0	26,6	6,6	30	0
	Sintomas internos	0	0	0	0	33,2	18,9	14,2	28,5	14,2	28,5	0

Fonte: elaborado pela autora

T1B1: planta inoculada com a cepa bacteriana LPPC242; T1B2: planta inoculada com a cepa bacteriana LPPC259; T1B3: planta inoculada com a cepa bacteriana LPPC262; T1B4: planta inoculada com a cepa bacteriana LPPC283; T2: planta inoculada com o fungo RFB65; T3B1: planta inoculada com a cepa bacteriana LPPC242 e fungo RFB65; T3B2: planta inoculada com a cepa bacteriana LPPC259 e fungo RFB65; T3B3: planta inoculada com a cepa bacteriana LPPC262 e fungo RFB65; T3B4: planta inoculada com a cepa bacteriana LPPC283 e fungo RFB65; T4: planta inoculada com fungo RFB65 e fungicida tiabendazole; T5: planta controle, sem nenhuma inoculação.

Figura 3 – Registro dos sintomas externos das plantas coletadas, para cada tratamento, após 60 dias da inoculação fúngica.



Fonte: elaborado pela autora

- a) T1B1: planta inoculada com a cepa bacteriana LPPC242; b) T1B2: planta inoculada com a cepa bacteriana LPPC259; c) T1B3: planta inoculada com a cepa bacteriana LPPC262; d) T1B4: planta inoculada com a cepa bacteriana LPPC283; e) T2: planta inoculada com o fungo RFB65; f) T3B1: planta inoculada com a cepa bacteriana LPPC242 e fungo RFB65; g) T3B2: planta inoculada com a cepa bacteriana LPPC259 e fungo RFB65; h) T3B3: planta inoculada com a cepa bacteriana LPPC262 e fungo RFB65; i) T3B4: planta inoculada com a cepa bacteriana LPPC283 e fungo RFB65; j) T4: planta inoculada com fungo RFB65 e fungicida tiabendazole; k) T5: planta controle, sem nenhuma inoculação.

Figura 4 – Registro dos sintomas internos das plantas coletadas, para cada tratamento, após 60 dias da inoculação fúngica.



Fonte: elaborado pela autora

a) T1B1: planta inoculada com a cepa bacteriana LPPC242; b) T1B2: planta inoculada com a cepa bacteriana LPPC259; c) T1B3: planta inoculada com a cepa bacteriana LPPC262; d) T1B4: planta inoculada com a cepa bacteriana LPPC283; e) T2: planta inoculada com o fungo RFB65; f) T3B1: planta inoculada com a cepa bacteriana LPPC242 e fungo RFB65; g) T3B2: planta inoculada com a cepa bacteriana LPPC259 e fungo RFB65; h) T3B3: planta inoculada com a cepa bacteriana LPPC262 e fungo RFB65; i) T3B4: planta inoculada com a cepa bacteriana LPPC283 e fungo RFB65; j) T4: planta inoculada com fungo RFB65 e fungicida tiabendazole; k) T5: planta controle, sem nenhuma inoculação.

