



Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal no Semiárido

**SELEÇÃO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DE BANANEIRA
PARA O BIOCONTROLE DA MURCHA DE FUSARIUM**

MARIA JOSIANE MARTINS

2019

MARIA JOSIANE MARTINS

**SELEÇÃO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DE BANANEIRA PARA O
BIOCONTROLE DA MURCHA DE FUSARIUM**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Montes Claros como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal no Semiárido, área de concentração em Produção Vegetal, para obtenção do título de Mestre.

Orientadora
Professora Adélica Aparecida Xavier

Janaúba
2019

Ficha Catalográfica

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

Martins, Maria Josiane

M379s Seleção de bactérias endofíticas de bananeira para o biocontrole da murcha de fusarium [manuscrito] / Maria Josiane Martins. – 2019.

56 p.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal no Semiárido, Universidade Estadual de Montes Claros – Janaúba, 2019.

Orientadora: Prof^a. D. Sc. Adelica Aparecida Xavier.

1. Bactérias endofíticas. 2. Bananeira. 3. Murcha de fusarium da banana. I. Xavier, Adelica Aparecida. II. Universidade Estadual de Montes Claros. III. Título.

CDD. 634.772

Folha de aprovação

MARIA JOSIANE MARTINS

**SELEÇÃO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DE BANANEIRA PARA O
BIOCONTROLE DA MURCHA DE FUSARIUM**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Montes Claros como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal no Semiárido, área de concentração em Produção Vegetal, para obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 22 de fevereiro de 2019.

**Professora Adélica Aparecida Xavier
(Unimontes) Orientadora**

**Professora Regina Cássia Ferreira
Ribeiro
(Unimontes) Coorientadora**

**Edson Hydu Mizobutsi
(Unimontes) Conselheiro**

**Silvia Nietzsche
(UFMG) Conselheira**

**Mario Sérgio Carvalho Dias
(EPAMIG) Conselheiro**

**Janaúba
2019**

Ao meu Deus pela sua infinita bondade!

*Às professoras Adelica e Regina pelos ensinamentos e compreensão nos momentos de
dificuldade!*

Aos meus pais Ana e Irineu que sempre oraram pela minha vitória!

Aos meus irmãos que sempre dispuseram a auxiliar no que fosse preciso!

A felicidade aparece para aqueles que choram.

Para aqueles que se machucam.

Para aqueles que buscam e tentam sempre.

E para aqueles que reconhecem a importância das pessoas que passam por suas vidas.

Clarice Lispector

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Montes Claros por me ofertar a possibilidade de cursar a graduação em Engenharia Agrônômica e o mestrado em Produção Vegetal no Semiárido;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de pós-graduação;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro;

À professora Adélica Aparecida Xavier por todo carinho, paciência, amizade, dedicação, ensinamentos e pela disponibilidade em me orientar;

À professora Regina Cássia Ferreira Ribeiro pelo apoio, paciência e ensinamentos;

A todos os professores do programa de pós-graduação em Produção Vegetal no Semiárido pelos ensinamentos passados. Em especial as professoras Michele Xavier Vieira Megda e Eleuza Clarete Junqueira de Sales e ao professor Marcos Koit Kondo por disponibilizar equipamentos para o desenvolvimento dos trabalhos;

Aos professores Samy Pimenta e professora Camila Maida de Albuquerque Maranhão pelo auxílio com a estatística e os programas estatísticos;

Aos colegas de laboratório de fitopatologia, Tânia, Thais, Polyana, Débora, Isabela, Viviane, Lorena, Renato, Mairon e Igor pelo apoio;

Aos amigos do laboratório, Bruna Isabelle, Daniela, Moises, Lucas e Elisete por toda ajuda, empenho e amizade;

Às minhas grandes amigas, Débora, Zenóbia, Josiane e Sinara por todo apoio.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	9
GENERAL ABSTRACT	10
INTRODUÇÃO	11
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	12
ARTIGO 1: AÇÃO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DE BANANEIRA SOBRE <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ubense</i> IN VITRO	16
RESUMO	17
ABSTRACT	17
INTRODUÇÃO	18
MATERIAL E MÉTODOS	19
RESULTADOS	22
DISCUSSÃO	27
CONCLUSÕES	28
AGRADECIMENTOS	28
REFERÊNCIAS	29
ARTIGO 2: AÇÃO DE BACTERIAS ENDOFÍTICAS SOBRE A MURCHA DE <i>Fusarium</i> E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE BANANEIRA	31
RESUMO	32
ABSTRACT	32
INTRODUÇÃO	33
MATERIAL E MÉTODOS	34
RESULTADOS	37
DISCUSSÃO	43
CONCLUSÕES	45
AGRADECIMENTOS	46
REFERÊNCIAS	46

RESUMO GERAL

Seleção de bactérias endofíticas de bananeira para o biocontrole da murcha de fusarium

A murcha de fusarium causada pelo fitopatógeno habitante de solo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (*foc*) é uma das principais doenças que afetam a cultura da bananeira. Em bananais oriundos de materiais suscetíveis as medidas de controle disponíveis são ineficientes. A adoção de novas tecnologias na agricultura é essencial e, nesse contexto, o controle biológico de doenças é uma excelente alternativa. Diante disso, dois ensaios foram estabelecidos com o objetivo de avaliar *in vitro* (1) e em casa de vegetação (2) a ação de 40 isolados endofíticos sobre *foc* e no crescimento de mudas de bananeira “Prata Catarina”. Os experimentos foram estabelecidos em delineamento inteiramente casualizado com 41 tratamentos e três repetições e 42 tratamentos e cinco repetições para o primeiro e segundo ensaios, respectivamente. No ensaio *in vitro* (1) quarenta isolados endofíticos dos gêneros *Bacillus*, *Klebsiella*, *Paenibacillus*, *Stenotrophomonas*, *Lysinibacillus*, *Sporolactobacillus*, foram desafiados com *foc*. Os experimentos foram em sistema de pareamento ou na presença de compostos voláteis. Os isolados endofíticos reduziram significativamente o crescimento micelial de *foc* em ambos os testes, porém menos pronunciado na presença de voláteis. As reduções máximas de área da colônia no pareamento chegaram a 76,40% e 54,62% na presença de voláteis, respectivamente. Aproximadamente, 87,5% os isolados bacterianos afetaram negativamente a esporulação. A análise de componentes principais indicou que a variável germinação de esporos na presença de células bacterianas melhor explica a variação dos dados. O segundo ensaio, em casa de vegetação, o experimento foi montado em blocos casualizados com de 42 tratamentos (40 isolados endofíticos e duas testemunhas (*foc* e controle) e cinco repetições. Foram avaliadas a incidência e severidade de *foc* bem como a promoção de crescimento das plantas. Todos os isolados endofíticos utilizados reduziram a severidade da murcha de fusarium, esses valores chegaram a 91,33%. Independente da presença ou ausência de *foc*, os isolados endofíticos foram capazes de promover incremento para todas as características morfológicas avaliadas. Os valores de incremento de massa seca de raiz chegaram a 1015% para o isolado EB37.

Palavras-chave: Sustentabilidade, *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense*, *Musa* sp.

GENERAL ABSTRACT

Selection of banana endophytic bacteria for the biocontrol of fusarium wilt

The fusarium wilt caused by soil-dwelling phytopathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (*foc*) is one of the main diseases affecting banana crop. In banana plants from susceptible materials the available control measures are inefficient. The adoption of new technologies in agriculture is essential, and in this context, biological disease control is an excellent alternative. Thus, two trials were established with the objective of evaluating in vitro (1) and in a greenhouse (2) the action of 40 endophytic isolates on *foc* and plant growth of “Prata Catarina” banana. The experiments were established in a completely randomized design with 41 treatments and three replications and 42 treatments and five replications for the first and second trials, respectively. In the in vitro assay (1) forty endophytic isolates of the genera *Bacillus*, *Klebsiella*, *Paenibacillus*, *Stenotrophomonas*, *Lysinibacillus*, *Sporolactobacillus* were challenged with *foc*. The experiments were in pairing system or in the presence of volatile compounds. Endophytic isolates significantly reduced *foc* mycelial growth in both tests, but less pronounced in the presence of volatiles. The maximum reductions in colony area in the pairing reached 76.40% and 54.62% in the presence of volatiles, respectively. Approximately 87.5% of bacterial isolates negatively affected sporulation. The principal component analysis indicated that the spore germination variable in the presence of bacterial cells better explains the data variation. The second experiment, in a greenhouse, was a randomized block design with 42 treatments (40 endophytic isolates and two controls (*foc* and control) and 5 replications. The incidence and severity of *foc* as well as the promotion of plant growth were evaluated. All endophytic isolates used reduced the severity of fusarium wilt, these values reached 91.33%. Regardless of the presence or absence of *foc*, endophytic isolates were able to promote increment for all morphological characteristics evaluated. Root dry matter increment values reached 1015% for the EB37 isolate.

Keywords: Sustainability, *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense*, *Musa* sp.

INTRODUÇÃO GERAL

A murcha de fusarium é uma doença causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (*foc*) (E.F. Smith) Snyder & Hansen, e amplamente difundida pelo mundo. É conhecida historicamente como uma das doenças mais destrutivas de plantas (DITA et al., 2018). O patógeno é um fungo que habita o solo e, possui ampla variabilidade com registro no mundo das raças 1, 2 e 4 que infectam a bananeira. Destas, a raça 4 é a mais agressiva e ocorre em variedades do grupo Gross Michel (AAA), Maçã (AAB), Prata (AAB), Pisang (ABB), Bluggoe (ABB) e Cavendish (AAA), (RODRIGUEZ et al., 2018) e, é considerada praga quarentenária A1 para o Brasil (BRASIL, 2018, p.9). A raça 1 ocorre de forma endêmica no Brasil e, constitui-se num problema sério principalmente em regiões onde se planta as variedades do subgrupo Prata e Maçã.

Os esporos do patógeno uma vez presentes no solo germinam e respondem ao estímulo de exsudados radiculares, as hifas aderem e penetram diretamente a epiderme de raízes mais finas na região de ramificação das raízes. A colonização ocorre intercelularmente através do córtex até atingir os vasos do xilema, produzindo ali conídios e toxinas que se movem através da seiva da planta, fazendo com que novos vasos sejam colonizados e, novas estruturas fúngicas sejam produzidas (PÉREZ-VICENTE et al., 2014). Internamente verifica-se descoloração dos vasos condutores, externamente nota-se o amarelecimento das margens das folhas mais antigas, rachaduras na base do pseudocaule e murcha (PLOETZ, 2015). À medida que as plantas doentes morrem, o fungo coloniza os tecidos externos do xilema (VILJOEN et al., 2017) e, na ausência de tecidos hospedeiros vivos, o fungo é capaz de sobreviver na forma de clamidósporos, permanecendo nos solos por longos períodos na forma latente (PÉREZ-VICENTE et al., 2014).

Após a manifestação dos sintomas externos da doença, que ocorre frequentemente na fase de florescimento da bananeira, o fungo já se estabeleceu na planta (LE et al., 2017) causando danos muitas vezes irreversíveis em cultivares muito suscetíveis. Assim, a medida mais eficiente é o cultivo de variedades resistentes, entretanto, há poucas variedades disponíveis no mercado com boa aceitação pelo consumidor. As variedades de banana do grupo Prata são suscetíveis a raça 1 e, 70% dos 20 mil hectares plantados no Norte de Minas são cultivados com variedade deste grupo (SEAPA, 2020) o que torna a murcha de fusarium uma doença muito importante para a bananicultura regional. Em locais onde o patógeno ocorre diferentes medidas de convivência com a doença devem ser utilizadas para que se possa reduzir os prejuízos causados pela mesma. Existem apenas dois produtos não biológicos

registrados no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2019) para controle deste patógeno, porém, há pouca efetividade de sua aplicação em estágios avançados da doença (SYED et al., 2015).

A utilização de produtos de origem biológica tem sido utilizada como uma alternativa para reduzir o efeito desse patógeno e, atualmente, existem no mercado dois produtos registrados no MAPA para o controle de *Fusarium oxysporum*, todos a base de *Trichoderma* spp. (MAPA, 2019). Por outro lado, pesquisas com bactérias também têm mostrado potencial para controle deste fungo (ERLACHER et al., 2014; BUBICI et al., 2019; KAVINO e MANORANJITHAM, 2018; SHEN et al., 2019) e os gêneros mais estudados para o controle biológico são *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Burkholderia* (CIANCIO et al., 2016).

Estudos de bioprospecção de bactérias endofíticas de bananeira, principalmente do gênero *Bacillus* sp., têm sido desenvolvido pelo grupo de pesquisa da Universidade Estadual de Montes Claros há vários anos e, alguns isolados foram selecionados com capacidade de produção de hormônios (GOMES et al., 2017), solubilização de fósforo (MATOS et al., 2017), fixação biológica de nitrogênio (PEREIRA et al., 2018), promoção de crescimento de mudas (SOUZA et al., 2017) e redução de população de *Meloidogyne* sp. (SOUZA, 2017). A literatura relata a capacidade de *Bacillus* sp. para produção de toxinas, antibióticos, metabólitos secundários como, iturinas que agem na inibição da germinação de fitopatógenos (CHEN et al., 2018) surfactina que atuam na formação de biofilmes e impedem o reconhecimento do hospedeiro pelo fitopatógeno (CARRER-FILHO et al., 2015).

Além disto, há inúmeros registros de indução de resistência a estresse biótico e abiótico em diversas plantas (HARDOIM et al., 2015; LIU et al., 2019; ANJUM et al., 2019). Alguns gêneros de bactérias endofíticas são produtoras de compostos voláteis, que são compostos líquidos a base de carbono que entram na fase gasosa vaporizando a 0,01kPa a uma temperatura de aproximadamente 20°C (ROY e BANERJEE, 2019). A maioria é lipossolúvel e, portanto, tem alta solubilidade em membranas fúngicas (KADDES et al., 2019). Estes compostos são derivados primários e secundários do metabolismo microbiano e são capazes de difundir tanto na atmosfera quanto no solo, por isso são considerados ideais infoquímicos (GARNICA-VERGARA et al., 2016; KADDES et al., 2016). Diversos autores já relataram propriedades fungicidas e fungistáticas dos compostos voláteis produzidos por espécies de *Bacillus* (SOLANKI et al., 2015; TORRES et al., 2016).

