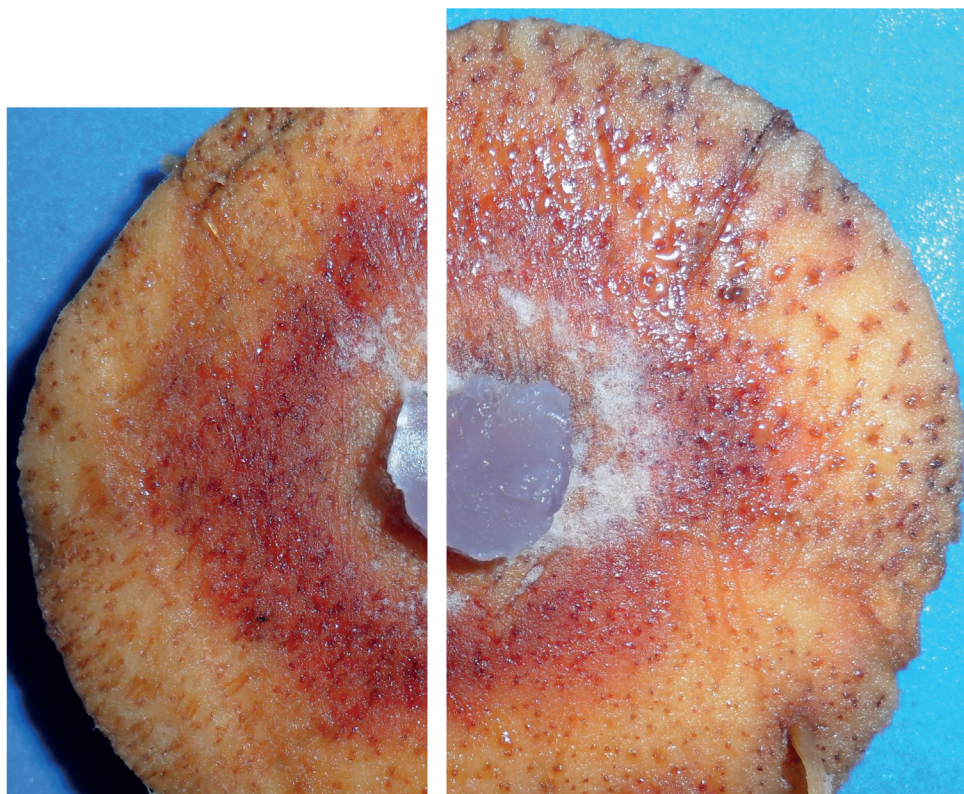


Bioensaio em discos de rizomas de bananeiras
para a seleção de bactérias antagonistas
a *Fusarium oxysporum* f. sp. *cabense*



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Mandioca e Fruticultura
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

**BOLETIM DE PESQUISA
E DESENVOLVIMENTO
114**

Bioensaio em discos de rizomas de bananeiras
para a seleção de bactérias antagonistas
a *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*

*Liliane Santana Luquine
Luciano Ricardo Braga Pinheiro
Saulo Alves Santos de Oliveira
Harllen Sandro Alves Silva*

Embrapa Mandioca e Fruticultura
Cruz das Almas, BA
2020

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Mandioca e Fruticultura
Rua Embrapa, s/nº, Caixa Postal 07
44380-000, Cruz das Almas, Bahia
Fone: 75 3312-8048
Fax: 75 3312-8097
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações
da Embrapa Mandioca e Fruticultura

Presidente
Francisco Ferraz Laranjeira

Secretário-Executivo
Lucidalva Ribeiro Gonçalves Pinheiro

Membros
Aldo Vilar Trindade, Ana Lúcia Borges, Eliseth de Souza Viana, Fabiana Fumi Cerqueira Sasaki, Harllen Sandro Alves Silva, Leandro de Souza Rocha, Marcela Silva Nascimento

Supervisão editorial
Francisco Ferraz Laranjeira

Revisão de texto
Adriana Villar Tullio Marinho

Normalização bibliográfica
Lucidalva Ribeiro Gonçalves Pinheiro

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
Anapaula Rosário Lopes

Foto da capa
Liliane Santana Luquine

1ª edição
On-line (2020).

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Mandioca e Fruticultura

Bioensaio em discos de rizomas de bananeiras para a seleção de bactérias antagonistas a *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. / Liliane Santana Luquine... [et. al.]. Cruz das Almas, BA : Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2020.

20 p.: il. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Mandioca e Fruticultura, ISSN 1809-5003, 114)

1. Banana 2. Doença de Planta 3. Melhoramento vegetal I. Liliane Santana Luquine II. Pinheiro, Luciano Ricardo Braga III. Oliveira, Saulo Alves Santos de IV. Silva; Harllen Sandro Alves V. Título. VI. Série.