4.2 Análise enzimática da quitinase (QUI)

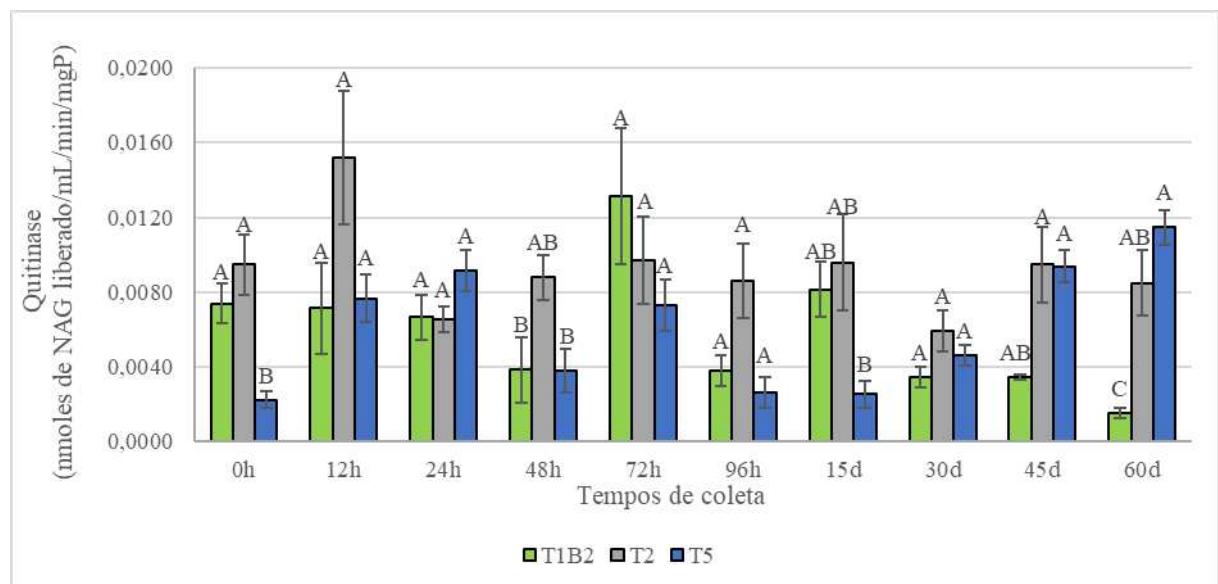
Para o tratamento T1B2 (figura 5), tem-se uma média atividade quitinásica que se mantém até as 24 horas do início do experimento (0,0074 nmoles de NAG liberado/mL/min/mgP), caindo gradualmente até as 48 horas (0,0038 nmoles de NAG liberado/mL/min/mgP). Tem-se um pico de indução de atividade com 72 horas de experimento (0,0131 nmoles de NAG liberado/mL/min/mgP), mas já decai com 96 horas (0,0038 nmoles de NAG liberado/mL/min/mgP). Em 15 dias, tem-se um segundo pico (0,0081 nmoles de NAG liberado/mL/min/mgP), mas a atividade decai novamente com 30 dias, se mantendo até os 45 dias (0,0035 nmoles de NAG liberado/mL/min/mgP). Aos 60 dias de experimento, tem outro decaimento no nível da atividade (0,0015 nmoles de NAG liberado/mL/min/mgP).

Também na figura 5, para o tratamento T2, que consiste apenas no inóculo fúngico na planta, tem-se um crescimento de atividade nos momentos iniciais, nas primeiras 12 horas (0,0095 a 0,0152 nmoles de NAG liberado/mL/min/mgP), que decai ao fechar as 24 horas de experimento (0,0065 nmoles de NAG liberado/mL/min/mgP). O nível de indução da enzima aumenta novamente com 48 horas, mantendo esse nível até os 15 dias após a inoculação do fungo (0,0096 nmoles de NAG liberado/mL/min/mgP). A atividade cai com 30 dias (0,0059 nmoles de NAG liberado/mL/min/mgP), voltando a aumentar aos 45 dias (0,0095 nmoles de NAG liberado/mL/min/mgP), mas reduz levemente ao final do experimento (0,0085 nmoles de NAG liberado/mL/min/mgP).

Já para o tratamento T5 (figura 5), tem-se baixo nível de atividade no momento inicial do experimento (0,0022 nmoles de NAG liberado/mL/min/mgP), que sobe gradualmente até 24 horas (0,0091 nmoles de NAG liberado/mL/min/mgP). Há um decaimento na indução da atividade com 48 horas (0,0038 nmoles de NAG liberado/mL/min/mgP), que aumenta com 72 horas (0,0073 nmoles de NAG liberado/mL/min/mgP), mas decai novamente nos momentos de

96 horas e 15 dias de experimento (0,0026 nmoles de NAG liberado/mL/min/mgP). Por fim, volta a aumentar gradualmente, em 30, 45 e 60 dias de experimento, atingindo o pico no final das coletas (0,0115 nmoles de NAG liberado/mL/min/mgP).