Uma compreensão dos mecanismos de ação destas bactérias endofíticas é essencial para seleção de microrganismos multicompetentes e de efeitos maiores para as plantas e para alcançar avanços biotecnológicos e utilização em campo. A exploração da relação entre

endofíticos x planta x patógeno pode resultar na promoção da fitossanidade e concomitantemente na promoção de crescimento, e pode contribuir de forma significativa sustentável para a agricultura (SUMAN et al., 2016). Fundamentando-se nos relatos este trabalho testará a hipótese de que os isolados selecionados com características metabólicas de interesse para promoção de crescimento também sejam eficientes para o controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANJUM, R.; AFZA, M.; BABER, R.; ATHER, M.; KHAN, J.; KANWAL, W.; SAJIDI, W.; RAHEEL, A. Endophytes: As potential biocontrol agent: Review and future prospects. **Journal of Agricultural Science**, v. 11, n.4, p. 113-125, 2019.

BRASIL. INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 43, DE 13 DE AGOSTO DE 2018. **Fica estabelecido o Plano Nacional de Contingência para a praga *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense raça 4 tropical - Foc R4T**, Brasília, DF, agosto de 2018. Disponível em: <<http://www.in.gov.br/web/dou/-/instrucao-normativa-n-43-de-13-de-agosto-de-2018-37784761>>. Acesso em: 24 de fevereiro 2020.

BUBICI, G.; KAUSHAL, M.; PRIGIGALLO, M. I.; CABANAS, C. G. L.; BLANCO, J. M. Biological control agents against *Fusarium* wilt of banana. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n.12, p. 616-649, 2019.

CARRER-FILHO, R.; DIANESE, E. C.; CUNHA, M. G. Supressão da murcha de fusário em tomateiro por rizobactérias do gênero *Bacillus*. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 45, n.3, p. 356-363, 2015.

CHEN, Y.; WANG, J.; YANG, N.; WEN, Z.; SUN, X.; CHAI, Y.; MA, Z. Wheat microbiome bacteria can reduce virulence of a plant pathogenic fungus by altering histone. **Nature Communications**, v.9, n.24, p.3429-3443, 2018.

CIANCIO, A.; PIETERSE, C. M.; BLANCO, J. M. Editorial: Harnessing use full rhizosphere microorganisms for pathogen and pest biocontrol. **Frontiers in Microbiology**, v.7, n.19, p.1620-1625, 2016.

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.21, p.1468-1489, 2018.

ERLACHER, A.; CARDINALE, M.; GROSCH, R.; GRUBE, M.; BERG, G. The impact of the pathogen *Rhizoctonia solani* and its beneficial counterpart *Bacillus amyloliquefaciens* on the indigenous lettuce microbiome. **Frontiers Microbiology**, v.5, n.175, p.1-8, 2014.

GARNICA-VERGARA, A.; BARRERA-ORTIZ, S.; MUÑOZ-PARRA, E.; RAYA-GONZÁLEZ, J.; MÉNDEZ-BRAVO, A.; MACÍAS-RODRÍGUEZ, L.; RUIZ-HERRERA, L.F.; LÓPEZ-BUCIO, J. The volatile 6-pentyl-2h-pyran-2-one from *Trichoderma atroviride*

regulates *Arabidopsis thaliana* root morphogenesis via auxin signaling and ethylene insensitive 2 functioning. **New Phytologist**, v.209, n.4, p.1496–1512, 2016.

GOMES, I. P.; MATOS, A. D. M.; NIETSCHKE, S.; XAVIER, A. A.; COSTA, M. R.; GOMES, W. S.; PEREIRA, M. C. T. Auxin production by endophytic bacteria isolated from banana trees. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.60, n.10, p.1-12, 2017.

HARDOIM, P. R.; OVERBEEK, L. S. V.; BERG, G.; COMPANT, A. M. P. S.; CAMPISANO, A.; DORING, M.; SESSITSCHKE, A. The hidden world within plants: Ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.79, n.3, p.293-320, 2015.

KADDES, A.; FAUCONNIER, M. L.; SASSI, K.; NASRAOUI, B.; JIJAKLI, M. H. Endophytic fungal volatile compounds as solution for sustainable agriculture. **Molecules**, v.24, n.3, p.1065-1081, 2019.

KADDES, A.; PARISI, O.; BERHAL, C.; BEN KAAB, S.; FAUCONNIER, M.L.; NASRAOUI, B.; JIJAKLI, M.H.; MASSART, S.; DE CLERCK, C. Evaluation of the effect of two volatile organic compounds on barley pathogens. **Molecules**, v.21, n.26, p.1124-1134, 2016.

KAVINO, M.; MANORANJITHAM, S. K. In vitro bacterization of banana (*Musa* spp.) with native endophytic and rhizospheric bacterial isolates novel ways to combat *Fusarium* wilt. **European Journal of Plant Pathology**, v. 151, n. 16, p. 371-387, 2018.

LE, D. T.; VU, N. T. Progress of loop mediated isothermal amplification technique in molecular diagnosis of plant diseases. **Applied Biological Chemistry**, v. 60, n.2, p.169-180, 2017.

LIU, Y.; ZHU, A.; TAN, H.; CAO, L.; ZHANG, R. Engineering banana endosphere microbiome to improve *Fusarium* wilt resistance in banana. **Microbiome**, v.7, n. 74, p.2-15, 2019.

MATOS, A.D.M.; GOMES, I. P.; NIETSCHKE, S.; XAVIER, A.A.; GOMES, W. S.; SANTOS NETO, J. A.; PEREIRA, M. C. T. Phosphate solubilization by endophytic bacteria isolated from banana trees. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.89, n.4, p. 2945-2954, 2017.

MINISTERIO D AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). Disponível em < http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_ > Acesso em: 31 de janeiro de 2019.

PEREIRA, D. F. G. S.; NIETSCHKE, S.; XAVIER, A. A.; SOUZA, S. A.; COSTA, M. R.; DUARTE, A. B. Characterization and activity of endophytic bacteria from ‘Prata Anã’ banana crop (*Musa* sp., AAB). **Revista Ceres**, v. 65, n.5, p. 381-387, 2018.

PÉREZ-VICENTE, L.; DITA, M. A.; MARTINEZ-DE-LA-PARTE, E. **Prevention and diagnostic of Fusarium Wilt (Panama disease) of banana caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense Tropical Race 4 (TR4)**. Food and Agriculture Organization of the United Nations-FAO, 2014. 66p.

PLOETZ, R. C. Management of Fusarium wilt of banana: A review with special reference to tropical race 4. **Crop Protection**, v.73, n.30, p.7-15, 2015.

RODRIGUEZ, M. A. D.; HADDAD, F.; PARIZZI, P.; RASKI, R. K. **Alerta quarentenário: Fusarium oxysporum f. sp. cubense raça 4 tropical (R4T)**. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento-MAPA, 2018. 12p.

ROY, S.; BANERJEE, D. Volatile organic compounds from endophytic fungi. In: YADAV, A.; SINGH, S.; MISHRA, S.; GUPTA, A. **Recent advancement in white biotechnology through fungi**. 2Ed. Cham: Springer, 2019.528p.

SECRETARIA DE ESTADO DE AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO DE MINAS GERAIS (SEAPA). Disponível em: <[http://www.reformaagraria.mg.gov.br/images/documentos/perfil_banana_jan_2020\[1\].pdf](http://www.reformaagraria.mg.gov.br/images/documentos/perfil_banana_jan_2020[1].pdf)>. Acesso em: 26 de Fevereiro de 2020.

SHEN, Z.; XUE, C.; PENTON, C. R.; THOMASHOW, L. S.; ZHANG, N.; WANG, B.; RUAN, Y.; LI, R.; SHEN, Q. Suppression of banana Panama disease induced by soil microbiome reconstruction through an integrated agricultural strategy. **Soil Biology and Biochemistry**, v.128, n. 19, p.164-174, 2019.

SOLANKI, M.K.; SINGH, R.K.; SRIVASTAVA, S.; KUMAR, S.; KASHYAP, P.L.; SRIVASTAVA, A.K. Characterization of antagonistic-potential of two *Bacillus* 73 strains and their biocontrol activity against *Rhizoctonia solani* in tomato. **Journal of Basic Microbiology**, v. 55, n.1, p. 82-90, 2015.

SOUZA, G. L. O.D.; SILVA, D. F.; NIETSCHKE, S.; XAVIER, A.A.; PEREIRA, M. C.T. Endophytic bacteria used as bioinoculants in micropropagated banana seedlings. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 39, n.2, p.1-10, 2017.

SOUZA, G. L. D. **Seleção de bactérias endofíticas no controle de Meloidogyne javanica em mudas de bananeira Prata-Anã**. 2017. 69p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal no Semiárido) – Universidade Estadual de Montes Claros, Janaúba, 2017.

SUMAN, A.; YADAV, A.N.; VERMA, P. Endophytic microbes in crops: Diversity and beneficial impact for sustainable agriculture. In: SINGH, D.; SINGH, H.; PRABHA, R. (eds) **Microbial inoculants in sustainable agricultural productivity**. 2Ed. New Delhi: Springer, 2016. 308p.

SYED, R.N.; LODHI, A. M.; JISKANI, M.M.; RAJPUT, K. I.; KHASKHELI, M. A.; KHANZADA, M. A.; RAJPUT, N. A.; MAITLO, A. A.; RAJPUT, A. Q. First report of panama wilt disease of banana caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* in Pakistan. **Journal of Plant Pathology**, v.97, n.1, p. 209-220, 2015.

TORRES, M.J.; BRANDAN, C.P.; PETROSELLI, G.; ERRA-BALSELLS, R.; AUDISIO, M.C. Antagonistic effects of *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* and *B. amyloliquefaciens* against *Macrophomina phaseolina*: SEM study of fungal changes and UV-MALDI-TOF MS analysis of their bioactive compounds. **Microbiological Research**, v. 182, n.4, p. 31-39, 2016.

VILJOEN, A.; MAHUKU, G.; MASSAWE, C.; SSALI, R.T.; KIMUNYE, J.; MOSTERT, G.; NDAYIHANZAMASO, P.; COYNE, D.L. **Banana diseases and pests: Field guide for diagnostics and data collection**. Ed. Ibadan, Nigeria: International Institute of Tropical Agriculture (IITA), 2017. 73p.

**ARTIGO 1: AÇÃO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DE BANANEIRA SOBRE
Fusarium oxysporum f. sp. *cupense* IN VITRO**

Este artigo está formatado nas normas da Revista Ciência e Agrotecnologia (Science and Agrotechnology), ISSN:1413-7054

ACTION OF ENDOPHYTIC BACTERIA OF BANANA ON *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* IN VITRO

AÇÃO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DE BANANEIRA SOBRE *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* IN VITRO

ABSTRACT

The fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (*foc*) is one of the main diseases affecting banana crop. Biological control emerges as an alternative technology for disease. Therefore, the objective of this work was to evaluate in vitro the action of endophytic isolates obtained from banana "Prata-Anã" at different phases of the *foc* life cycle. The experiments were established in a completely randomized design with 41 treatments (40 bacteria and control without bacteria application) and three replications. Forty endophytic isolates of the genera *Bacillus*, *Klebsiella*, *Paenibacillus*, *Stenotrophomonas*, *Lysinibacillus*, and *Sporolactobacillus* were challenged with *foc*. The assays were mounted in pairing system or in the presence of volatile compounds. Principal component analysis showed that the spore germination variable in the presence of bacterial cells better explains the data variation. Spore germination in the presence of volatiles, pairing sporulation and in the presence of volatiles and colony area in the presence of bacterial cells explained about 86.10% of the observed total variance. The isolates of the genera *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Stenotrophomonas*, *Sporolactobacillus* and *Paenibacillus* showed promising results in both pairing and volatile presence in in vitro *foc* control.

Keywords: Fusarium wilt, biological control, *Bacillus* spp.

RESUMO

A murcha de fusarium causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (*foc*) é uma das principais doenças que afetam a cultura da bananeira. O controle biológico é uma tecnologia que tem sido utilizada dentro do manejo da doença no campo, entretanto existem poucos microrganismos registrados para o controle desta espécie de *Fusarium*. As bactérias possuem um metabolismo bastante versátil e com potencial biotecnológico controlar este fungo. Assim, objetivou-se avaliar *in vitro* a ação de isolados endofíticos de bananeira "Prata-Anã" em diferentes fases do ciclo de vida de *foc*. Os experimentos foram estabelecidos em delineamento inteiramente casualizado com 41 tratamentos (40 bactérias e testemunha sem aplicação da bactéria) e três repetições. Quarenta isolados endofíticos dos gêneros *Bacillus*, *Klebsiella*, *Paenibacillus*, *Stenotrophomonas*, *Lysinibacillus*, *Sporolactobacillus*, foram desafiados com *foc*. Os ensaios foram montados em sistema de pareamento ou na presença de compostos voláteis. A análise de componentes principais mostrou que a variável germinação de esporos na presença de células bacterianas melhor explica a variação dos dados. A germinação de esporos na presença de voláteis, esporulação no pareamento e na presença de voláteis e área da colônia na presença de células bacterianas explicaram cerca de 86,10% da variância total observada. Os isolados dos gêneros *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Stenotrophomonas*, *Sporolactobacillus* e *Paenibacillus* apresentaram resultados promissores tanto no pareamento quanto na presença de voláteis no controle *in vitro* de *foc*.