CDD 634.772

© Embrapa, 2020

Sumário

Resumo	5
Abstract	6
Introdução.....	7
Material e Métodos	9
Resultados e Discussão	11
Conclusões.....	18
Referências	18

Bioensaio em discos de rizomas de bananeiras para a seleção de bactérias antagonistas a *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*

Liliane Santana Luquine¹

Luciano Ricardo Braga Pinheiro²

Saulo Alves Santos de Oliveira³

Harllen Sandro Alves Silva⁴

Resumo – O emprego de órgãos vegetais destacados, é uma alternativa aos testes in vitro para seleção de agentes de biocontrole. O emprego de escalas, para quantificação de área lesionada, pode gerar resultados inconsistentes. Bactérias rizosféricas e endofíticas, foram selecionadas como inibidoras do crescimento de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, agente causal do mal-do-Panamá. Discos de rizoma, foram tratados com 200 µL de suspensão dos antagonistas (10^9 UFC mL⁻¹) e inoculados com patógeno. O material foi disposto em caixas tipo gerbox e incubado em BOD a 25 °C, por doze dias. Após, a área dos discos de rizoma, colonizada por Foc, foi quantificada por meio de imagens digitais. Discos não tratados e inoculados, compuseram o controle. Verificou-se a eficiência do método na seleção de agentes de biocontrole, uma vez que foi possível o agrupamento dos 26 isolados, utilizados em cinco clústeres distintos, sendo que, isolados pertencentes a quatro destes grupos (do '1' a '4'), foram capazes de proporcionar a redução da colonização por Foc. Os isolados com maior potencial de inibição foram 520EB, 993EB e 531EB com 343,3 mm², 344,1 mm², 364,8 mm², respectivamente, promovendo inibição variando de 53% a 56% da área colonizada, quando comparados com ao controle (782,6 mm²).

Termos para indexação: Mal-do-Panamá, *Musa* spp., controle biológico.

¹ Engenheira-agrônoma, doutora em Biotecnologia, produtora rural, Cruz das Almas, BA.

² Biólogo, doutor em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva, analista da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA.

³ Engenheiro-agrônomo, doutor em Fitopatologia, pesquisador da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA.

⁴ Engenheiro-agrônomo, doutor em Fitopatologia, pesquisador da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA.

Bioassay on banana rhizome discs for selecting bacteria antagonistic to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*

Abstract – Detached plant organs are alternative materials to *in vitro* tests for selecting biocontrol agents. On the other hand, the use of scales to quantify injured areas can generate inconsistent results. Rhizospheric and endophytic bacteria were selected as growth inhibitors of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, the causal agent of Panama disease of banana. For this, rhizome discs were treated with 200 μL of antagonist suspension (10^9 CFU mL^{-1}) and inoculated with the pathogen. The material was placed in plastic gerbox boxes and incubated in BOD at 25 °C for 12 days. Afterward, the area of rhizome discs colonized by Foc was quantified by digital images. The control consisted of untreated and inoculated discs. The results showed the efficiency of this method in selecting the biological control agent, as the 26 isolates were grouped into five different clusters, with isolates belonging to four of these groups (from '1' to '4') being able to reduce Foc colonization. Isolates 520EB, 993EB, and 531EB had the highest potential for inhibition, with areas of 343.3, 344.1, 364.8 mm^2 , respectively, promoting inhibition ranging from 53 to 56% of the colonized area compared to the control (782.6 mm^2).

Index terms: Panama disease, *Musa* spp., biological control.

Introdução

A banana é uma das frutas mais consumidas e mais produzidas no Brasil, colocando o país em quinto lugar entre os principais produtores mundiais (FAO, 2018). No entanto, a produção de banana pode ser comprometida devido a um grande número de fitomoléstias, dentre as quais se destaca o mal-do-Panamá ou murcha de *Fusarium*, causado pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (E. F. Smith). Considerada uma das mais destrutivas, a doença provoca perdas elevadas, sendo fator limitante ao cultivo de variedades apreciadas pelo mercado, como é o caso da banana 'Maçã' (Cordeiro et al., 2004).

A principal estratégia para o controle do mal-do-Panamá, inclui o uso de variedades resistentes ou tolerantes, como as BRS Princesa e BRS Platina, lançadas pela Embrapa. Até o momento não existe controle químico. Todavia, o melhoramento genético em bananeira pode ser considerado complexo e demorado, devido às características da cultura, mesmo com as ferramentas de biotecnologia molecular disponíveis. Ainda, a nova variedade lançada pode carecer de aceitação de mercado, tanto para produtor como para o consumidor. Desta forma, medidas alternativas, como o uso de agentes de controle biológico, têm sido estudadas no sentido de minimizar as perdas provocadas pela doença, inclusive com testes a campo.

Um grande número de estudos com microrganismos benéficos, como as rizobactérias e bactérias endofíticas, têm sido realizados com a intenção de melhorar o desempenho de mudas no campo, e que podem ser empregadas para o incremento da produção agrícola, como promotoras do crescimento de plantas e como agentes de biocontrole de doenças.

Lian et al. (2009), observaram que bactérias endofíticas, isoladas de bananeiras sadias, reduziram em 67% os sintomas do mal-do-Panamá e promoveram crescimento de mudas micropropagadas. Idris et al. (2007), utilizaram rizobactérias para o controle da podridão da raiz em sorgo, incitada por *Fusarium oxysporum*, via tratamento do solo. Benchimol et al. (2000), avaliaram o efeito de bactérias endofíticas, isoladas de plântulas de pimentado-reino, na redução da mortalidade causada por fusariose, enfermidade provocada pelo fungo *Fusarium solani*, e detectaram que a espécie *Methylobacterium radiotolerans* controlou o patógeno, causando redução significativa do número de plantas mortas.