Figura 5- Quantificação da atividade de quitinase (nmoles de NAG liberado/mL/min/mgP) de cada tempo de coleta, para os tratamentos T1B2, T2 e T5.



Fonte: elaborado pela autora

T1B2: planta inoculada com a cepa bacteriana LPPC259; T2: planta inoculada com o fungo RFB65; T5: planta controle, sem nenhuma inoculação.

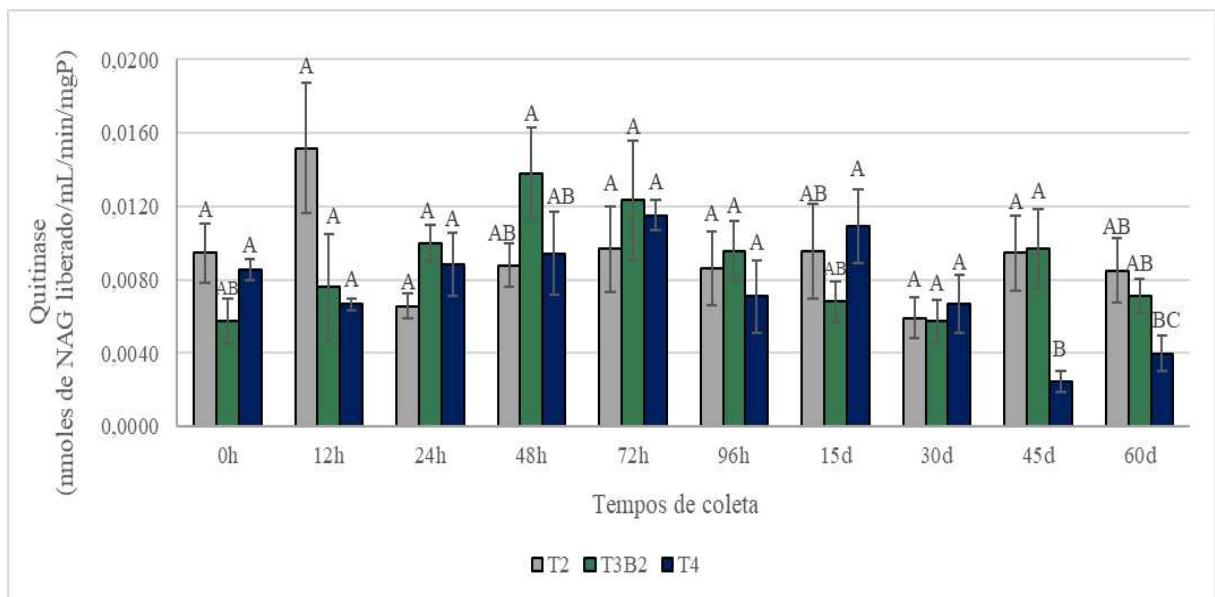
Os resultados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas utilizando teste de Tukey com $p \leq 0,05$. O erro padrão está indicado em cada barra.

No tratamento T3 (figura 6), tem-se uma crescente de indução de atividade, atingindo um pico com 48 horas após o inóculo fúngico (0,0058 – 0,0076 – 0,0100 - 0,0138 nmoles de NAG liberado/mL/min/mgP). Esse nível de atividade cai gradualmente até os 30 dias de experimento (0,0123 – 0,0095 – 0,0068 – 0,0057 nmoles de NAG liberado/mL/min/mgP), volta a subir com 45 dias (0,0097 nmoles de NAG liberado/mL/min/mgP), porém decai novamente ao final do experimento (0,0071 nmoles de NAG liberado/mL/min/mgP).