Palavras-chave: Murcha de fusarium, controle biológico, *Bacillus* spp.

INTRODUÇÃO

A murcha de fusarium, causada por *foc*, é uma das principais doenças que ocorre na bananicultura mundial e causa inúmeros prejuízos econômicos aos produtores (Fu et al., 2017). O fungo penetra pelas raízes das bananeiras invade o tecido vascular, causando sintomas de murcha gradual, amarelecimento progressivo e divisão longitudinal das bainhas das folhas no pseudocaule e, em estágios mais avançados morte da planta (Yin et al., 2011).

Medidas integradas de controle têm possibilitado a convivência com a doença no campo e a minimizar perdas. Dentro destas medidas, a utilização de agentes de biocontrole é uma prática adotada e, nos últimos anos tem se intensificado. Atualmente no Brasil, há registrado no Ministério de Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) o fungo *Trichoderma* spp., para controle de fitopatógenos do gênero *Fusarium* spp., e não há nenhum registro de bactérias. Entretanto, vários trabalhos de investigação têm demonstrado que o microbioma de bananeira é bastante diversificado e rico em espécies de bactérias (Souza et al., 2013; Souza et al., 2014; Pereira et al., 2018). Esta diversificação pode ser explorada na prospecção de biofunções de interesse agrícola, como o controle biológico.

O estudo de microbioma de plantas saudas e doentes de bananeira demonstrou maior diversidade no microbioma de plantas saudas comparativamente a diversidade observada em plantas doentes sugerindo uma ação na supressão de patógenos radiculares (Korbel et al., 2017). Assim, acredita-se que a seleção de microrganismos autóctones seja mais eficiente para utilização em ambiente com as mesmas características bioecológicas de sua seleção. Em bananeira da variedade Prata-Anã várias espécies de *Bacillus* spp. foram isoladas e o potencial biotecnológico foi avaliado e confirmado (Andrade et al., 2014; Matos et al., 2017; Gomes et al., 2017; Souza et al., 2017).

O biocontrole de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* e nematoides por bactérias associadas ao microbioma de banana são descritos na literatura (Ribeiro et al., 2012; Bidabadi; Sijun, 2018).

A bioprospecção de isolados candidatos ao controle biológico com múltiplas funções biológicas pode aumentar a chances de biocontrole, já que poderão atuar de forma indireta na promoção de crescimento. Considerando a relevância do tema, o presente estudo objetivou avaliar *in vitro* 40 isolados endofíticos oriundos de bananeira “Prata-Anã” e selecionar os mais promissores para ação de biocontrole sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense*.

MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram realizados com o isolado 106 de (*foc*) da micoteca do laboratório de Fitopatologia da Unimontes e 40 isolados bacterianos selecionados com base em funções fisiológicas desejáveis para um bioinoculante (Souza et al., 2013; Andrade et al., 2014; Gomes et al., 2017; Matos et al., 2017; Souza, 2017; Pereira et al., 2018) mantidos na bacterioteca deste mesmo laboratório (Tabela 1).

Tabela1. Descrição de 40 isolados de bactérias endofíticas utilizados, número de acesso do GenBank e habilidades nos testes *in vitro*.

Espécie^I	Isolado	Número de Acesso no GenBank	Habilidades II, III, IV, V
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	EB44	GU122948.1	SFI, AIA, LP
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	EB133	AB301022.1	FBN, SFI, LP
<i>Bacillus axarquienses</i>	EB30	JF414764.1	SFI, AIA, LP
<i>Bacillus cereus</i>	EB25	GU451184.1	FBN, SFI, AIA
<i>Bacillus flexus</i>	EB88	DQ870687.1	FBN, SFI, AIA
<i>Bacillus licheniformis</i>	EB49	EU366371.1	FBN, SFI, AIA, LP
<i>Bacillus methylotrophicus</i>	EB26	HM209756.1	FBN, SFI, AIA
<i>Bacillus pumilus</i>	EB46	FJ236809.1	SFI, AIA, SDF, LP
<i>Bacillus pumilus</i>	EB58	JN082265.1	SFI, AIA, LP
<i>Bacillus pumilus</i>	EB15	GQ917222.1	FBN, SFI, AIA
<i>Bacillus pumilus</i>	EB34	JN215511.1	SFI, AIA
<i>Bacillus pumilus</i>	EB51	HQ218993.1	FBN, SFI
<i>Bacillus pumilus</i>	EB63	GQ917222.1	SFI, AIA, LP
<i>Bacillus pumilus</i>	EB64	JF271873.1	FBN, SFI, AIA, LP
<i>Bacillus pumilus</i>	EB169	FJ189791.1	FBN, SFI, AIA
<i>Bacillus safensis</i>	EB68	JN092818.1	SFI, AIA
<i>Bacillus subtilis</i>	EB04	AY741264.1	FBN, SFI, AIA, LP
<i>Bacillus subtilis</i>	EB147	EU977724.1	SFI, AIA
<i>Bacillus subtilis</i>	EB84	HQ334981.1	FBN, SFI, AIA
<i>Bacillus subtilis</i>	EB126	HM769817.1	FBN, SFI, AIA
<i>Bacillus subtilis</i>	EB136	AB301012.1	FBN, SFI, AIA, LP
<i>Bacillus tequilensis</i>	EB87	HM770882.1	FBN, SFI, AIA
<i>Bacillus thuringiensis</i>	EB24	JF947357.1	FBN, SFI, AIA
<i>Bacillus</i> sp.	EB71	HM461161.1	FBN, SFI, AIA, LP
<i>Bacillus</i> sp.	EB47	FJ611939.1	FBN, SFI, AIA
<i>Bacillus</i> sp.	EB194	FJ405377.1	FBN, SFI, AIA, LP
<i>Bacillus</i> sp.	EB50	HM769816.1	FBN, SFI, AIA
<i>Bacillus</i> sp.	EB37	JN215502.1	SFI, AIA
<i>Bacillus</i> sp.	COD-001	GQ340516.1	FBN, SFI, AIA
<i>Bacillus</i> sp.	EB81	HQ003450.1	FBN, SFI, AIA
<i>Bacillus</i> sp.	EB78	EU977790.1	FBN, SFI, AIA,
<i>Bacillus</i> sp.	EB80	EU972777.1	FBN, AIA
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	EB23	JN201948.1	FBN, SFI, AIA
<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	EB45	JN215512.1	FBN, SFI, AIA
<i>Lysinibacillus</i> sp.	EB53	JN215512.1	SFI, AIA, LP
<i>Lysinibacillus</i> sp.	EB60	JF906500.1	SFI, AIA, LP
<i>Paenibacillus</i> sp.	EB28	EF178460.1	FBN, SFI, AIA
<i>Paenibacillus</i> sp.	EB144	EF178460.1	FBN, SFI, AIA
<i>Stenotrophomonas</i> sp.	EB38	EU931559.1	FBN, SFI, AIA
<i>Sporolactobacillus</i> sp.	EB127	D16282.1	FBN, SFI, AIA, LP

Fonte: ^ISouza et al. (2013); ^{II}Andrade et al., 2014 (FBN: Fixadores biológicos de nitrogênio), ^{III}Matos et al., 2017 (SFI: Solubilizadores de fosfato inorgânico), ^{IV}Gomes et al., 2017 (AIA: Produtores de ácido indol acético), ^VSouza, 2017 (LP: Produtores de lipase).

Multiplicação dos microrganismos

O isolado 106 de *foc* foi multiplicado em placa de Petri contendo meio BDA (Batata, Dextrose e Ágar) por sete dias a 25°C em escuro contínuo. As colônias foram utilizadas para obtenção de discos de 5 mm de diâmetro, retirados da borda da colônia e utilizados nos pareamentos, ou para obtenção de suspensões de esporos para testes de germinação. As suspensões de esporos foram obtidas com a adição de 20 mL de água destilada mais Tween 1% sobre as colônias, e com auxílio de uma lâmina de vidro os esporos foram colocados em suspensão. Após a filtragem em gaze estimou-se o número de esporos em câmara de Neubauer com auxílio de microscópio de luz.

As suspensões foram ajustadas para concentração de 2×10^5 esporos/mL e utilizadas nos testes de germinação. Os isolados bacterianos foram multiplicados isoladamente em placas de Petri contendo meio TSA (Trypic Soy Ágar) por 48 horas a 25°C. Um volume de 5 mL de solução salina a 0,85% de NaCl foi adicionada as colônias para obtenção de suspensão bacteriana. A concentração da suspensão bacteriana foi estimada em espectrofotômetro a 1,0 de absorbância DO= 540 nm.

Teste de Antibiose

Os isolados foram desafiados utilizando-se o método de cultura pareada conforme descrito por OSAKTAN et al. (2015). A 10mm da borda de placas de Petri de 90 mm contendo meio BDA adicionou-se o disco de 5 mm de *foc* do lado oposto fez-se uma risca da suspensão bacteriana preparada de acordo com item anterior. As placas foram mantidas em BOD em escuro contínuo por sete dias a 25°C. O tratamento testemunha recebeu uma risca solução salina a 0,85%. Após este período, na maior extensão de crescimento da colônia mediu-se o raio da colônia com auxílio de uma régua milimétrica. Para análise os valores de raio foram convertidos em área da colônia (cm²) ($A = \pi r^2$).

A quantificação de esporos em cada colônia foi avaliada a partir de uma suspensão de esporos preparada seguindo a mesma metodologia descrita no item anterior. A concentração

de esporos da suspensão foi quantificada em câmara de Neubauer com auxílio de microscópio de luz e número de esporos/cm² de área micelial. A viabilidade de germinação destes esporos foi determinada pelo teste de germinação. Em placas de Petri de 70 mm de diâmetro contendo ágar-água (40 g/L), adicionou-se uma alíquota de 100 µL da suspensão de esporos e incubou-se por 12 horas a temperatura ambiente. Após esse período, em microscópio de luz, foram quantificados os 100 primeiros esporos germinados ou não. Considerou-se esporo germinado aquele com tubo germinativo maior ou igual ao comprimento do esporo.

Com o objetivo de avaliar o efeito direto da suspensão bacteriana sobre a germinação dos esporos de *foc*, adicionou-se volumes iguais de 1 mL das suspensões (v/v) de esporos de *foc* e de bactérias endofíticas de maneira que a concentração final da suspensão fúngica fosse 10⁵ esporos/mL e a bacteriana 0,5 de absorbância (DO=540 nm). Um volume de 100 µL desta suspensão mista (*foc* + bactéria) foi espalhado na superfície do meio ágar-água contido em placas de Petri, e incubadas a temperatura ambiente por 12 horas. Após esse período foram quantificados em microscópio óptico 100 esporos germinados e não germinados.

A ação de compostos voláteis produzidos pelas bactérias também foi avaliada em placas de Petri de 90 mm de diâmetro. No centro da placa contendo meio BDA foi depositado o disco contendo micélio de *foc* conforme descrito anteriormente. Na parte inferior da tampa da placa foi vertido meio TSA e sobre este com auxílio de alça de drigalski fez-se à risca da suspensão bacteriana a 1 de absorbância DO= 540 nm. As placas foram vedadas utilizando plástico filme e mantidas em BOD a 25° C por sete dias. Após este período estimou-se o diâmetro da colônia, esporulação e germinação com a mesma metodologia descrita anteriormente. Na testemunha foi realizada uma risca de solução salina a 0,85%. Para análise os valores de diâmetro foram convertidos em área da colônia (cm²) ($A = \pi r^2$).

Os experimentos foram realizados em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com 41 tratamentos e três repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e as

médias agrupadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Foi utilizado o software “R” versão 3.5 (2015) para a análise estatística. A percentagem de redução dentro de cada variável avaliada foi determinada pela fórmula descrita por Mourão et al. (2003).

$$\% \text{ Redução} = [1 - (\text{Média do Tratamento}/\text{Média da Testemunha})] * 100$$

Os dados relacionados às variáveis dos ensaios *in vitro* foram submetidos à análise multivariada, utilizando-se a Análise de Componentes Principais para identificar quais características avaliadas, como: área da colônia antibiose, área da colônia volátil, germinação direta e indireta no teste de antibiose, germinação no teste de voláteis, esporulação no teste de antibiose e voláteis influenciaram o controle do patógeno. A medida de dissimilaridade utilizada foi à distância Euclidiana e o método de agrupamento hierárquico utilizado foi o de UPGMA (*Unweighted Pair- Group Method using Arithmetic Averages*). O ponto de corte do dendograma foi escolhido de acordo com a significância da constante “k” pelo método de Mojena. A análise dos componentes principais foi realizada usando o software “Genes” (Cruz, 1998).

RESULTADOS

Pela tabela 2 verificou-se efeito significativo dos isolados ($p < 0,05$) para todas as características avaliadas. Os testes de normalidade dos resíduos (Shapiro Wilk) e homogeneidade das variâncias (Bartlett) foram significativos a 5% de probabilidade, demonstrando que os dados seguem distribuição normal.

Tabela 2. Resumo da análise de variância para as características avaliadas.

Variável	Quadrado Médio	Shapiro Wilk	Bartlett	CV (%)
Área da colônia pareamento	377,96610*	0,0144	0,0000	23,77
Esporulação no pareamento	2940,4283*	0,0002	0,0001	28,62
Germinação de esporos presença de células bacterianas	2480,165598*	0,002	0,000	7,07
Germinação de esporos pareamento	919,2483*	0,000	0,000	1,59
Área da colônia volátil	134,346*	0,0315	0,000	17,60
Esporulação volátil	708,8297*	0,000	0,000	36,24
Germinação volátil	1686,2012*	0,000	0,000	5,91

* Significativo a 5% de probabilidade ($p < 0,05$) pelo teste F.