Segundo Chen et al. (1996), estimam-se que em torno de 2% dos microrganismos cultiváveis proporcionem algum efeito benéfico, associado a vegetais. Partindo desse pressuposto, a busca por antagonistas a fitopatógenos deve se iniciar com um número expressivo de isolados, de modo a aumentar as chances de sucesso, após a etapa de seleção.

A seleção de potenciais agentes de biocontrole, geralmente é realizada a partir de centenas de isolados, de forma relativamente simplificada, por meio de ensaios *in vitro*, em condições que favoreçam o antagonista (Zheng et al., 2011; Silva et al., 2012). Embora essa técnica permita identificar antagonistas que inibam o crescimento do patógeno, pela produção de compostos antimicrobianos ou hiperparasitismo, outros mecanismos de biocontrole, como a competição e indução de resistência sistêmica, podem ser subestimados (Knudsen et al., 1997).

Ainda, fatores ecológicos relacionados ao antagonista, são negligenciados, como a capacidade de sobrevivência em diferentes condições de umidade, temperatura, tipo de solo, e outros que podem afetar o desempenho do agente de biocontrole (Fravel, 2005).

A não reprodutibilidade, em campo, dos resultados obtidos a partir de ensaios em laboratório, considerando esses fatores, foi relatada por diversos autores, destacando que o processo de seleção em condições de laboratório, ignorando as interações com a espécie vegetal, bem como as flutuações ambientais a que o microrganismo estará exposto, muitas vezes superestima o desempenho do antagonista (Szandala; Backhouse, 2001; Fiddaman et al., 2005; Rajkumar et al., 2005; Spadaro; Gullino, 2005; Eljounaidi et al., 2016).

Por outro lado, a utilização de métodos de seleção em campo, ou mesmo em casa de vegetação, onde os fatores relacionados ao ambiente natural de cultivo estão cobertos em maior grau, pode ser inviável, do ponto de vista operacional e econômico, pela demanda por espaço e mão de obra, quando se pensa em um grande número de isolados. Essa limitação é especialmente decisiva quando se trata de culturas perenes.

A maior atenção dispensada, nas últimas duas décadas, aos fatores ecológicos envolvidos nas interações antagonistas-patógenos-hospedeiros, aliada ao estudo dos mecanismos de biocontrole, tem acarretado mudanças nos processos de seleção de agentes de controle biológico. Assim, para suplantar as dificuldades já relatadas para trabalhar com plantas em seleção de antagonistas, o uso de tecidos vegetais, destacados, tem sido uma técnica

amplamente empregada. Em vários estudos, pode-se verificar, por exemplo, o emprego de discos de folhas, folhas destacadas e discos de pétalas (Fiddaman et al., 2005; Burmeister; Hau, 2009; Shiomi et al., 2006; Rajkumar et al., 2005; Silva et al., 2012; Zhang et al., 2017).

Considerando que *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* infecta áreas vascularizadas do rizoma de bananeiras (Ploetz, 2015), a utilização destes tecidos, como técnica auxiliar para a seleção de antagonistas ao patógeno, é uma hipótese a ser testada, em suporte a um programa de biocontrole do mal-do-Panamá. Dessa forma, definir um método para a inoculação de *F. oxysporum* f. sp. *ubense*, e avaliar o antagonismo de bactérias selecionadas em ensaios in vitro ao patógeno, em discos de rizoma de bananeira, foram os objetivos do trabalho.

Material e Métodos

No primeiro ensaio, rizomas originados de plantas de bananeira, com um ano de cultivo, das variedades 'Maçã' e 'Prata Anã', apresentando bom aspecto fitossanitário, cultivadas sob condições de campo, foram descorticados e cortados em discos de 7 cm de diâmetro e 1 cm de espessura. Foram então submetidos a tratamento com álcool (50%) por 1 minuto, seguido de hipoclorito de sódio (2%) por 1 minuto, e três lavagens com água destilada esterilizada. Os discos desinfestados, foram colocados em caixas plásticas (11 cm x 11 cm x 3,5 cm), contendo papel de filtro umedecido com água esterilizada. No segundo ensaio, apenas discos da variedade 'Maçã' foram utilizados. *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* (Foc), raça 1, foi isolado de bananeiras sintomáticas e empregado nos ensaios.

Em discos de rizoma de bananeira, das variedades 'Maçã' e 'Prata Anã', foram avaliados dois métodos de inoculação do patógeno, por suspensão de conídios e por discos de micélio. A partir de colônias de Foc, com 10 dias de crescimento, em meio batata dextrose agar (BDA), a 25 °C sob luz fluorescente, foram obtidos os propágulos, do patógeno, empregados no ensaio. Em condições de assepsia, discos de micélio com 0,7 cm de diâmetro foram depositados no centro dos discos de rizoma. A suspensão de conídios, obtida, foi ajustada para 10^4 conídios mL⁻¹, aplicando-se um volume de 200 µL em cada disco de rizoma.