Para o tratamento T4 (figura 6), tem-se uma média para alta atividade no início do experimento (0,0085 nmoles de NAG liberado/mL/min/mgP), que decai levemente com 12 horas (0,0067 nmoles de NAG liberado/mL/min/mgP). Em seguida, o nível de atividade aumenta de forma gradual até 72 horas, onde atinge o pico (0,0115 nmoles de NAG

liberado/mL/min/mgP). A atividade volta a cair com 96 horas (0,0071 nmoles de NAG liberado/mL/min/mgP), mas retorna ao nível anterior aos 15 dias de experimento (0,0109 nmoles de NAG liberado/mL/min/mgP). O nível cai em 30 e 45 dias (0,0067 e 0,0025 nmoles de NAG liberado/mL/min/mgP, respectivamente), mas aumenta no final do experimento (0,0040 nmoles de NAG liberado/mL/min/mgP).

Figura 6 - Quantificação da atividade de quitinase (nmoles de NAG liberado/mL/min/mgP) de cada tempo de coleta, para os tratamentos T2, T3B2 e T4.



Fonte: elaborado pela autora

T2: planta inoculada com o fungo RFB65; T3B2: planta inoculada com a cepa bacteriana LPPC259 e fungo RFB65; T4: planta inoculada com fungo RFB65 e fungicida tiabendazole.

Os resultados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas utilizando teste de Tukey com $p \leq 0,05$. O erro padrão está indicado em cada barra.

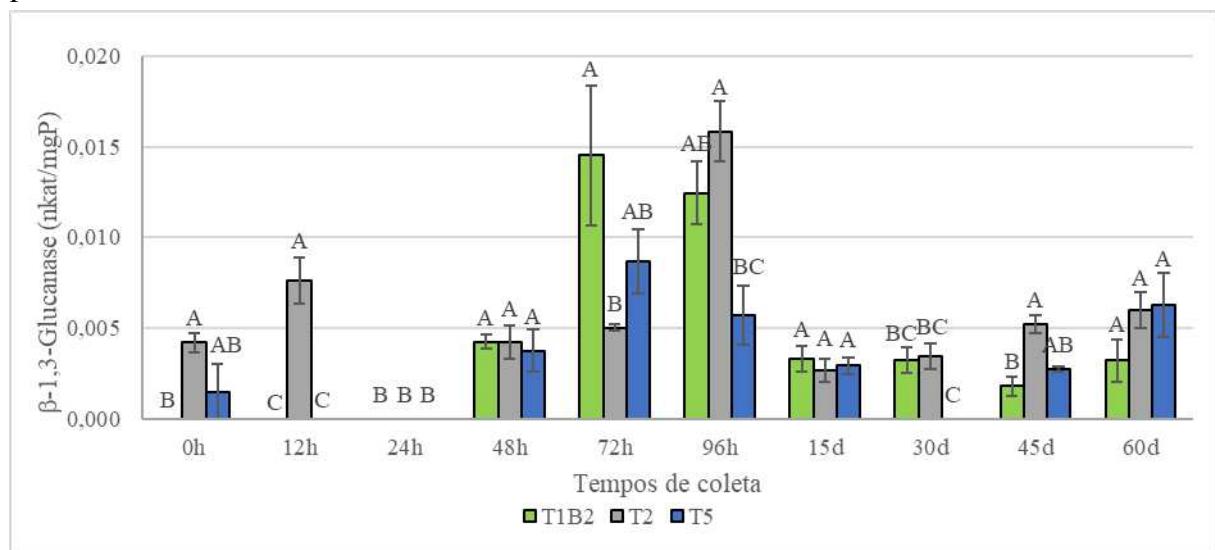
4.3 Análise enzimática da β -1,3-glucanase (GLU)

Para o tratamento T1B2 (figura 7), não há evidência de atividade entre 0 e 24 horas de experimento, só mostrando uma baixa indução de atividade com 48 horas (0,0042 nkat/mgP). Com 72 horas, a atividade atinge o pico (0,0145 nkat/mgP), decaindo levemente com 96 horas (0,0124 nkat/mgP). No período entre 15 e 60 dias de experimento, tem-se um baixo nível de atividade (0,0032 nkat/mgP).