Os quatro primeiros autovalores estimados para os componentes: germinação de esporos presença de células bacterianas, esporulação pareamento, esporulação volátil e área da colônia volátil representaram cerca de 86,10% da variância total observada (Tabela 3). O componente germinação de esporos na presença de células bacterianas foi o mais importante para o estudo, pois foi derivado do maior autovalor e explica em torno de 29,88% da variação total. O segundo componente mais importante é a esporulação no pareamento, derivada do segundo maior autovalor e explica em torno de 23,05. Os componentes associados às porcentagens esporulação e área da colônia em voláteis acumularam uma porcentagem da variância explicada acumulada de 33,17% (Tabela 3).

Tabela 3. Componentes principais, autovalores e porcentagem da variância explicada e porcentagem da variância explicada acumulada.

Componente Principal	Autovalores	% Variância explicada	% Variância explicada acumulada	Recomendação
Germinação de esporos presença de células bacterianas	2,09	29,88	29,88	-
Esporulação pareamento	1,63	23,05	52,93	-
Esporulação volátil	1,41	20,19	73,12	-
Área da colônia volátil	0,90	12,98	86,10	-
Germinação esporos pareamento	0,63	9,10	95,20	Descarte
Germinação volátil	0,21	3,05	98,25	Descarte
Área da colônia Antibiose	0,12	1,75	100	Descarte
Teste de Pillai = 1,411446e ⁻¹⁰⁴				

Houve a formação de 15 grupos diferentes, sendo que 67,5% dos isolados diferiram da testemunha (Tabela 4). Em todos os ensaios, pareamento com as bactérias, na presença de suspensão contendo células bacterianas e na presença de compostos voláteis, houve redução de germinação dos esporos. A suspensão contendo células bacterianas promoveu redução de até 96% na germinação dos esporos de *foc*. Os isolados mais eficientes foram EB 37, EB 28, EB 23 e EB 127 que reduziram acima de 70% da germinação.

Tabela 4. Número de esporos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* germinados na presença de células bacterianas de diferentes isolados bacterianos endofíticos de bananeira.

Grupo de Isolados	Germinação (%)
EB37	4,00a
EB28	13,67b
EB23, EB127	26,67+27,33c
EB133, EB68	30,67 + 31,33d
EB136	40,67e
EB26, EB144	45,00 + 46,00f
EB30, EB126, EB71, EB46, EB169	47,33+51,67g
EB04, EB53	51,67 +55,33h
EB49	64,00i
EB78, EB64, EB60	71,00 +72,00j
EB194, EBEB50	73,67 +76,00k
EB45	81,67l
EB44, EB84	91,00 +91,33m
COD-001, EB81	94,00 +95,67n
EB15, EB147, EB24, EB47, EB80, EB34, EB51, EB63, EB87, EB88, EB38, EB58, EB25, Testemunha	97,00 +100o
CV (%)	7,07

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

Observou-se a formação de cinco grupos nos ensaios de pareamento e três grupos no ensaio de compostos voláteis sobre a esporulação de *foc* (Tabela 5 e 6). Houve redução de 85,41% da esporulação do fungo/cm² de crescimento da colônia produzidas em pareamento e 78,66% sob atividade de compostos voláteis. Os dezesseis isolados mais eficientes, com redução média de 66,83% da esporulação no teste de pareamento, apresentaram redução

média de 59,12% no teste de voláteis. A ação de compostos voláteis na redução de esporos/cm² foi evidenciada em 35 isolados, mostrando que esse efeito é mais frequente dentro deste grupo de isolados.

Tabela 5. Número de esporos produzidos/ cm² da colônia de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* pareadas com diferentes isolados bacterianos.

Grupo de Isolados	Esporulação/cm ²
EB44, EB49, EB68, COD-001, EB38, EB58, EB46, EB126, EB15, EB169, EB64, EB51, EB127, EB25, EB88, EB37	12,22±36,67a
EB26, EB71, EB28, EB133, EB47, EB80, EB84, EB23, EB45, EB87, EB78, EB81, EB30, EB24, EB60, EB147, EB50, EB136	43,18 ±69,96b
EB34, EB63, EB144, Testemunha	76,57 ±89,67c
EB04, EB194	109,40 ±118,58d
EB53	173,99e
CV (%)	28,62

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

Tabela 6. Número de esporos produzidos/ cm² da colônia de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* na presença de compostos voláteis de diferentes isolados bacterianos.

Grupo de Isolados	Esporulação/cm ²
EB53, EB133, EB24, EB38, EB84, EB126, EB82, EB78, EB64, EB63, E B51, EB144, EB49, EB88, EB28, EB34, EB25, EB68, EB127, EB26, EB147, EB30, EB58, EB87, COD-001, EB23, EB50, EB88, EB71, EB15, EB60, EB46, EB37, EB169	13,63±41,50 a
EB04, EB45, EB136, EB47, Testemunha	48,19±68,39b
EB194	85,09c
CV (%)	36,24

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

Foram formados dois grupos distintos de área de colônia na presença de voláteis (Tabela 7). Vinte e três isolados apresentaram reduções significativas e dois deles (EB136 e EB51) reduziram até 54,62% a área da colônia de *F. oxysporum* f. sp. *cubense*.

Tabela 7. Área da colônia de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* na presença de voláteis de diferentes isolados endofíticos.

Grupos de Isolados	Área da colônia volátil (cm²)
EB169, EB53, EB04, EB26, EB45, EB44, EB133, EB68, EB88, EB24, EB127, EB84, EB38, EB78, EB50, EB194, EB47, EB46, COD-001, EB126, EB25, EB51, EB136.	26,11±44,27a
EB71, EB30, EB58, EB80, EB144, EB23, EB34, EB60, EB28, EB15, EB81, EB87, EB64, EB49, EB37, EB147, EB63,	45,25 ±60,00b
Testemunha	
CV (%)	17,60

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

Pelo método de agrupamento UPMGA baseado na distância Euclidiana os 40 isolados endofíticos foram divididos em oito grupos no ponto de corte de 80% (Figura 1), e todos eles são homogêneos entre si e distintos entre eles. A análise de dissimilaridade convertida para dendograma apresentou um coeficiente de correlação cofenética de 80%, isto significa que o dendograma se assemelha em 80% das matrizes de dissimilaridade geradas pelo método UPGMA.

Na análise de agrupamento o quinto grupo composto pelos isolados EB04 e EB194 foi responsável por maiores valores de esporulação nos dois testes realizados, sugerindo assim que estes isolados não são efetivos para o controle da esporulação de *foc*. O sexto grupo composto pelos isolados de COD-001 até EB88 agruparam aqueles que foram efetivos em controlar pelo menos uma fase do ciclo. O agrupamento composto por EB37 a EB30 (oitavo grupo) apresentaram reduções de germinação no pareamento, esporulação tanto em pareamento quanto na presença de voláteis e área da colônia em testes de voláteis (Figura 1).

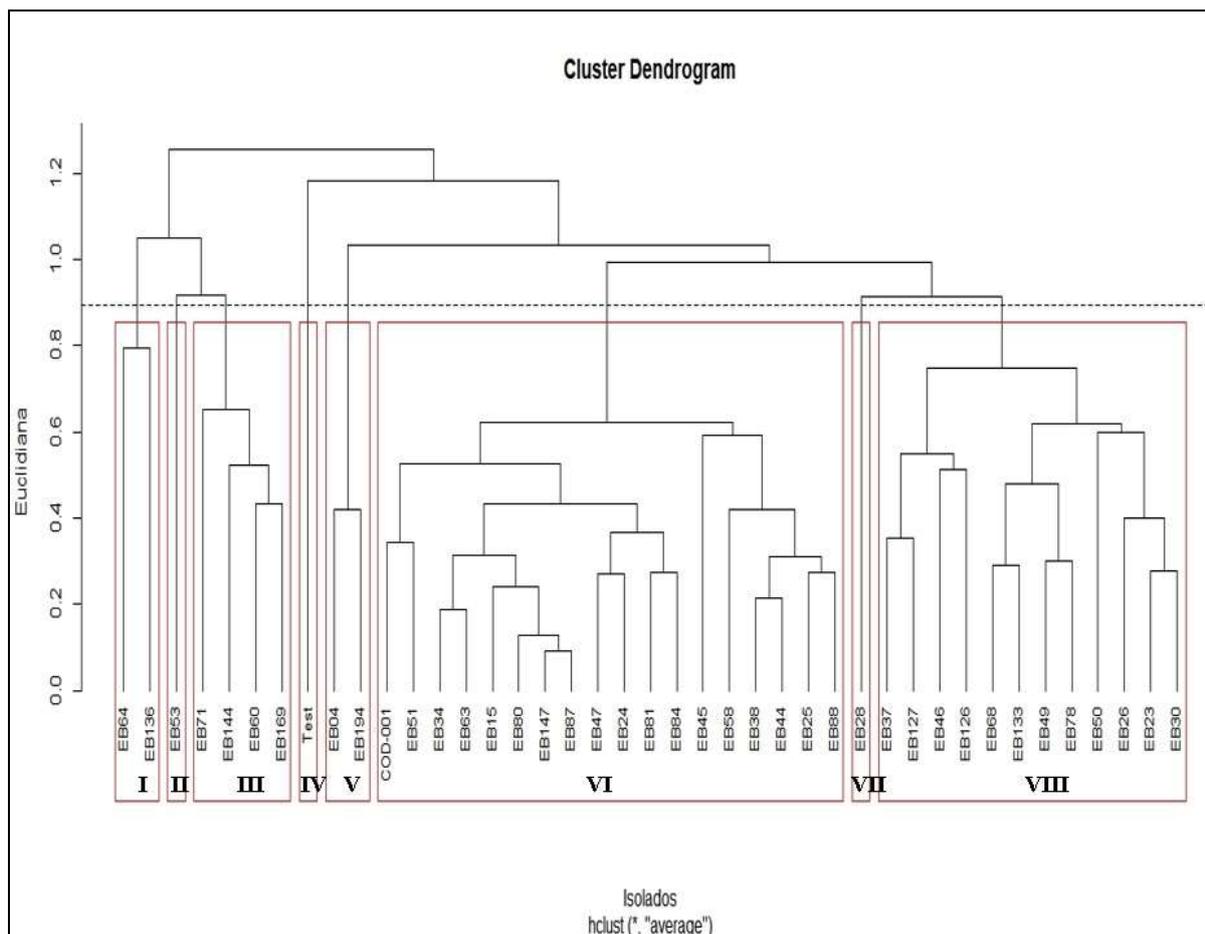


Figura 1. Dendrograma de dissimilaridade genética construído com o índice de Jaccard e método de agrupamento UPGMA, mostrando os agrupamentos formados entre os 40 isolados endofíticos.

DISCUSSÃO

Na análise conjunta das variáveis os resultados mostraram que a germinação foi a variável que mais contribuiu para avaliar os efeitos dos isolados bacteriano sobre o fungo e possibilitar a seleção dos mesmos. Os isolados *Bacillus* sp. (EB 37), *Klebsiella pneumonia* (EB 23), *Paenibacillus* sp. (EB 28), e *Sporolactobacillus* sp. (EB 127), inibiram mais de 70% a germinação de *foc*. Especial atenção deve ser dada ao isolado EB37, que inibiu 96% da germinação de *foc* e foi o mais eficiente. Podemos considerar que a inibição da germinação dos esporos pode ter ocorrido pela capacidade já relatada que os isolados endofíticos possuem

em secretar metabólitos secundários como iturinas e fengicina responsáveis por inibir a emissão do tubo germinativo (Lee et al., 2017; Bruisson et al., 2019).

Os microrganismos antagonistas ou os metabólitos produzidos por eles podem atuar tanto prevenindo o estabelecimento dos fitopatógenos quanto inibindo sua atividade fitopatogênica após a colonização na planta (Palazzini et al., 2016). No entanto, quando sua ação ocorre na fase de germinação ou na formação inicial do tubo germinativo, inibe-se a penetração na planta hospedeira e o controle pode se tornar ainda mais efetivo (Figuerola-López et al., 2016). A área da colônia foi reduzida na presença de voláteis, isso significa potencial redução da doença no campo, já que as hifas do fitopatógeno também podem iniciar novos ciclos de infecção. Segundo Yuan et al. (2012) a produção de compostos voláteis é um atributo interessante porque podem atingir o fitopatógeno em pontos mais distantes e provocar a sua inibição. Estes mesmo autores verificaram em seus experimentos que *Bacillus* spp. produz compostos voláteis com capacidade de inibir o crescimento micelial de *foc*.

No controle biológico, é desejável que o agente reduza os novos ciclos de vida do fitopatógeno atuando em redução de propágulos. Reduções de esporulação foram verificadas tanto no teste de pareamento como no teste de voláteis, sugerindo assim que as bactérias endofíticas possam ter atuado como inibidores da formação de novas unidades propagativas por meio de ação direta e a distância através de compostos voláteis (Borah et al., 2016). Diversos autores já relataram propriedades fungicidas e fungistáticas dos compostos voláteis (Asari et al., 2016; Beneduzi et al., 2012) produzidos por espécies de *Bacillus* (Torres et al., 2016).

Tem sido demonstrado em que os compostos voláteis bacterianos podem afetar eventos como crescimento de hifas, esporulação e germinação de esporos fúngicos (Wenke et al., 2010). A compreensão dos mecanismos das bactérias benéficas é muito importante para desenvolver estratégias de biocontrole comercialmente eficientes e bem sucedidas contra

patógenos de plantas (Raza et al., 2013). Dentre os micro-organismos avaliados merecem atenção os isolados EB04, EB51, COD-001, EB 53 e EB50 pela capacidade de reduzir área da colônia nos dois testes utilizados. Os isolados EB44, EB49, EB68, EB38, EB58, EB46, EB126, EB15, EB64, EB51, EB127, EB28, EB88 e EB37 pela redução da esporulação em pareamento e na presença de voláteis. E, o isolado EB136 pela capacidade de redução da germinação de esporos nas duas avaliações, seja na presença de voláteis ou no pareamento.