O ensaio foi instalado no delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 2 (métodos de inoculação x variedades), com 10 repetições por tratamento, um disco por repetição. Compuseram o controle, discos de rizoma, onde foram aplicados água destilada esterilizada, e um disco de meio de cultura sem crescimento fúngico. Após 10 dias, a 25 °C, os discos de rizoma foram avaliados quanto à área colonizada pelo patógeno. Os discos foram fotografados com câmera digital e a área colonizada, mensurada, com o auxílio do software ImageTool v.3.0 (UTHSCSA, University of Texas Health Science Center, San Antonio). Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste F a 5%, empregando-se o programa estatístico SISVAR.

De acordo com o método de inoculação selecionado no primeiro ensaio, levando-se em conta aquele em que a maior área colonizada pelo patógeno foi constatada de forma significativa, e a variedade, avaliou-se a inibição da colonização de *Foc*, em discos de rizoma de bananeira, tratados com bactérias antagonistas.

Neste ensaio, foram avaliados 26 isolados bacterianos, dentre rizobactérias e bactérias endofíticas, provenientes de amostras de solo rizosférico e tecido vegetal de bananeiras, respectivamente, pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma, da Embrapa Mandioca e Fruticultura, selecionadas em testes *in vitro* por Luquine (2012); quanto à capacidade de inibir o crescimento de *Foc* pela produção de compostos antimicrobianos, difusíveis em meio de cultura; compostos antimicrobianos voláteis, e quitinase (Romeiro, 2007; Bharat et al., 1980; Renwick et al., 1991).

Todo o procedimento foi realizado em câmara de fluxo laminar. Inicialmente, no centro dos discos, foram aplicados 200 µL de suspensão bacteriana, preparada a partir de colônias com 24h de crescimento a 25 °C em meio nutriente ágar, em água destilada esterilizada. A concentração de cada suspensão, foi ajustada para $OD_{540}=0,5$, o que correspondia a 10^9 UFC mL⁻¹. Após 48 horas da aplicação dos isolados bacterianos, realizou-se a inoculação depositando-se no centro de cada disco de rizoma um disco de micélio de *Foc*, com esporos (0,7 cm de diâmetro), obtido de cultura mantida a 25 °C, por 10 dias.

O ensaio foi instalado no delineamento experimental inteiramente casualizado, com quatro repetições por antagonista, sendo que cada repetição

foi composta por três discos. Como controles, utilizaram-se discos de rizoma, não tratados e não inoculados, e discos de rizoma inoculados apenas com Foc. Os discos foram mantidos em BOD, com fotofase de 12 horas, a 25 °C. Observações diárias foram realizadas para verificar o crescimento micelial e a presença de lesões nos discos de rizomas.

Após 12 dias, os discos foram fotografados e avaliados, conforme descrito para o primeiro ensaio. Os dados foram submetidos à análise de variância e o agrupamento hierárquico das médias pelo método de Ward com base na distância Euclidiana entre as amostras. Visando a comparação entre as bactérias, análises de box-plot foram realizadas com base na origem das bactérias (endofíticas ou rizosféricas) e nos mecanismos de biocontrole previamente avaliados por Luquine (2012), possivelmente envolvidos na interação com Foc. As análises foram realizadas com o auxílio do programa estatístico R (R Core Team, 2017).

Resultados e Discussão

Verificou-se que a inoculação de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* (Foc), por meio de discos de micélio em discos de rizoma, apresentou melhor desempenho do ponto de vista de colonização do substrato, quando comparado ao método via suspensão de conídios, na variedade 'Maçã' (Tabela 1). Embora tenha havido colonização do patógeno no disco de rizoma, não se verificou diferença entre os métodos de inoculação na variedade 'Prata Anã'. Não houve crescimento fúngico nos discos de rizoma não inoculados.

Tabela 1. Colonização de discos de rizoma de bananeira, por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense*, inoculados via suspensão de conídios e discos de micélio, 10 dias após a inoculação.

Cultivar	Tratamentos	
	Discos de micélio ^a	Suspensão de conídios
Prata Anã	1231,6 aB ^b	972,4 aA
Maçã	1544,4 aA	1070,5 bA
CV (%) ^c	17,89	

^aÁrea colonizada em mm²;

^bMédias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna, e minúscula na linha, não diferem significativamente pelo Teste F a 5 % de probabilidade;

^cCoefficiente de variação.

Há que se levar em conta a diferença entre as estruturas fúngicas, avaliadas no ensaio, bem como o tecido vegetal utilizado, para se tentar explicar o resultado obtido. Inicialmente, tratando do patógeno, os conídios de *Foc* são estruturas reprodutivas que requerem condições ambientais e nutricionais favoráveis para que ocorra sua germinação, assim como macroconídios e clamidósporos (Beyer et al., 2004). Ainda que os discos de rizoma tenham sido mantidos em condições de alta umidade e temperatura ideal para *Foc*, a possível escassez de nutrientes, disponíveis no tecido vegetal, pode ter afetado de forma significativa a indução da germinação dos conídios. Uma vez havendo menor número de conídios germinados, conseqüentemente se constata uma menor presença de estruturas infectivas do patógeno e, por conseguinte, menor área colonizada, quando comparado ao tratamento com discos de micélio.