Para o tratamento T2 (figura 7), tem-se uma crescente de atividade entre 0 e 12 horas ($0,0042 - 0,0076$ nkat/mgP), porém a atividade zera no período de 24 horas. Entre 48 e 96 horas, a atividade retorna e atinge seu pico ($0,0158$ nkat/mgP), mas já decai com 15 dias ($0,0027$ nkat/mgP). Entre 30 e 60 dias do experimento, tem-se um aumento gradual do nível de atividade ($0,0035 - 0,0052 - 0,0060$ nkat/mgP).

Para o tratamento T5 (figura 7), tem-se uma baixíssima atividade com momento inicial do experimento ($0,0015$ nkat/mgP), que é zerada com 12 horas, se mantendo sem atividade no momento de 24 horas. Com 48 e 72 horas de experimento, a atividade volta a ser induzida ($0,0038$ nkat/mgP), até atingir seu pico no momento de 72 horas ($0,0087$ nkat/mgP), porém decai novamente nas coletas de 96 horas e 15 dias ($0,0057$ e $0,0029$ nkat/mgP, respectivamente), até zerar na coleta de 30 dias. Nos períodos de 45 e 60 dias após o início do experimento, a atividade volta a aumentar ($0,0027$ e $0,0063$ nkat/mgP, respectivamente).

Figura 7 - Quantificação da atividade de β -1,3-glucanase (nkat/mgP) de cada tempo de coleta, para os tratamentos T1B2, T2 e T5.



Fonte: elaborado pela autora

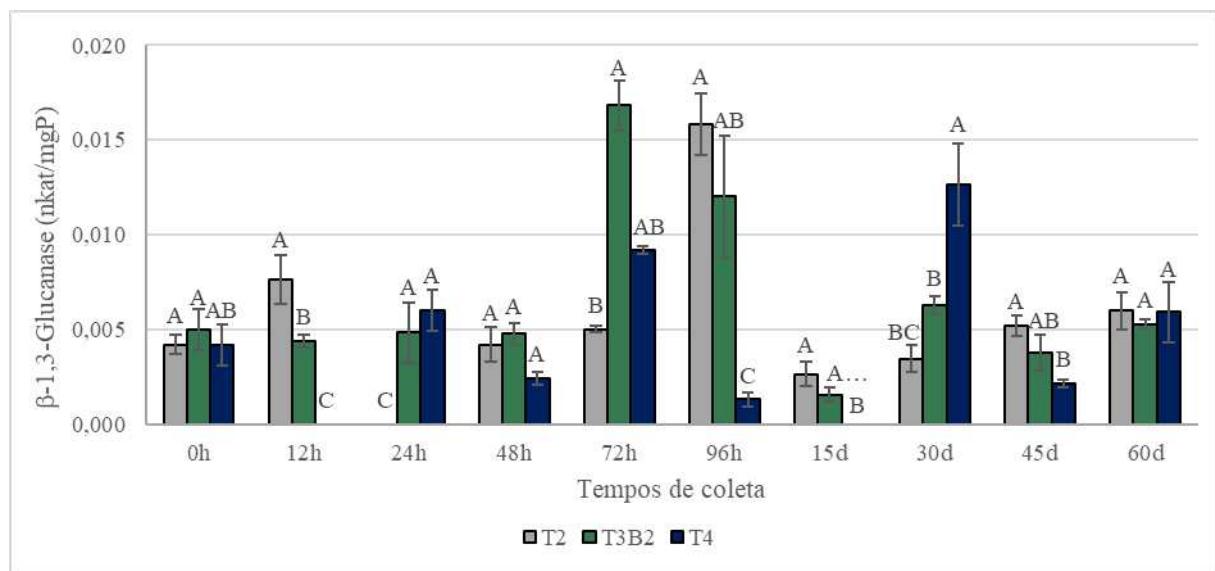
T1B2: planta inoculada com a cepa bacteriana LPPC259; T2: planta inoculada com o fungo RFB65; T5: planta controle, sem nenhuma inoculação.

Os resultados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas utilizando teste de Tukey com $p \leq 0,05$. O erro padrão está indicado em cada barra.