Um critério que quantifique a distância entre indivíduos é entendido como medida de dissimilaridade e logo, quanto menores os valores destas médias, mais similares são os indivíduos. O tratamento sem aplicação das bactérias ficou isolado em um grupo, demonstrando altos valores de dissimilaridade, ou seja, todos os isolados utilizados foram diferentes da testemunha, sugerindo que os endofíticos em menor ou maior grau controlaram o isolado 106 de *foc*. Quanto menores os valores das medidas de dissimilaridade, mais similares são os indivíduos (Manly et al., 2008), o grupo composto pelos isolados EB37 até EB30 obtiveram os maiores valores de dissimilaridade da testemunha sugerindo assim que estes sejam isolados a serem utilizados para trabalhos futuros no controle do isolado 106 de *foc*. Os resultados do presente estudo são bastante promissores e indicam o potencial de diversos isolados de endofíticos oriundos de bananeira no controle de *foc*.

CONCLUSÕES

Todos os isolados reduziram um ou mais evento biológico do ciclo do patógeno;

Os isolados EB-37 e EB-30 foram os mais eficientes na redução de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*;

A variável que melhor explica a resposta das dos isolados bacterianos ao isolado 106 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense* é a germinação na presença de células bacterianas.

AGRADECIMENTOS

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela

concessão de bolsa de pós-graduação código de financiamento 001. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, L. F. et al. Analysis of the abilities of endophytic bacteria associated with banana tree roots to promote plant growth. **Journal of Microbiology**, 52(1): 27-34, 2014.

ASARI, S. et al. Multiple effects of *Bacillus amyloliquefaciens* volatile compounds: plant growth promotion and growth inhibition of phytopathogens. **FEMS Microbiology Ecology**, 92(6): 1-14, 2016.

BENEDUZI, A. et al. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agentes. **Genetics andMolecular Biology**, 35(4):1044-1051, 2012.

BIDABADI, S. S.; SIJUN, Z. B. Banana Fusarium wilt (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*) control and resistance, in the context of developing wilt-resistant bananas within sustainable production systems. **Horticultural Plant Journal, Chengdu**, 4(5): 208–218, 2018.

BORAH, S. N. et al. Rhamnolipid biosurfactant against *Fusarium verticillioides* to control stalk and ear rot disease of maize. **Frontiers in Microbiology**, 7(3):1-10, 2016.

BRUISSON, S. et al. Endophytes and epiphytes from the grapevine leaf microbiome as potential bioncontrol agentes against phytopathogens. **Frontiers in Microbiology**, 29(2):1-17, 2019.

CRUZ, C. D. Programa GENES - Aplicativo Computacional em Estatística Aplicada à Genética (GENES - Software for Experimental Statistics in Genetics). **Genetics and Molecular Biology**, 21(1), 1998.

FIGUEROA-LÓPEZ, A. M. et al. Rhizospheric bacteria of maize with potential for biocontrol of *Fusarium verticillioides*. **Springer Plus**, 5(5): 330, 2016.

FU, L. et al. Inducing the rhizosphere microbiome by biofertilizer application to suppress banana Fusarium wilt disease. **Soil Biology & Biochemistry**, 104(6):39-48, 2017.

GOMES, I. P. et al. Auxin production by endophytic bacteria isolated from banana trees. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 60(10):1-12, 2017.

KORBELL, M. et al. Members of Gamma proteobacteria as indicator species of healthy banana plants on Fusarium wilt infested fields in Central America. **Scientific Reports**, 7(3): p.1-9, 2017.

LEE, T. et al. Characterization of *Bacillus amyloliquefaciens* DA12 showing potent antifungal activity against mycotoxigenic *Fusarium* Species. **Plant Pathology**, 33(5):499-507,2017.

- MANLY, B. F. J. **Métodos estatísticos multivariados**: Uma introdução. Porto Alegre: Editora Bookman, 2008. 229p.
- MATOS, A.D.M. et al. Phosphate solubilization by endophytic bacteria isolated from banana trees. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 89(4): 2945- 2954, 2017.
- MOURÃO, S.A. et al. Seletividade de defensivos agrícolas ao fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana*. **Netropical Entomology**, 32(1): 103-106, 2003.
- OZAKTAN, H. et al. Isolation and evaluation of endophytic bacteria against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* infecting cucumber plants. **Austin Journal of Plant Biology** v.1, (1): 1-6, 2015.
- PALAZZINI, J. M. et al. *Bacillus velezensis* RC 218 as a biocontrol agent to reduce *Fusarium* head blight and deoxynivalenol accumulation: Genome sequencing and secondary metabolite cluster profiles. **Microbiological Research**, 192(3) p. 30-36, 2016.
- PEREIRA, D. F. G. S. et al. Characterization and activity of endophytic bacteria from ‘Prata Anã’ banana crop (*Musa* sp., AAB). **Revista Ceres**, 65 (5): 381-387, 2018.
- R CORE TEAM (2015). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- RAZA, W. et al. Volatile and nonvolatile antifungal compounds produced by *Trichoderma harzianum* SQR-T037 suppressed the growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*. **Science Letters**, 1(1): 21-24, 2013.
- RIBEIRO, R. C. F. et al. Rizobactérias no controle de *Meloidogyne javanica* e mal do Panamá. **Nematropica**, 42(2): 218-226, 2012.
- SOUZA, A. et al. Endophytic bacteria from banana cultivars and their antifungal activity. **Genetics and Molecular Research**, 13 (4): 8661-8670, 2014.
- SOUZA, G. L. O. D. et al. Endophytic bactéria used as bioinoculants in micropropagated banana seedlings. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 39(2): 1-10, 2017.
- SOUZA, S. A. et al. Endophytic bacterial diversity in banana ‘Prata Anã’ (*Musa* spp.) roots. **Genetics and Molecular Biology**, 36 (2): 252-264, 2013.
- TORRES, M. J. et al. Antagonistic effects of *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* and *B. amyloliquefaciens* against *Macrophomina phaseolina*: SEM study of fungal changes and UV-MALDI-TOF MS analysis of their bioactive compounds. **Microbiological Research**, 182(3): 31-39, 2016.
- WENKE, M.; KAI, M.; PIECHULLA, B. Below ground volatiles facilitate interactions between plant roots and soil organisms. **Planta**, 231(4): 499-506, 2010.

YIN, X. M. et al. Characterization of early events in banana roots infected with green fluorescent protein-tagged *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. **Acta Horticulturae**, 897(4): 371-376, 2011.

YUAN, J.; RAZA, W.; SHEN, Q.; HUANG, O. Antifungal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 volatile compounds against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. **Applied and Environmental Microbiology**, 78(16): 5942–5944, 2012.

**ARTIGO 2: AÇÃO DE BACTERIAS ENDOFÍTICAS SOBRE A MURCHA DE
FUSARIUM E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE BANANEIRA**

Este artigo está formatado nas normas da Revista Ciência e Agrotecnologia (Science and Agrotechnology), ISSN:1413-7054

ACTION OF ENDOPHYTIC BACTERIES ON *FUSARIUM* WILT AND BANANA GROWTH PROMOTION

AÇÃO DE BACTERIAS ENDOFÍTICAS SOBRE A MURCHA DE *FUSARIUM* E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE BANANEIRA

ABSTRACT

The fusarium wilt is considered one of the most devastating diseases of banana cultivation. The disease is caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (*foc*). The fungus is able to survive in the soil by means of chlamydospores, which when they germinate come into contact with roots, colonize the vascular system leading to generalized wilt. The control methods available are not effective, so new strategies are needed. Biological control, through the use of growth-promoting bacteria, offers an alternative to *foc*. The present study aimed to test the capacity of 40 isolates of endophytic bacteria to control *Fusarium* wilt and to promote the growth of micropropagated banana seedlings “Prata Catarina”. The experiment was in randomized blocks with 42 treatments (40 endophytic isolates and two controls: *foc* and control) and five replications. Incidence and severity of *foc* were evaluated, as well as the promotion of plant growth. All the endophytic isolates used reduced the severity of *Fusarium* wilt, with a maximum reduction of 91.33%. There was an increase in all morphological characteristics evaluated in the presence or absence of *foc*, values of. The EB 37 isolate (*Bacillus* sp.) Promoted an increase of 1015% in the dry root mass.

Keywords: Biological control, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, *Bacillus* sp., *Musa* spp.

RESUMO

A murcha de fusarium é considerada uma das doenças mais devastadoras da cultura da bananeira. A doença é causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (*foc*). O fungo é capaz de sobreviver no solo por meio de clamidósporos, que quando germinam entram em contato com raízes, colonizam o sistema vascular levando a murcha generalizada. Os métodos de controle disponíveis não são efetivos, portanto são necessárias novas estratégias. O controle biológico, por meio do uso de bactérias promotoras do crescimento oferece uma alternativa a *foc*. O presente estudo objetivou testar a capacidade de 40 isolados de bactérias endofíticas no controle da murcha de fusarium e na promoção do crescimento de mudas micropropagadas de bananeira “Prata Catarina”. O experimento foi em blocos casualizados com de 42 tratamentos (40 isolados endofíticos e duas testemunhas: *foc* e controle) e cinco repetições. Foram avaliadas incidência e severidade de *foc* bem como a promoção de crescimento das plantas. Todos os isolados endofíticos utilizados reduziram a severidade da murcha de fusarium, com redução máxima de 91,33%. Houve aumento de todas as características morfológicas avaliadas na presença ou ausência de *foc*, valores de. O isolado EB 37 (*Bacillus* sp.) promoveu um incremento da ordem de 1015% na massa seca de raiz.

Palavras-chave: Controle biológico, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, *Bacillus* sp., *Musa* spp.

INTRODUÇÃO

A banana (*Musa* spp.) é uma das frutas de maior importância econômica das regiões tropicais e subtropicais no mundo (Amah et al., 2018). No ano de 2017, foram produzidas cerca de 145 milhões de toneladas de bananas em 5,5 milhões de hectares em 130 países (FAOSTAT, 2017). No Brasil as variedades mais plantadas são “Prata”, “Prata-Anã” e “Pacovan” e estas respondem por mais de 60% da área cultivada, no entanto a suscetibilidade dessas cultivares a doenças, principalmente a murcha de fusarium tem limitado sua produção e expansão agrícola (Lichtemberg; Lichtemberg, 2011).

A murcha de fusarium é causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, é um fungo capaz de penetrar nas raízes via pelos radiculares (Ghag et al., 2015), em zonas de emissão de raízes novas, ou também via ferimentos, colonizando todo o tecido vascular, ocasionando infecção sistêmica do pseudocaule (Li et al., 2017). Os sintomas de clorose foliar, rachaduras na base do pseudocaule, murcha total da planta e descoloração do tecido vascular só aparecem vários meses após o início da infecção (Dong et al., 2014). A intensidade dos sintomas varia com nível de resistência da planta hospedeira, com o pH da solução do solo, com o teor de matéria orgânica e a teores e fontes de nutrientes utilizados no manejo de adubação. Isto faz com que a intensidade e precocidade de observação dos sintomas sejam muito variáveis no campo dificultando a identificação da doença, bem como o controle da mesma.

Em áreas com o cultivo de variedades suscetíveis, o patógeno encontra um ambiente favorável e, uma vez instalada, a erradicação é praticamente impossível. O fungo é capaz de produzir clamidósporos e sobreviver por 30 anos no solo (Ploetz, 2015), sendo assim, a solução mais apropriada é adotar medidas de convivência com a mesma. O controle biológico tem sido uma estratégia adotada nos últimos anos. O uso e aplicação de microrganismos endofíticos, especialmente as bactérias, tem sido amplamente relatada na literatura. Esse grupo apresenta múltiplas habilidades, pois além de serem capazes de atuar em processos pré-

infecção (Hardoim et al., 2015) podem induzir resistência em cultivares suscetíveis (Fischal et al., 2010; Seethapathy et al., 2016; Wang et al., 2016), e na promoção do crescimento das plantas (Karthik et al., 2017).

Diversos isolados endofíticos foram isolados de raízes da cultivar Prata-Anã (Souza et al., 2013) e, estudos de bioprospecção foram realizados como o objetivo de caracterizar o potencial biotecnológico dos mesmos (Matos et al., 2017, Gomes et al., 2017; Andrade et al., 2014). Acredita-se que os microrganismos autóctones com múltiplas funções biológicas podem aumentar a chances de biocontrole, já que poderão atuar de forma indireta na promoção de crescimento e indução de resistência de plantas. Este tipo de seleção é estrategicamente interessante para regenerar e enriquecer a rizosfera de mudas de bananeira micropropagadas, já que durante o processo de produção *in vitro* os explantes reduzem muito sua carga microbiana natural (Etminani; Harigh, 2018).

Diante do exposto, objetivou-se testar a capacidade de 40 isolados de bactérias endofíticas oriundas de bananeira no controle da murcha de fusarium e na promoção do crescimento de mudas micropropagadas de bananeira “Prata Catarina” em condições de casa de vegetação.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em casa de vegetação da Universidade Estadual de Montes Claros campus Janaúba com as coordenadas geográficas 15°49’47,97” de latitude e 43°16’08,98” de longitude a 545 metros de altitude. O clima, segundo a classificação de Köppen, é do tipo Aw, caracterizado por um verão chuvoso e inverno seco. Foi utilizado o isolado 106 de *foc*, obtido de isolamento de bananais do Norte de Minas na cultivar Prata-Anã. Selecionaram-se da bacterioteca do laboratório de fitopatologia da Universidade Estadual de Montes Claros 40 isolados bacterianos com múltiplas funções (Souza et al., 2013; Andrade et al., 2014; Matos et al., 2017; Gomes et al., 2017).

Tabela 1. Isolados bacterianos, número de acesso do GenBank e habilidades dos endofíticos utilizados no experimento.