Verificou-se interação significativa entre as cultivares e os métodos de inoculação. Quando utilizado o método com discos miceliais, a área colonizada foi maior na cv. 'Maçã'. Esse resultado era esperado, em virtude de ser, esta variedade, altamente suscetível ao patógeno, em comparação à 'Prata Anã', considerada moderadamente suscetível. Por outro lado, quando se utilizou a cv. 'Prata Anã', não se verificou diferença nas áreas colonizadas pelos dois métodos de inoculação.

Segundo Beckman (2015), *Foc* infecta as raízes de cultivares de bananeiras, suscetíveis e resistentes, porém a colonização do sistema vascular, no rizoma, é mais evidente em suscetíveis. Essa colocação vem de encontro aos resultados do ensaio com discos de micélio, em que, mesmo em contato direto do patógeno com o tecido vegetal, totalmente desprotegido de barreiras naturais, verificou-se uma menor colonização do rizoma na variedade 'Prata Anã', moderadamente suscetível.

Em se tratando dos discos de micélio, além da estrutura fúngica, já formada sobre o rizoma, os nutrientes contidos nos discos de cultivo, que acompanhavam as colônias, podem ter garantido uma sobrevivência ao fungo, fornecendo melhores condições ao patógeno para que se estabelecesse no tecido da planta. Ainda que possivelmente afetado pelos efeitos da ação dos compostos fenólicos e oxidação do tecido, a presença de um micélio fúngico, e sua capacidade de penetração ativa nos tecidos, conforme resultados apresentados dão subsídio para uma maior probabilidade de sucesso

quando da inoculação de Foc por meio de discos de micélio, em discos de rizoma de bananeira.

Diante do exposto, a escolha do método de inoculação de Foc em discos de rizoma de bananeira, por meio de discos de micélio, foi eficaz quanto a possibilitar a infecção e colonização do tecido vegetal pelo patógeno, permitindo a visualização e quantificação de sintomas. Aliado à facilidade operacional de se trabalhar com discos de micélio, em vez de suspensão de conídios, o método foi empregado no ensaio posterior. Portanto, é proposto que este método de inoculação seja adotado, independente da variedade de bananeira utilizada, embora o grau de suscetibilidade ao patógeno deva ser levado em consideração.

Com base na inibição da colonização de Foc em discos de rizoma tratados com bactérias antagonistas, os 26 isolados avaliados foram divididos em cinco grupos, dos quais 21 reduziram significativamente a área colonizada pelo patógeno (Figura 1). Dentre os três isolados de melhor desempenho, a área colonizada do disco foi de 343,31 mm², para o antagonista, 520EB, 344,05 mm², para 993EB e 364,78 mm², para 531EB. Nestes tratamentos, constatou-se a redução da faixa de colonização dos discos, pelo fungo, em cerca de 400 mm², ou seja, mais de 50 %, em relação ao controle (782,6 mm²) (Figura 1).

Pode-se constatar, ainda, que os três antagonistas de melhor desempenho (520EB, 993EB e 531EB), têm origem endofítica (Figura 1). Segundo Ramamoorthy et al. (2001), bactérias endofíticas colonizam com mais eficácia os mesmos nichos ecológicos de fitopatógenos, especialmente de patógenos vasculares. Essa característica pode favorecer a ação desses microrganismos e aumentar as chances de sucesso do biocontrole, conforme verificado no ensaio. O sucesso de trabalhos envolvendo bactérias endofíticas e controle biológico de patógenos vasculares, é relatado por Eljounaidi et al. (2016).

Destaca-se o fato de pelo menos um dos três mecanismos de biocontrole avaliados para a seleção dos antagonistas, ou seja, a produção de compostos antimicrobianos voláteis e difusíveis, e a produção de quitinase, figurarem como características dos três isolados de melhor desempenho. Esse fato vem de encontro à estratégia de busca por diferentes formas de atuação dos microrganismos, de modo a aumentar as possibilidades de sucesso na seleção de antagonistas a fitopatógenos. Ainda, permite o uso de isolados combinados, desde que não haja inter-inibição.