Para o tratamento T3B2 (figura 8), tem-se baixos e constantes níveis de atividade durante as primeiras 48 horas de experimento (0,0048 nkat/mgP). Porém, em 72 horas, tem-se um pico de indução de atividade (0,0168 nkat/mgP), que cai levemente com 96 horas (0,0120 nkat/mgP). Com 15 dias da inoculação fúngica, o nível de atividade se torna bem baixo (0,0016 nkat/mgP), mas torna a subir com 30 dias (0,0063 nkat/mgP). Com 45 dias, tem-se uma leve queda (0,0038 nkat/mgP), mas recupera o aumento no final do experimento (0,0053 nkat/mgP).

Para o tratamento T4 (figura 8), tem-se uma baixa atividade com momento inicial do experimento (0,0042 nkat/mgP), que é zerada com 12 horas. A atividade retoma a subir com 24 horas (0,0060 nkat/mgP), mas já decai com 48 horas (0,0024 nkat/mgP). Com 72 horas do inóculo fúngico, o nível de indução de atividade aumenta (0,0092 nkat/mgP), mas decai bastante no período de 96 horas (0,0013 nkat/mgP), zerando com 15 dias. Com 30 dias de experimento, a atividade atinge seu pico (0,0127 nkat/mgP), reduz bastante em 45 dias (0,0022 nkat/mgP), mas volta a aumentar com 60 dias (0,0059 nkat/mgP).

Figura 8 - Quantificação da atividade de β -1,3-glucanase (nkat/mgP) de cada tempo de coleta, para os tratamentos T2, T3B2 e T4.



Fonte: elaborado pela autora

T2: planta inoculada com o fungo RFB65; T3B2: planta inoculada com a cepa bacteriana LPPC259 e fungo RFB65; T4: planta inoculada com fungo RFB65 e fungicida tiabendazole.

Os resultados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas utilizando teste de Tukey com $p \leq 0,05$. O erro padrão está indicado em cada barra.

5 DISCUSSÃO

As bactérias do gênero *Bacillus* são amplamente estudadas na literatura, devido às suas propriedades benéficas em plantas, incluindo a melhoria na nutrição vegetal, a promoção de crescimento e a atuação antimicrobiana contra fitopatógenos (Fan *et al.*, 2017; Saxena *et al.*, 2020). Sobre esse grupo de microrganismos, já se tem relatos de inibição do crescimento de fitopatógenos, por meio de diversos mecanismos, como produção de enzimas líticas e indução de resistência (Aloo *et al.*, 2019), como foi observado no presente trabalho. Nesse estudo, o potencial antifúngico de isolados de *Bacillus*, oriundos da rizosfera de bananeiras, foi avaliado, em experimento em condições *in vivo*. As mudas infectadas com o fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* isolado RFB65 demonstraram sintomas, tanto internos, quanto externos. Sobre sintomas internos, pode ser citado a clorose das folhas, causada pela produção de ácido fusárico, uma fitotoxina, pelo *F. oxysporum* f. sp. *cubense* (Dong *et al.*, 2014). Já os sintomas externos são causados pela infecção do fungo no xilema e rizoma da planta, deixando-as com necroses escuras (Ploetz, 2015). Em contrapartida, as mudas infectadas com o fungo, mas inoculadas com as cepas bacterianas, principalmente a LPPC259 e LPPC283, demonstraram poucos sintomas, comprovando a antibiose das bactérias do gênero *Bacillus*, propriedade já relatada na literatura, em bananas prata-anã (Da Silva Vieira *et al.*, 2020) e em bananas nanicas (Yadav *et al.*, 2021), sendo significativamente mais eficientes do que a forma de controle já utilizada comumente, o fungicida.