Espécie^I	Isolado	Número de Acesso no GenBank	Habilidades II, III, IV, V
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	EB44	GU122948.1	SFI, AIA, LP
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	EB133	AB301022.1	FBN, SFI, LP
<i>Bacillus axarquienses</i>	EB30	JF414764.1	SFI, AIA, LP
<i>Bacillus cereus</i>	EB25	GU451184.1	FBN, SFI, AIA
<i>Bacillus flexus</i>	EB88	DQ870687.1	FBN, SFI, AIA
<i>Bacillus licheniformis</i>	EB49	EU366371.1	FBN, SFI, AIA, LP
<i>Bacillus methylotrophicus</i>	EB26	HM209756.1	FBN, SFI, AIA
<i>Bacillus pumilus</i>	EB46	FJ236809.1	SFI, AIA, SDF, LP
<i>Bacillus pumilus</i>	EB58	JN082265.1	SFI, AIA, LP
<i>Bacillus pumilus</i>	EB15	GQ917222.1	FBN, SFI, AIA
<i>Bacillus pumilus</i>	EB34	JN215511.1	SFI, AIA
<i>Bacillus pumilus</i>	EB51	HQ218993.1	FBN, SFI
<i>Bacillus pumilus</i>	EB63	GQ917222.1	SFI, AIA, LP
<i>Bacillus pumilus</i>	EB64	JF271873.1	FBN, SFI, AIA, LP
<i>Bacillus pumilus</i>	EB169	FJ189791.1	FBN, SFI, AIA
<i>Bacillus safensis</i>	EB68	JN092818.1	SFI, AIA
<i>Bacillus subtilis</i>	EB04	AY741264.1	FBN, SFI, AIA, LP
<i>Bacillus subtilis</i>	EB147	EU977724.1	SFI, AIA
<i>Bacillus subtilis</i>	EB84	HQ334981.1	FBN, SFI, AIA
<i>Bacillus subtilis</i>	EB126	HM769817.1	FBN, SFI, AIA
<i>Bacillus subtilis</i>	EB136	AB301012.1	FBN, SFI, AIA, LP
<i>Bacillus tequilensis</i>	EB87	HM770882.1	FBN, SFI, AIA
<i>Bacillus thuringiensis</i>	EB24	JF947357.1	FBN, SFI, AIA
<i>Bacillus</i> sp.	EB71	HM461161.1	FBN, SFI, AIA, LP
<i>Bacillus</i> sp.	EB47	FJ611939.1	FBN, SFI, AIA
<i>Bacillus</i> sp.	EB194	FJ405377.1	FBN, SFI, AIA, LP
<i>Bacillus</i> sp.	EB50	HM769816.1	FBN, SFI, AIA
<i>Bacillus</i> sp.	EB37	JN215502.1	SFI, AIA
<i>Bacillus</i> sp.	COD-001	GQ340516.1	FBN, SFI, AIA
<i>Bacillus</i> sp.	EB81	HQ003450.1	FBN, SFI, AIA
<i>Bacillus</i> sp.	EB78	EU977790.1	FBN, SFI, AIA,
<i>Bacillus</i> sp.	EB80	EU972777.1	FBN, AIA
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	EB23	JN201948.1	FBN, SFI, AIA
<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	EB45	JN215512.1	FBN, SFI, AIA
<i>Lysinibacillus</i> sp.	EB53	JN215512.1	SFI, AIA, LP
<i>Lysinibacillus</i> sp.	EB60	JF906500.1	SFI, AIA, LP
<i>Paenibacillus</i> sp.	EB28	EF178460.1	FBN, SFI, AIA
<i>Paenibacillus</i> sp.	EB144	EF178460.1	FBN, SFI, AIA
<i>Stenotrophomonas</i> sp.	EB38	EU931559.1	FBN, SFI, AIA
<i>Sporolactobacillus</i> sp.	EB127	D16282.1	FBN, SFI, AIA, LP

Fonte: ^ISouza et al. (2013); ^{II}Andrade et al., 2014 (FBN: Fixadores biológicos de nitrogênio), ^{III}Matos et al., 2017 (SFI: Solubilizadores de fosfato inorgânico), ^{IV}Gomes et al., 2017 (AIA: Produtores de ácido indol acético), ^VSouza, 2017 (LP: Produtores de lipase).

Os isolados endofíticos foram multiplicados em meio de cultura TSA (Tryptic Soy Ágar). Alíquotas de 100µL da suspensão de armazenamento contendo células bacterianas

foram adicionadas a placas de Petri contendo meio TSA e mantidas a temperatura de 28° por 48 horas. Após esse período, adicionaram-se 5 mL de solução salina a 0,85% às colônias e, com auxílio de uma lâmina de vidro, as células bacterianas foram suspensas. Em seguida, a concentração desta suspensão foi estimada em espectrofotômetro a 1,0 de absorvância DO= 540 nm. O isolado 106 de *foc* foi multiplicado em meio BDA (Batata, Dextrose e Ágar). Um disco de 5 mm contendo a colônia fúngica foi adicionado a placas de Petri contendo meio de cultura BDA. Estas foram mantidas por sete dias em escuro contínuo a 25°C. Após esse período cada placa recebeu 20 mL de água destilada mais Tween e, com auxílio de uma lâmina de vidro as colônias foram colocadas em suspensão e esta foi calibrada em hemacitômetro para 1×10^5 esporos/mL.

Mudas micropropagadas de banana “Prata Catarina” em estágio de raiz nua foram aclimatizadas inicialmente em tubetes (20 cm^3) contendo substrato comercial esterilizado Bioplant® (Ponte Nova, Brasil) por 30 dias. Em seguida, foram transplantadas para sacolas plásticas ($67,5 \text{ cm}^3$) e permaneceram por mais 60 dias. Após esse período, as mudas foram transplantadas para vasos de 3 dm^3 contendo solo autoclavado a 120°C/20 minutos por 3 vezes. Aos 10 e 40 dias do transplântio para vasos, uma suspensão na concentração de 1×10^5 esporos/mL de *foc* foi adicionada a aproximadamente 5 cm do pseudocaulo de forma que a concentração final no solo atingisse $4,8 \times 10^3$ esporos/g de solo de *foc*. O tratamento testemunha absoluta recebeu o mesmo volume de água destilada.

As aplicações das suspensões bacterianas foram realizadas em intervalos consecutivos de 15 dias e no total cada planta recebeu 12 aplicações da suspensão bacteriana, seis antes da aplicação do *foc* (15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias após o início da aclimatização em tubetes e sacolas) e seis aplicações após a aplicação de *foc* (105, 120, 135, 150, 165 e 180 dias do transplântio para vasos). O volume de 20 mL da suspensão de bactéria foi distribuído na base do colo de cada planta. As duas testemunhas (T1: mudas sem *foc* e sem bactéria e T2: mudas

com *foc* e sem bactéria) receberam 20 mL de água destilada. O solo teve sua capacidade máxima de retenção de água determinada (Schuler et al., 2003) e o volume de água para molhamento das plantas foi ajustado de forma a manter o solo com 60% capacidade máxima de retenção de água (542 mL/dcm³). As adubações foram realizadas de acordo com análise de solo e necessidade da cultura.

Noventa dias após a inoculação de *foc* determinaram-se a incidência, a severidade da doença e o desenvolvimento das mudas. As plantas foram retiradas dos vasos, suas raízes lavadas com água corrente, identificadas e, o pseudocaule foi seccionado a 2 cm da inserção com rizoma sentido transversal para a avaliação de incidência. Para determinação da severidade foi utilizada a escala de Índice de Descoloração Rizoma (ISD) (Mak et al., 2012). Para isso, cada planta teve seu rizoma seccionado de forma longitudinal, com um ângulo de corte de aproximadamente de 30° a partir da altura do corte transversal realizado anteriormente, e atribuídas as notas de 1 a 8, conforme a descrição de Mak et al. (2012). Esse índice é calculado pela seguinte fórmula:

$$\text{ISD} = \frac{\sum (\text{nota na escala} * \text{número de plantas com essa nota})}{\text{total de plantas}}$$

O ISD é utilizado para classificar as reações de resistência dos genótipos como: resistente: ISD= 0 a 1, tolerante: ISD = 1,1 a 3, suscetível: ISD= 3,1 a 5 e altamente suscetível: ISD= 5,1 a 8. Para a determinação da incidência foi quantificado o número de plantas com sintomas dentro de cada tratamento e o cálculo de percentagem pela seguinte fórmula:

$$\text{Incidência de doença} = 100 * (\text{Plantas sintomáticas} / \text{Total de plantas})$$

Avaliação do Crescimento das mudas micropropagadas

Foram avaliadas as seguintes características: número de folhas fotossinteticamente ativas, altura da inserção da primeira folha com uma régua milimétrica, diâmetro do pseudocaule medido a 5 cm do solo da inserção com rizoma com auxílio de um paquímetro

digital, biomassa seca da raiz e da parte aérea com auxílio de uma balança com precisão de 4 casas decimais. A biomassa seca e fresca da raiz foi determinada em estufa de circulação forçada a 65°C até que as partes avaliadas atingissem peso constante. Foi realizado também o cálculo de incremento relativo para as seguintes variáveis: número de folhas, altura da inserção da primeira folha e diâmetro de pseudocaule pela seguinte fórmula:

$$\text{Incremento relativo (IR)} = \frac{\text{Crescimento total da planta inoculada} * 100}{\text{Crescimento total da planta testemunha } foc}$$

Delineamento experimental e Análise estatística

O experimento foi em blocos casualizados com 42 tratamentos (40 isolados endofíticos e duas testemunhas (T1: Testemunha absoluta: mudas de bananeira sem *foc* e sem bactéria e T2: mudas de bananeira com *foc* e sem bactéria) e cinco repetições, sendo que cada planta de bananeira constituía uma repetição. Para comparar os isolados endofíticos com as duas testemunhas, as médias foram submetidas ao teste de Dunnett a 5% de probabilidade ($p < 0,05$). Para avaliação da severidade da murcha de fusarium foi realizado o teste de Scott Knott a 5% de probabilidade ($p < 0,05$) e para a incidência e redução na expressão da doença foi calculado a frequência de ocorrência. Todas as análises estatísticas foram realizadas com auxílio do software “R” versão 3.4 (2015).

RESULTADOS

As mudas inoculadas apenas com *foc* e que não receberam aplicação da bactéria apresentaram completa descoloração do rizoma em 100% das plantas e notas máximas de severidade (Tabelas 2 e 3) As mudas de bananeira inoculadas com as bactérias: EB28, EB04, EB49, EB68, EB37, EB15, EB51, EB127, EB169 e EB136 não apresentaram nenhum sintoma de descoloração no rizoma (Tabela 3, Figura 1) e aquelas inoculadas com as bactérias EB26, COD-001, EB30 e EB24 apresentaram 20% e 60% de incidência da doença,

respectivamente. Os demais isolados bacterianos não reduziram a incidência da doença em relação a testemunha.

Tabela 2. Porcentagem de incidência de Murcha de fusarium em mudas de bananeira “Prata Catarina” inoculadas com diferentes isolados bacterianos endofíticos de bananeira.

Isolados	Incidência (%)
EB71, EB23, EB47, EB25, EB194, EB50, EB46, EB147, EB45, EB38, EB58, EB34, EB44, EB53, EB60, EB63, EB64, EB81, EB88, EB78, EB84, EB126, EB80, EB87, EB133, EB144, TESTEMUNHA- <i>foc</i>	100 ± 1,05
EB24	60 ± 1,16
EB26, COD-001, EB30	20 ± 0,57
EB28, EB04, EB49, EB68, EB37, EB15, EB51, EB127, EB169, EB136	0 ± 0,00

$$\pm \text{Desvio Padrão} = \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - MA)^2}}{n}$$

Tabela 3. Índice de Severidade da Doença (ISD) causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* em mudas de bananeira “Prata Catarina” inoculadas com diferentes isolados bacterianos endofíticos de bananeira.

Isolado	Índice de Severidade da Doença (ISD)
EB24, EB30, COD-001, EB26, EB04, EB127, EB136, EB15, EB169, EB28, EB37, EB49, EB51, EB60, EB68, EB46, EB126, EB50, EB133, EB194, EB23, EB25, EB71	0,52 ± 1,40 a
EB147, EB45, EB38, EB63, EB78, EB81, EB87, EB53, EB64, EB58, EB88	1,64 ± 2,24 b
EB144, EB84, EB80	2,68 ± 3,36 c
EB44, EB47, EB34	4,0 ± 4,16 d
TESTEMUNHA- <i>foc</i>	6,0 e
CV (%)	13,65

Médias seguidas da mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

Todos os isolados bacterianos testados reduziram significativamente a severidade da murcha de fusarium ($p < 0,05$). O grupo de isolados: EB24, EB30, E40, EB26, EB04, EB127,

EB136, EB15, EB169, EB28, EB37, EB49, EB51, EB60, EB68, EB46, EB126, EB50, EB133, EB194, EB23, EB25 e EB71 proporcionaram reduções superiores a 76% da murcha de fusarium em relação a testemunha (Tabela 4). Dentro deste grupo, estão inseridos os 10 isolados (EB28; EB04, EB49, EB68; EB37; EB15; EB51; EB127; EB169 e EB136) dos gêneros *Bacillus*, *Paenibacillus* e *Sporolactobacillus* que não apresentaram incidência de sintomas da doença (Figura 1). O grupo composto pelos isolados: EB147; EB45; EB38; EB63; EB78; EB81; EB87; EB 53; EB64; EB58; EB88; EB144; e EB84 reduziram de 62 a 72%.

Tabela 4. Porcentagem de redução da murcha de fusarium, em bananeira “Prata Catarina”, função da aplicação de isolados bacterianos.