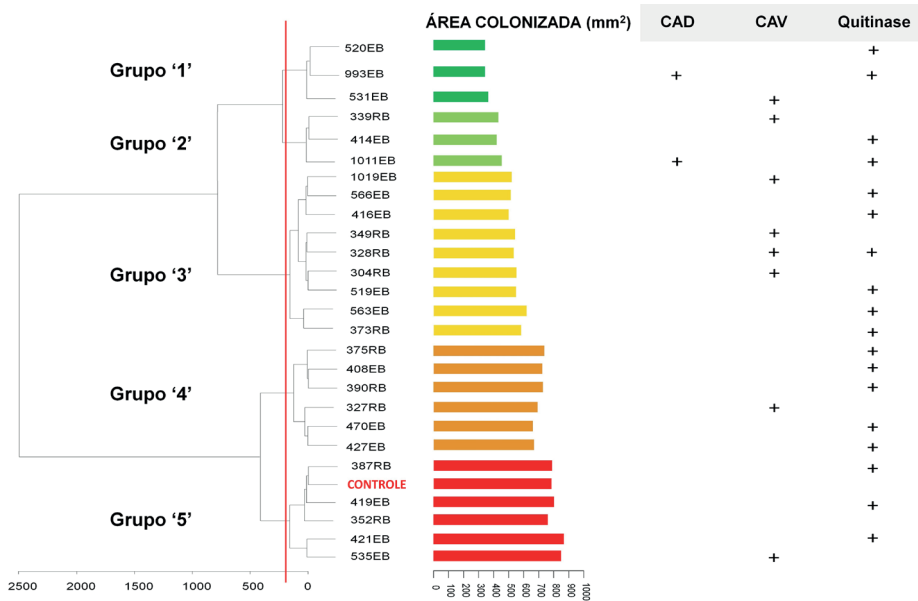


Figura 1. Análise de “agrupamento” de 26 isolados bacterianos, onde as barras expressam os valores de área colonizada (mm²), por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, em discos de rizoma de bananeira, da variedade ‘Maçã’, tratados com suspensão das bactérias antagonistas e posteriormente inoculados com discos miceliais do patógeno. À direita, os mecanismos de biocontrole inerentes a cada antagonista em estudo (Luquine, 2012). CAD – compostos antimicrobianos difusíveis; CAV – compostos antimicrobianos voláteis; Rizobactéria – código numérico seguido de “RB”; Bactéria endofítica – código numérico seguido de “EB”.

Apesar de, os três isolados com melhor potencial de biocontrole, serem provenientes de colonização endofítica, não houve diferença significativa, entre as médias de redução da colonização, quando comparadas às obtidas para os isolados de rizobactérias testados (Figura 2A). Por outro lado, se constatou diferença significativa, entre os isolados, quando agrupados em função do tipo de mecanismo envolvido no biocontrole (Figura 2B).

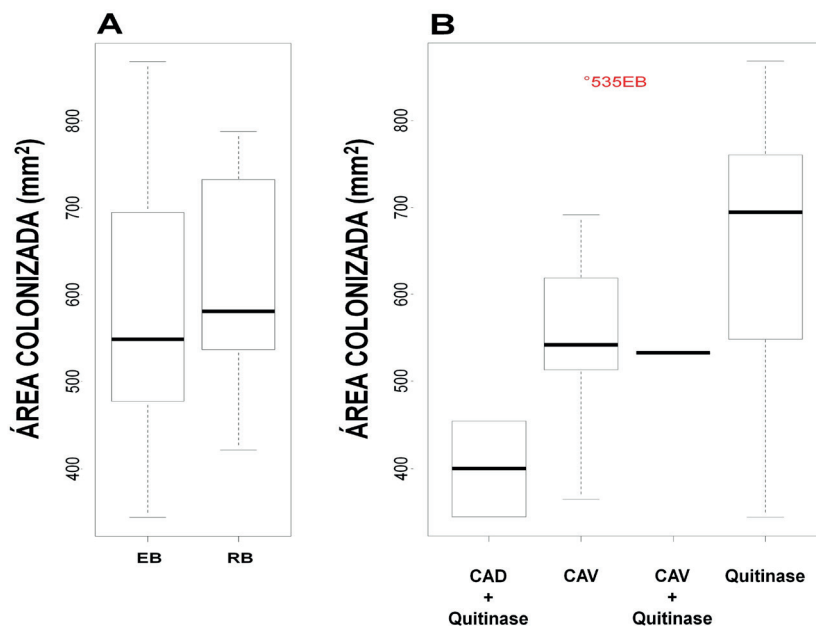


Figura 2. Box-plot dos valores obtidos para a área colonizada dos diferentes tratamentos: (A) em função da origem dos isolados (endofíticos = 'EB' e rizobactérias = 'RB'); (B) em função do tipo de mecanismo empregado para biocontrole de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (DAC: compostos anti-microbianos difusíveis; VAC: compostos anti-microbianos voláteis, ou produção de quitinase).

Vários isolados, selecionados para um mesmo mecanismo de biocontrole, proporcionaram diferentes níveis de inibição de Foc (Figura 2). É importante destacar que os ensaios para a produção dos compostos antimicrobianos, foram qualitativos e *in vitro*. Assim, é possível que as bactérias com desempenho inferior, algumas inclusive abaixo do controle, sintetizem os compostos em concentrações que não inibam o patógeno de forma significativa, como observado para o isolado 535EB. Neste caso, o isolado 535EB não proporcionou inibição do patógeno, com área colonizada superior a 800 mm², enquanto a média de área colonizada de produtores de VAC, foi de aproximadamente 520 mm². Essa, pode ser uma das causas de inconsistência de resultados de agentes de biocontrole em campo, ou mesmo em casa de vegetação.