A inibição do crescimento do fungo causada pelas bactérias é explicada pela indução da atividade das enzimas hidrolíticas, como as quitinases e as β -1,3-glucanases, que degradam a maioria das paredes celulares fúngicas (Jain *et al.*, 2017). O presente estudo obteve resultados satisfatórios de indução de atividade quitinásica, especialmente no tratamento T3B2, que demonstrou uma indução de atividade progressiva e constante, em comparação ao restante dos tratamentos. O tratamento T2 teve um pico de atividade brusco, que não se manteve elevado no restante dos tempos de coleta analisado, demonstrando uma tentativa mal-sucedida das mudas de conter o avanço do fungo, que já foi relatado em mudas infectadas com *Fusarium oxysporum* em melões (Sadeghpour *et al.*, 2022). Já o tratamento T4, com fungicida, também demonstra um aumento gradual de atividade, mas alcança o pico de indução 24 horas mais tarde que o tratamento de controle biológico, além da atividade ser numericamente inferior. Quando comparados ao tratamento controle (T5), todos os tratamentos com inoculação fúngica tiveram maior quantificação de atividade quitinásica, demonstrando uma ativação maior dessa enzima

na presença do fungo. Esse aumento de atividade quitinásica já foi relatado no tratamento do mal do Panamá, controlado biologicamente por cepas de *Bacillus* sp., em bananeiras (Yadav *et al.*, 2021).

Sobre a atividade glucanásica, pode-se inferir que ela também é induzida com o inóculo fúngico, uma vez que, comparado com o tratamento controle (T5), os tratamentos infectados com o fungo tiveram maior indução de atividade da enzima β -1,3-glucanase, também evidenciado no estudo em melões infectados com *Fusarium oxysporum* (Sadeghpour *et al.*, 2022). Ademais, o tratamento T4, que consiste no fungicida como forma de controle, obteve análises flutuantes, o que demonstra a falha de manter a atividade induzida em todos os momentos do experimento. Já o tratamento de controle biológico com a cepa de *Bacillus* (T3B2), conseguiu manter uma atividade constante em todos os pontos analisados, tendo um pico de atividade numericamente maior do que os tratamentos T2 e T4, além de atingir esse ponto máximo 24 horas antes do que o tratamento apenas com o inóculo fúngico. Essa maior indução da atividade de β -1,3-glucanase também é relatada no experimento sobre mal do Panamá, em bananeiras (Yadav *et al.*, 2021).

Entretanto, nas coletas de 15, 30, 45 e 60 dias não se tem uma grande indução de atividade quitinásica e β -1,3-glucanásica para o tratamento T3B2, e, tendo em vista que as inoculações bacterianas foram feitas 7 dias antes das coletas mencionadas, pode-se inferir que o pico de atividade contra o patógeno pode ocorrer nos primeiros 3 a 4 dias após a inoculação da biomassa bacteriana. Por isso, no período de coleta, a atividade dessas enzimas já estaria no declínio.

6 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou a eficiência das cepas de *Bacillus* sp. no controle biológico do mal do Panamá, obtendo resultados que comprovam uma redução significativa na severidade da doença, sendo mais eficiente que a forma de controle já utilizada comercialmente, o fungicida tiabendazole, além de ser uma abordagem mais sustentável.

Dentre as cepas avaliadas, LPPC259 e LPPC283 apresentaram os melhores resultados de manejo da doença, reduzindo os sintomas da infecção por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. Ademais, a indução da atividade enzimática da β -1,3-glucanase e quitinase nas plantas tratadas com *Bacillus* sp. reforça o potencial desses microrganismos na ativação desses mecanismos de defesa vegetal.

REFERÊNCIAS

AGROFIT - Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. [S. l.], 23 jan. 2025. Disponível em: https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em: 23 jan. 2025.

ALOO, B. N.; MAKUMBA, B. A.; MBEGA, E. R. The potential of *Bacilli* rhizobacteria for sustainable crop production and environmental sustainability. **Microbiological Research**, v. 219, p. 26-39, 2019.

BOLLER, T. Biochemical analysis of chitinase and β -1,3-glucanases In: Curr, S.J., McPherson, M.J. and Bowles, D.J. (Eds.) **Molecular Plant Pathology**: A Practical Approach, Oxford University Press, New York, p. 23–29, 1992.

BOULAHOUAT, S. *et al.* Biocontrol efficiency of rhizospheric *Bacillus* against the plant pathogen *Fusarium oxysporum*: a promising approach for sustainable agriculture. **Microbiology Research**, v. 14, n. 3, p. 892-908, 2023.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BUBICI, G. *et al.* Biological control agents against *Fusarium* wilt of banana. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 616, 2019.