Isolado	Porcentagem de redução da doença
EB71, EB25, EB23, EB194, EB133, EB50, EB126, EB46, EB68, EB60, EB51, EB49, EB37, EB28, EB169, EB15, EB136, EB127, EB04, EB26, COD-001, EB30, EB24	76,67+91,33 a
EB88, EB58, EB64, EB53, EB87, EB81, EB78, EB63, EB38, EB45, EB147	62,67 +72,67 b
EB80, EB84, EB144	44,00 +55,3 c
EB34, EB47, EB44	30,67 +33,33 d

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

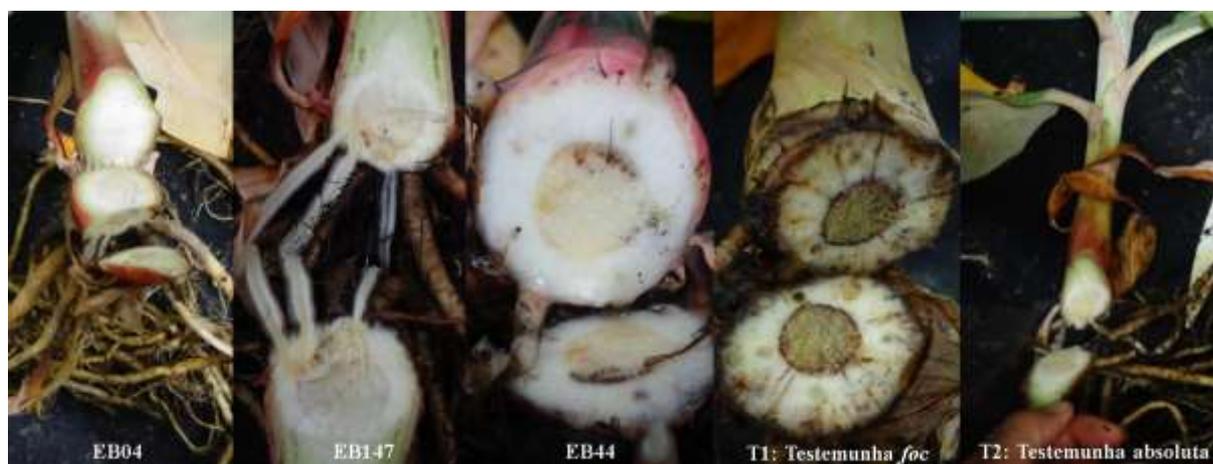


Figura 1. Níveis de severidade de murcha de fusarium em bananeira “Prata Catarina” inoculadas com diferentes bactérias endofíticas, em casa de vegetação, Janaúba, Brasil.

Houve aumento significativo da aplicação de isolados sobre todas as características morfológicas avaliadas ($p < 0,05$) na presença ou ausência de *foc*. Os efeitos foram mais pronunciados nas plantas tratadas com as bactérias e inoculadas com *foc*. Quando se compara a ação dos isolados em relação a testemunha inoculada com *foc* observa-se que todas as variáveis apresentaram incrementos na presença de um ou mais isolados. Houve aumento de aproximadamente 2 folhas nos tratamentos com a aplicação dos isolados EB25, EB37, EB64, EB127 e EB136 (Tabela 5).

Tabela 5. Avaliação do número de folhas, diâmetro, massa seca de parte aérea e raiz e altura de plantas de bananeira “Prata Catarina” inoculadas e não inoculadas com isolados endofíticos.

Isolado	Variáveis Agronômicas				
	Número de folhas	Diâmetro (cm)	Massa seca de raiz(g)	Massa seca de parte aérea(g)	Altura da planta (cm)
EB71	5,60 ^{ns}	2,42 ^a	17,60 ^{ab}	23,60 ^{ab}	28,30 ^{ns}
EB23	6,00 ^{ns}	2,83 ^a	19,00 ^{ab}	25,00 ^{ab}	32,10 ^a
EB28	6,40 ^{ns}	2,90 ^a	8,00 ^a	25,40 ^{ab}	32,50 ^a
EB47	5,60 ^{ns}	2,40 ^a	16,00 ^{ab}	15,80 ^a	30,60 ^{ns}
EB04	6,20 ^{ns}	2,85 ^a	15,00 ^{ab}	24,60 ^{ab}	29,70 ^{ns}
EB25	7,40 ^{ab}	2,85 ^a	19,40 ^{ab}	25,60 ^{ab}	29,60 ^{ns}
EB24	6,00 ^{ns}	2,87 ^a	6,20 ^{ns}	24,20 ^{ab}	33,60 ^a
EB26	6,60 ^a	2,83 ^a	16,00 ^{ab}	25,60 ^{ab}	35,40 ^{ab}
EB194	6,20 ^{ns}	2,87 ^a	7,00 ^{ns}	24,80 ^{ab}	32,70 ^a
EB50	5,80 ^{ns}	2,85 ^a	8,00 ^a	13,60 ^{ns}	28,90 ^{ns}
EB49	6,40 ^{ns}	2,81 ^a	15,60 ^{ab}	23,60 ^{ab}	30,40 ^{ns}
EB46	5,40 ^{ns}	2,25 ^a	5,40 ^{ns}	15,80 ^a	35,10 ^a
EB147	6,60 ^{ns}	2,84 ^a	17,80 ^{ab}	27,00 ^{ab}	36,50 ^{ab}
EB45	6,40 ^{ns}	2,83 ^a	5,20 ^{ns}	15,60 ^a	32,90 ^a
EB38	5,00 ^{ns}	2,32 ^a	5,40 ^{ns}	14,60 ^a	29,80 ^{ns}
EB68	6,00 ^{ns}	2,27 ^a	17,00 ^{ab}	24,80 ^{ab}	30,68 ^{ns}
EB37	7,00 ^{ab}	2,87 ^a	26,40 ^{ab}	26,60 ^{ab}	34,66 ^a
EB58	5,20 ^{ns}	2,46 ^a	6,20 ^{ns}	16,00 ^a	34,84 ^a
EB15	5,20 ^{ns}	2,60 ^a	4,80 ^{ns}	16,40 ^a	33,00 ^a
COD-001	5,00 ^{ns}	2,40 ^a	5,80 ^{ns}	15,40 ^a	29,98 ^{ns}
EB34	5,40 ^{ns}	2,33 ^a	4,40 ^{ns}	13,40 ^{ns}	28,28 ^{ns}
EB30	4,60 ^{ns}	2,79 ^a	6,80 ^{ns}	15,80 ^a	34,00 ^a
EB44	5,60 ^{ns}	2,67 ^a	7,40 ^a	16,20 ^a	34,20 ^a
EB53	5,20 ^{ns}	2,70 ^a	5,40 ^{ns}	14,60 ^a	32,40 ^a
EB51	4,40 ^{ns}	2,97 ^a	6,40 ^{ns}	16,40 ^a	30,00 ^{ns}
EB60	4,40 ^{ns}	2,52 ^a	6,60 ^{ns}	13,60 ^{ns}	27,60 ^{ns}
EB63	5,00 ^{ns}	2,80 ^a	5,00 ^{ns}	16,20 ^a	34,40 ^a
EB64	7,00 ^{ab}	2,78 ^a	5,80 ^{ns}	29,00 ^{ab}	36,80 ^{ab}
EB81	5,00 ^{ns}	2,66 ^a	6,40 ^{ns}	15,00 ^a	32,20 ^a
EB88	5,00 ^{ns}	2,81 ^a	7,40 ^a	16,40 ^a	29,80 ^{ns}
EB78	4,40 ^{ns}	2,54 ^a	6,60 ^{ns}	14,00 ^a	29,00 ^{ns}
EB84	4,60 ^{ns}	2,56 ^a	6,60 ^{ns}	15,80 ^a	32,40 ^a
EB126	4,60 ^{ns}	2,80 ^a	6,80 ^{ns}	17,00 ^a	32,60 ^a
EB127	6,80 ^{ab}	2,75 ^a	17,40 ^{ab}	28,20 ^{ab}	32,60 ^a
EB80	4,60 ^{ns}	2,90 ^a	6,80 ^{ns}	15,80 ^a	29,40 ^{ns}
EB87	5,00 ^{ns}	2,74 ^a	7,40 ^a	16,40 ^a	30,20 ^{ns}
EB169	4,60 ^{ns}	2,78 ^a	7,80 ^a	26,00 ^{ab}	33,60 ^a
EB133	5,60 ^{ns}	2,80 ^a	17,80 ^{ab}	23,60 ^{ab}	34,80 ^a
EB144	5,60 ^{ns}	2,56 ^a	5,80 ^{ns}	14,60 ^a	29,00 ^{ns}
EB136	6,60 ^a	2,72 ^a	24,60 ^{ab}	28,80 ^{ab}	27,60 ^{ns}
Testemunha -c/foc	4,80	1,61	2,60	9,20	22,68
Testemunha -s/foc	5,00	2,72	7,40	13,40	26,20

^{ns} não significativo pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade. ^a significativo pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade em relação a testemunha inoculada com *foc*. ^b significativo pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade em relação a testemunha absoluta.

Incrementos no número de folhas superiores a 122% foram verificados em 40% dos isolados utilizados (16 isolados) (Tabela 6). Todos os isolados apresentaram incremento de diâmetro do pseudocaule, em relação às plantas inoculadas apenas com *foc*, que variou de 140% a 191% com destaque para o isolado EB51 que foi o mais eficiente (Tabela 6). Maiores valores de incrementos foram observados para massa seca de raiz. Todos os 40 isolados testados, aumentaram esta variável, os incrementos observados foram da ordem de 178% para 1125% para o isolado EB34 e EB37, respectivamente (Tabela 6).

Da mesma forma, a massa seca de parte aérea foi evidenciada na presença da maioria dos isolados. Para esta variável os níveis de incremento proporcionados pelos isolados EB78 e EB34 foram de 150 % e 333%, respectivamente. A altura das plantas também foi aumentada pela presença da bactéria e valores entre 121 e 162% foram observados nos isolados EB136 e EB64 respectivamente (Tabela 6).

Tabela 6. Valores médios de incremento das variáveis agronômicas em função da testemunha inoculada com *foc* (T1) de bananeira “Prata Catarina” em função da aplicação de isolados bacterianos endofíticos e *F. oxysporum* f. sp. *cubense*.

Incremento das Variáveis Agronômicas					
Isolado	Número de Folhas	Diâmetro	Massa seca de raiz	Massa seca parte aérea	Altura de plantas
EB71	118,00b	154,18a	735,00b	266,45a	124,99b
EB23	125,00a	180,52a	781,67a	279,00a	142,27a
EB28	136,00a	184,78a	336,67c	282,80a	144,37a
EB47	117,00b	154,21a	665,00b	178,59b	135,16b
EB04	130,00a	181,87a	598,33b	278,46a	131,14b
EB25	156,00a	181,87a	808,33b	286,93a	130,89b
EB24	126,00a	183,06a	261,66c	270,16a	149,53a
EB26	140,00a	180,45a	665,00b	283,16a	157,21a
EB194	131,00a	182,09a	291,67c	279,61a	144,51a
EB50	122,00a	181,95a	341,67c	150,67a	127,78b
EB49	135,00a	179,10a	650,00b	263,54a	134,48b
EB46	113,00b	140,91a	223,33c	173,00b	156,07a
EB147	138,00a	181,16a	753,33b	302,22a	161,30a
EB45	135,00a	180,87a	203,33c	171,33b	146,42a
EB38	105,00b	147,07a	225,00c	160,84b	132,69b
EB68	127,00a	143,04a	685,00b	278,88a	136,38b
EB37	147,00a	183,36a	1125,00a	296,52a	153,14a
EB58	110,00b	155,94a	258,33c	178,07b	153,46a
EB15	107,00b	165,77a	200,00c	184,14b	146,40a
COD-001	105,00b	153,10a	248,33c	172,58b	132,40b
EB34	112,00b	149,16a	178,33c	150,15b	125,13b
EB30	96,00b	178,64a	265,00c	176,07b	149,98a
EB44	117,00b	170,14a	320,00c	180,63b	150,99a
EB53	109,00b	172,92a	223,33c	163,51b	142,62a
EB51	92,00b	191,55a	268,33c	182,90b	132,66b
EB60	92,00b	161,00a	265,00c	151,98b	121,99b
EB63	105,00b	178,71a	216,67c	179,01b	152,35a
EB64	147,00a	179,56a	235,00c	333,66a	162,60a
EB81	104,00b	168,53a	275,00c	164,79b	142,94a
EB88	106,00b	179,00a	313,33c	184,11b	132,21b
EB78	92,00b	160,69a	266,67c	156,46b	128,37b
EB84	97,00b	160,75a	260,00c	173,39b	143,93a
EB126	97,00b	177,12a	275,00c	189,96b	144,28a
EB127	144,00a	174,42a	718,33b	316,13a	144,07a
EB80	95,00b	182,83a	280,00c	176,36b	130,22b
EB87	105,00b	174,89a	301,67c	185,37b	133,81b
EB169	97,00b	176,60a	326,67c	293,98a	148,78a
EB133	116,00b	177,73a	738,33b	261,29a	154,62a
EB144	116,00b	162,04a	245,00c	161,03b	128,60b
EB136	138,00a	173,55a	998,33a	323,03a	121,71b
CV (%)	19,14	20,61	38,82	23,48	12,83

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

O desempenho de todas as variáveis observadas nos tratamentos co-inoculados (*foc*+ isolado testado) e comparados com a testemunha absoluta (tratadas apenas com água) foram também influenciadas pela presença do isolado testado (Tabela 6,7), entretanto os incrementos em relação a testemunha sem *foc* foi menor que naqueles obtidos na presença de *foc* (Tabela 7). Os valores de incremento no número de folhas foram de 83 a 110% nos isolados EB46 e EB51 respectivamente. O número de folhas teve incrementos de até 153% para o isolado EB25. Para massa de raiz os incrementos em relação a testemunha foram entre 60 a 354 %, observados para os isolados EB34 e EB37. Incrementos de 100% a 217% foram observados para massa seca de parte aérea nos isolados EB34 e EB64. Os incrementos da altura de plantas variaram de 106 a 142% para os isolados EB60 e EB64 (Tabela 7).