A seleção de agentes de biocontrole de fitopatógenos não é uma tarefa simples, seja pela diversidade de microrganismos, ou por interações com a planta hospedeira. Uma das peças chaves para se aumentar as chances de se atingir os objetivos almejados, são os ensaios com grande número de potenciais antagonistas interagindo contra o patógeno, em escala laboratorial. Para tal finalidade, os métodos empregados devem ser eficazes na seleção de características antagonísticas, de baixo custo, e culminarem com a obtenção de isolados que possam ser produzidos em larga escala, com resultados consistentes em campo.

Assim, os métodos de seleção de antagonistas, devem envolver, sempre que possível, fatores ecológicos e ambientais, como a interação com o hospedeiro, temperatura, umidade, pH, dentre outros (Fiddaman et al., 2005; Spadaro; Gullino, 2005). Dessa forma, além da inibição direta do patógeno por compostos, também será avaliada a capacidade de competição e sobrevivência do agente, bem como formas indiretas de controle envolvendo a indução de resistência sistêmica.

Os bioensaios, envolvendo órgãos vegetais destacados, surgem com essa finalidade, ou seja, evitar a artificialidade dos métodos de seleção *in vitro*, mas mantendo o custo relativamente baixo e a possibilidade de se trabalhar com um grande número de potenciais antagonistas. Köhl et al. (2011), postulam que o requerimento básico para esse tipo de estudo é a presença do hospedeiro, ou tecidos do hospedeiro, em condições controladas e epidemiologicamente representativas.

Há um grande número de relatos envolvendo a seleção de agentes de biocontrole de fitopatógenos, empregando tecidos vegetais, como discos de folhas, folhas e flores destacadas, e discos de pétalas (Helbig, 2001; Szandala; Backhouse, 2001; Fiddaman et al., 2005; Shiomi et al., 2006; Rajkumar et al., 2005; Burmeister; Hau, 2009; Silva et al., 2012; Zhang et al., 2017). No ensaio com discos de rizoma, além do confronto antagonista-patógeno em uma condição que envolve tecidos colonizáveis por ambos, há a possibilidade de estudos envolvendo diferentes níveis de temperatura e umidade, ampliando assim a gama de situações para ambos, agentes de biocontrole e Foc.

O emprego dos discos de rizoma de bananeira, nos testes de seleção de agentes de biocontrole ao mal-do-Panamá, é um método que apresenta

todas as vantagens desejadas como: o baixo custo, reduzido espaço físico e tempo despendido, além de verificar a atuação do antagonista em tecidos do hospedeiro. Baseando-se na estratégia de aliar resultados de seleção *in vitro* com os obtidos em discos de rizoma, há maior possibilidade de sucesso do biocontrole quando levado a campo. Considerando rizomas infectados como a mais eficiente forma de disseminação de Foc (Ploetz, 2015), esse tecido torna-se um perfeito material para se verificar a eficácia de um antagonista em controlar aquele fitopatógeno.

Luquine (2012) confirmou a ação antagonística das bactérias 993EB, 304RB e 416EB (referidos como APC51, PA05 e APC7, respectivamente, no supracitado trabalho) a Foc, selecionadas no presente trabalho com o auxílio da metodologia apresentada, em plantas de bananeira, em casa de vegetação, quando aplicados em conjunto. Os antagonistas, aplicados em combinação de isolados, reduziram a severidade da doença em 55% e 45% para as variedades 'Prata Anã' e 'Maçã', respectivamente.

Entretanto, existe a possibilidade da não correspondência de desempenho de agentes de biocontrole em casa de vegetação, e/ou campo, selecionados em condições controladas *in vitro*, ou mesmo por outros métodos que envolvam tecidos vegetais. Ensaio para a seleção de potenciais agentes de biocontrole, normalmente envolvem um grande número de candidatos e, em condições naturais de cultivo, há uma série de variáveis climáticas e biológicas envolvidas, que dificilmente são passíveis de serem controladas em sua totalidade.

Segundo Fravel (2005), embora muitos agentes tenham sido isolados e selecionados por meio de ensaios de inibição *in vitro* ao longo dos anos, em um grande número de pesquisas de campo não se verificaram os resultados obtidos em laboratório. Dentre as causas para essa discrepância, o alto nível de controle de fatores ambientais, na seleção de agentes em laboratório, assim como a ausência de interação, com a planta hospedeira, são os mais relevantes.

Aliada à metodologia envolvendo o emprego de discos de rizoma, a técnica da utilização de imagens digitais, para avaliação dos resultados, mostrou-se uma ferramenta muito precisa, por possuir maior confiabilidade em função do armazenamento das informações e possibilitar a verificação de erro, quando assim for necessário, diferente da avaliação tradicional por escala, onde pode haver influência do avaliador.

Silva et al. (2011), utilizaram fotografias de partes vegetais destacadas de mandioca, inoculadas com *Fusarium* sp., a fim de avaliar o nível de resistência à podridão radicular, em diferentes acessos. A análise do material, por fotografia digital, foi eficiente para a separação de genótipos em diferentes níveis de resistência ao patógeno, podendo ser empregada em programas de melhoramento, para avaliação preliminar do material testado.