CARMONA-HERNANDEZ, S. *et al.* Biocontrol of postharvest fruit fungal diseases by bacterial antagonists: A review. **Agronomy**, v. 9, n. 3, p. 121, 2019.

COMETTI, Nilton Nélio *et al.* IV-Soluções nutritivas: formulação e aplicações. **Nutrição mineral de plantas**, p. 90-112, 2006.

DA MATA, Djair Alves *et al.* Agronomic perspective: exploring the diversity and potentialities of banana cultivation (*Musa* spp.). **Scientific Electronic Archives**, v. 17, n. 4, 2024.

DA SILVA VIEIRA, L. C. *et al.* *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* biocontrol mediated by *Bacillus* spp. in Prata-Anã banana. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 15, n. 3, p. 1-7, 2020.

DITA, M. *et al.* *Fusarium* wilt of banana: current knowledge on epidemiology and research needs toward sustainable disease management. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 1468, 2018.

DONG, X. *et al.* Fusaric acid accelerates the senescence of leaf in banana when infected by *Fusarium*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, p. 1399-1408, 2014.

EMBRAPA. **Banana**. Disponível em: <https://www.embrapa.br/mandioca-e-fruticultura/cultivos/banana>. Acesso em: 4 mar. 2025.

FAN, B. *et al.* *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus velezensis*, and *Bacillus siamensis* form an “operational group *B. amyloliquefaciens*” within the *B. subtilis* species complex. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 22, 2017.

FERREIRA, C. F. *et al.* (Ed.). **O agronegócio da banana**. Brasília: Embrapa, 2016.

FORTUNATO, A. A. *et al.* Silicon suppresses *Fusarium* wilt development in banana plants. **Journal of Phytopathology**, v. 160, n. 11-12, p. 674-679, 2012.

IBGE. Produção de Banana: Brasil., 2023. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/banana/br>. Acesso em: 23 jan. 2025.

JAIN, S. *et al.* Chitinolytic *Bacillus*-mediated induction of jasmonic acid and defense-related proteins in soybean (*Glycine max* L. Merrill) plant against *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum*. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 36, p. 200-214, 2017.

LESLIE, John F.; SUMMERELL, Brett A. **The Fusarium laboratory manual**. John Wiley & Sons, 2008.

MCKINNEY, H. H. Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. **Journal of Agricultural Research**, v. 16, n. 5, p. 195-217, 1923.

NARAYANASAMY, P. **Biological management of diseases of crops**. Springer, 2013.

PLOETZ, R. C. *Fusarium* wilt of banana is caused by several pathogens referred to as *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. **Phytopathology**, v. 96, n. 6, p. 653-656, 2006.

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

ROSSO, Beatriz Deprá *et al.* Desenvolvimento local: a cadeia produtiva da banana em São João do Polêsine/RS. 2013.

SAXENA, A. Kumar *et al.* *Bacillus* species in soil as a natural resource for plant health and nutrition. **Journal of Applied Microbiology**, v. 128, n. 6, p. 1583-1594, 2020.

SADEGHPOUR, N. *et al.* Antioxidant enzymes associated with resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* race 1.2 in melon. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 121, p. 101880, 2022.

VIDAL, M. D. F. Produção comercial de frutas na área de atuação do BNB: v. 6 n. 168 (2021). **Caderno Setorial ETENE**, Fortaleza, v. 6, 2024. Disponível em: <https://www.bnb.gov.br/revista/cse/article/view/2791>. Acesso em: 23 jan. 2025.

XUE, C. *et al.* Manipulating the banana rhizosphere microbiome for biological control of Panama disease. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 11124, 2015.

YADAV, Kavita *et al.* Effective biocontrol of banana fusarium wilt tropical race 4 by a bacillus rhizobacteria strain with antagonistic secondary metabolites. **Rhizosphere**, v. 18, p. 100341, 2021.