Tabela 7. Valores médios de incremento das variáveis agronômicas em função da testemunha absoluta (T2) de bananeira “Prata Catarina” e em função da aplicação de isolados bacterianos endofíticos.

Incremento das Variáveis Agronômicas					
Isolado	Número de Folhas	Diâmetro	Massa seca de raiz	Massa seca parte aérea	Altura de plantas
EB71	117,33b	89,54b	238,21b	178,79a	109,73b
EB23	122,33a	104,93a	258,57b	188,87a	123,66a
EB28	135,00a	107,42a	108,21c	190,67a	125,42a
EB47	115,00b	89,05b	218,21b	120,02b	118,70b
EB04	127,33a	105,54a	206,07b	186,84a	114,58b
EB25	153,00a	105,64a	263,96b	194,00a	113,60b
EB24	124,00a	106,25a	83,57c	181,97a	129,23a
EB26	139,67a	105,04a	217,50b	193,41a	135,22a
EB194	129,00a	106,36a	95,00c	186,79a	126,84a
EB50	119,67a	105,56a	108,57c	101,87b	111,55b
EB49	132,33a	104,22a	211,42b	177,84a	117,72b
EB46	110,67b	83,03b	73,92c	117,46b	136,25a
EB147	136,33a	105,14a	240,71b	203,58a	141,98a
EB45	133,67a	104,70a	71,42c	116,53b	127,26a
EB38	103,33b	85,72b	75,57c	108,41b	114,15b
EB68	125,33a	83,93b	231,78b	186,71a	119,17b
EB37	146,33a	106,39a	354,28a	198,74a	133,23a
EB58	107,33b	91,36b	83,92c	120,30b	133,84a
EB15	105,67b	96,52b	65,35c	123,43b	126,79a
COD-001	103,33b	88,63b	78,57c	116,00b	115,37b
EB34	110,67b	86,25b	60,00c	100,92b	110,00b
EB30	95,00b	103,43a	93,57c	119,30b	130,34a
EB44	115,67b	98,92a	99,28c	121,28b	131,52a
EB53	108,33b	100,02a	73,57c	110,53b	125,36a
EB51	91,67b	110,01a	87,14c	122,15b	115,67b
EB60	91,00b	94,01b	90,35c	102,07b	106,34b
EB63	103,33b	104,08a	67,50c	122,94b	132,73a
EB64	143,00a	103,62a	79,64c	217,38a	142,32a
EB81	102,33b	98,21a	86,07c	113,00b	123,90a
EB88	104,00b	103,66a	100,00c	123,79b	115,28b
EB78	90,67b	93,83b	90,35c	105,12b	112,77b
EB84	97,67b	94,81b	90,71c	118,35b	124,20a
EB126	93,33b	103,81a	92,14c	127,33b	126,58a
EB127	141,33a	101,84a	236,07b	212,61a	125,95a
EB80	91,67b	106,74a	92,85c	117,61b	113,53b
EB87	101,67b	101,28a	100,71c	124,33b	116,38b
EB169	96,67b	103,40a	106,07c	196,00a	198,97a
EB133	112,33b	102,80a	242,14b	176,84a	135,03a
EB144	115,67b	94,87b	78,21c	109,20b	112,02b
EB136	134,00a	101,06a	335,00a	217,28a	107,45b
CV (%)	25,73	11,90	23,33	16,45	14,85

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

DISCUSSÃO

Todos os isolados aplicados ao solo cultivado com plantas de bananeira reduziram em diferentes níveis de severidade a murcha de fusarium, e 25% dos isolados não permitiram a ocorrência da doença. As bactérias antagonistas podem controlar fitopatógenos por meio da competição por nichos ecológicos e nutrientes (Fishal et al., 2010), produção de metabólitos secundários que agem diretamente em estruturas do fitopatógeno (Raza et al., 2013), promoção de crescimento mudando a fisiologia da planta (Karthik et al., 2017), assim como pela indução de resistência a doenças (Hardoim et al., 2015).

Neste experimento, as plantas de bananeira receberam aplicação de bactérias antes e após a inoculação do fungo. Assim, os efeitos observados na redução do desenvolvimento da doença podem ter sido resultado de um efeito direto sobre os processos de pré-infecção ou pós-infecção. Trabalhos prévios demonstraram o efeito de antibiose destes (EB37, EB127) em reduzir a germinação, esporulação e crescimento micelial de *foc* (dados não publicados). A aplicação do isolados endofíticos em pré e pós-aplicação de *foc* sugere que antibióticos e compostos voláteis possam ter causado redução dos processos de infecção antes mesmo da interação se estabelecer.

As aplicações destes isolados antes da introdução do patógeno no sistema rizosfera x bactéria x *foc*, podem ter contribuído para o estabelecimento destas bactérias principalmente, nas condições controladas do experimento. O solo esterilizado pode ter reduzido a pressão antagônica da microflora autóctone naturalmente presente no solo. Uma vez estabelecidos na rizosfera podem ter atuado diretamente sobre o fungo reduzindo germinação, causando lise de células ou formando biofilmes no rizoplano, o que poderia levar a redução do reconhecimento de *foc* por seu hospedeiro e, e conseqüentemente uma redução da penetração e estabelecimento de infecção (Gao et al., 2015).

Neste estudo, aproximadamente 80% dos isolados que reduziram a doença são do gênero *Bacillus*. Este efeito de redução da murcha de fusarium já havia sido também relatado por Ribeiro et al. (2012) em bananeira “Prata-Anã” quando inoculadas com *Bacillus* spp. Este gênero tem sido descrito como potencial agente de controle biológico para fitopatógenos como *foc* e *Meloidogyne javanica* (Thangavelu; Mustaffa, 2012; Ribeiro et al., 2012). Essas cepas podem produzir uma ampla gama de compostos antifúngicos como subtilina, subtilosina, bacilisa e algumas enzimas que podem degradar a parede celular dos fungos. Além disso, alguns mecanismos antagonistas de espécies de *Bacillus* envolvem competição por nutrientes e espaço, indução de resistência de plantas (Shafi et al., 2017).

A redução da severidade da doença observada no rizoma pode ainda ser resultado de uma interação de um ou mais mecanismo atuando conjuntamente no sistema rizosfera de banana x bactéria endofítica x *foc*. A possibilidade destas bactérias em induzir resistência deve ser investigada, pois no presente estudo, a aplicação de bactérias foi realizada nos 60 dias anteriores a inoculação de *foc*, e neste caso poderia ter havido a ativação deste mecanismo e/ou atuando conjuntamente como os mecanismos de antibiose.

Os microrganismos endofíticos podem induzir as plantas à resistência sistêmica e as bactérias do gênero *Bacillus* são mais comumente associadas esse processo (ZAMIOUDIS e PIETERSE, 2012). Em muitos casos a elicitação da resistência sistêmica por espécies de *Bacillus* endofíticos está associada ao aumento do crescimento das plantas (Qiao et al., 2017). Neste estudo, 80% dos isolados que reduziram a doença são do gênero *Bacillus* spp. e destes, pelo menos 80% dobraram a massa seca de raiz e 43,75% parte aérea. No caso de EB37 houve um aumento de 1125% de massa de raiz.

Outros estudos demonstraram atributos importantes destes isolados que podem explicar o desenvolvimento das mudas, como solubilização de fosfato, fixação de nitrogênio e ácido indol acético (Andrade et al., 2014; Matos et al., 2017). Os resultados do presente

estudos e diversos outros já publicados (Khan et al., 2016) demonstram a importância desses isolados endofíticos como potenciais promotores de crescimento da bananeira e, como agentes potenciais para biocontrole de *foc*. A utilização de microrganismos com tais características pode melhorar a convivência com *foc* no campo.

De todos os isolados testados, o EB37 do gênero *Bacillus*, foi capaz de controlar significativamente o *foc*, sem qualquer sintoma visual de murcha, com reduções de 83% da doença. Nas avaliações de crescimento das mudas, o isolado incrementou significativamente o de número de folhas, diâmetro, massa seca raiz e parte aérea e altura de plantas em relação a testemunha *foc*.

Diante dos resultados promissores obtidos, outros estudos devem ser realizados buscando viabilizar a utilização destes isolados em condição de campo, como meios de multiplicação, doses e épocas de aplicação. Além de estudos que comprovem de fato quais são as moléculas e mecanismos envolvidos em todo o processo de biocontrole.

CONCLUSÕES

As plantas tratadas com os isolados EB28, EB04, EB49, EB68, EB37, EB15, EB51, EB127, EB169, EB136 não apresentaram incidência da Murcha de fusarium e todos os isolados reduziram a severidade da murcha de fusarium em mudas micropropagadas de bananeira “Prata Catarina”. O isolado EB37 incrementa em maior número a massa seca da raiz de bananeira “Prata- Catarina”.

AGRADECIMENTOS

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de pós-graduação código de financiamento 001. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- AMAH, D. et al. Recent advances in banana (*Musa* spp.) biofortification to alleviate vitamin A deficiency. **Food Science and Nutrition**, 71(4):1- 40, 2018.
- ANDRADE, L. F. et al. Analysis of the abilities of endophytic bacteria associated with banana tree roots to promote plant growth. **Journal of Microbiology**, 52(1): 27-34, 2014.
- DONG, X. et al. Fusaric acid accelerates the senescence of leaf in banana when infected by *Fusarium*. **World Journal Microbiology Biotechnology**, 30(2): 399-408, 2014.
- ETMINANI, F.; HARIGHI, B. Isolation and identification of endophytic bacteria with plant growth promoting activity and control potential from wild pistachio trees faegheh etminani and behrouz harighi. **Plant Pathology Journal**, 34(3): 208-217, 2018.
- FAO. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Disponível em: < <http://www.fao.org/faostat/en/> >. Acesso em: 13 de janeiro, 2018.
- FISCHAL, E. M.M.; MEON, S.; YUN, W. M. Induction of Tolerance to *Fusarium* wilt and defense-related mechanisms in the plantlets of susceptible berangan banana pre-inoculated with *Pseudomonas* sp. (UPMP3) and *Burkholderia* sp. (UPMB3). **Agricultural Sciences in China**, 9(8): 1140-1149, 2010.
- GAO, T. et al. Alternative modes of biofilm formation by plant-associated *Bacillus cereus*. **Microrbiology Open**, 4(3):452-464, 2015.
- GHAG, S.B.; SHEKHAWAT, U.K.S.; GANAPATHI, T.R. *Fusarium* wilt of banana: biology, epidemiology and management. **Peste Articles & News Summaries**, 61(3): 250-263, 2015.
- GOMES, I. P. et al. Auxin production by endophytic bacteria isolated from banana trees. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 60(10):1-12, 2017.
- HARDOIM, P. R. et al. The Hidden World within Plants: Ecological and evolutionary considerations for refining functioning of microbial endophytes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 79(3) 293-320, 2015.
- KARTHIK, M. et al. Endophytic bacteria associated with banana cultivars and their inoculation effect on plant growth. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, 92(2): 568-576, 2017.
- KHAN, A. L. et al. Indole acetic acid and ACC deaminase from endophytic bacteria improves the growth of *Solanum lycopersicum*. **Electronic Journal of Biotechnology**, 21(4): 58-64, 2016.
- LI, C. et al. Direct root penetration and rhizome vascular colonization by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* are the key steps in the successful infection of Brazil Cavendish. **Plant Disease**, 101(12): 2073-2078, 2017.
- LICHTEMBERG, L.A.; LICHTEMBERG, P. S. F. Avanços na bananicultura Brasileira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 33(1): 29-36, 2011.

MATOS, A.D.M. et al. Phosphate solubilization by endophytic bacteria isolated from banana trees. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 89(4): 2945-2954, 2017.

MOHAMED, A.; MAK, A.; LIEW, K. W.; HO, Y. W. Early evaluation of banana plants at nursery stage for fusarium wilt tolerance. **FAO Corporate Document Repository**, p. 1-7, 2012.

PLOETZ, R.C. Fusarium wilt of banana. **Phytopathology**, 105(12):1512-1521, 2015.

QIAO, J. et al. Addition of plant-growth-promoting *Bacillus subtilis* PTS-394 on tomato rhizosphere has no durable impact on composition of root microbiome. **BMC Microbiology**, 17(131): 1-12, 2017.

R CORE TEAM (2015). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

RAZA, W. et al. Volatile and nonvolatile antifungal compounds produced by *Trichoderma harzianum* SQR-T037 suppressed the growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*. **Science Letters**, 1(1): 21-24, 2013.

RIBEIRO, R. C. F. et al. Rizobactérias no controle de *Meloidogyne javanica* e mal do Panamá. **Nematropica**, 42(2): 218-226, 2012.

SCHULER, A. et al. Propriedades Físicas dos Solos na Parametrização de um Modelo Hidrológico. **Revista Brasileira de Recursos Hídricos**, 8(1): 61-70, 2003.

SEETHAPATHY, P. et al. Bacterial antagonists and hexanal-induced systemic resistance of mango fruits against *Lasiodiplodia theobromae* causing stem-end rot. **Journal of Plant Interactions**, 11(1):158-166, 2016.

SHAFI, J. et al. *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens: a review. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, 31(3): 446–459, 2017.

SOUZA, S. A. et al. Endophytic bacterial diversity in banana ‘Prata Anã’ (*Musa* spp.) roots. **Genetics and Molecular Biology**, 36(2): 252-264, 2013.

THANGAVELU, R.; MUSTAFFA, M. M. Current advances in the Fusarium wilt disease management in banana with emphasis on biological control. **Plant Pathology**, 35(2): 273-298, 2012.

WANG, B. et al. *Bacillus amyloliquefaciens* strain W19 can promote growth and yield and suppress *Fusarium* wilt in banana under greenhouse and field conditions. **Pedosphere**, 26(5): 733-744, 2016.

ZAMIOUDIS, C.; PIETERSE, C. M. J. Modulation of host immunity by beneficial microbes. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, 25(2): 39-150, 2012.