Conclusões

O método de inoculação de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cabense*, em discos de rizoma de bananeira, colonizados por bactérias rizosféricas, e endofíticas antagonistas, pode ser empregado para auxiliar trabalhos visando a seleção de agentes de controle biológico para manejo do mal-do-Panamá.

Referências

- BECKMAN, C. H. Host responses to the pathogen. In: PLOETZ, R. C. (Ed.). **Fusarium wilt of banana**. St. Paul, MN: The American Phytopathological Society. 2015. p. 93-105.
- BENCHIMOL, R. L.; CHU, E. Y.; YUITIMUTO, R.; DIAS-FILHO, M. B. Controle da fusariose em plantas de pimenta-do-reino com bactérias endofíticas: sobrevivência e respostas morfofisiológicas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 7, p. 1343- 348, 2000.
- BEYER, M.; RÖDING, S.; LUDEWIG, A.; VERREET, J.-A. Germination and survival of *Fusarium graminearum* macroconidia as affected by environmental factors. **Journal of Phytopathology**, v. 152, p. 92–97, 2004.
- BHARAT, R.; SINGH, V. N.; SINGH, D. B. *Trichoderma viride* as a mycoparasite of *Aspergillus* spp. **Plant and Soil**, v. 57, p. 131-135, 1980.
- BURMEISTER, L.; HAU, B. Control of the bean rust fungus *Uromyces appendiculatus* by means of *Trichoderma harzianum*: leaf disc assays on the antibiotic effect of spore suspensions and culture filtrates. **BioControl**, v.54, p. 575–585, 2009.
- CHEN, Y.; MEI, R.; LIU, L.; KLOEPPER, J. W. The use of yield increasing bacteria (YIB) as plant growth-promoting rhizobacteria in Chinese agriculture. In: UTKHEDE, R. S. e GUPTA, V. K. (Ed.). **Management of soil born diseases**. Ludhiana: Kalyani Publishers. 1996. p. 165-184.
- CORDEIRO, Z. J. M.; MATOS, A. P.; MEISSNER FILHO, P. E. Doenças e métodos de controle. In: BORGES, A. L.; SOUZA, L. da S. (Ed.). **O cultivo da bananeira**. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004. p. 146-182.
- ELJOUNAIDI, K.; LEE, S. K.; BAE, H. Bacterial endophytes as potential biocontrol agents of vascular wilt diseases – review and future prospects. **Biological Control**, v. 103, p. 62–68, 2016.
- FAO. **Faostat**, 2018. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>. Acesso em: 10 jun. de 2020.

- FIDDAMAN, P. J.; O'NEILL, T. M.; ROSSALL, S. Screening of bacteria for the suppression of *Botrytis cinerea* and *Rhizoctoniasolani* on lettuce (*Lactuca sativa*) using leaf disc bioassays. **Annals of Applied Biology**, v. 137, p. 223-235, 2005.
- FRAVEL, D. R. Commercialization and implementation of biocontrol. **Annual Review of Phytopathology**, v. 43, p. 337-359, 2005.
- HELBIG, J. Biological control of *Botrytis cinerea* Pers. ex Fr. in strawberry by *Paenibacillus polymyxa* (Isolate 18191). **Journal of Phytopathology**, v. 149, p. 265-273, 2001.
- IDRIS, H. A.; LABUSCHAGNE, N.; KORSTEN, L. Screening rhizobacteria for biological control of *Fusarium* root and crown rot of sorghum in Ethiopia. **Biological Control**, v. 40, p. 97-106, 2007.
- KNUDSEN, I. M. B.; HOCKENHULL, J.; FUNK JENSEN, D.; GERHARDSON, B.; HÖKEBERG, M.; TAHVONEN, R.; TEPERI, E.; SUNDHEIM, L.; HENRIKSEN, B. Selection of biological control agents for controlling soil and seed-borne diseases in field. **European Journal of Plant Pathology**, v. 103, p. 775-784, 1997.
- KÖHL, J.; POSTMA, J.; NICOT, P.; RUOCCO, M.; BLUM, B. Stepwise screening of microorganisms for commercial use in biological control of plant-pathogenic fungi and bacteria. **Biological Control**, v. 57, p. 1-12, 2011.
- LIAN, J.; WANG, Z.; CAO, L.; TAN, H.; INDERBITZIN, P.; JIANG, Z.; ZHOU, S. Artificial inoculation of banana tissue culture plantlets with indigenous endophytes originally derived from native banana plants. **Biological Control**, v. 51, p. 427-434, 2009.
- LUQUINE, L. S. **Aplicação conjunta de rizobactérias e bactérias endofíticas para o biocontrole do Mal-do-panamá da bananeira**. 2012. (Dissertação de mestrado) - , Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, BA, Brasil. 2012. 50p.
- RAJKUMAR, M.; LEE, W. U.; LEE, K. J. Screening of bacterial antagonists for biological control of *Phytophthora* blight of pepper. **Journal of Basic Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 55-63, 2005.
- PLOETZ, R. C. *Fusarium* wilt of banana. **Phytopathology**, v. 105, p. 1512-1521, 2015.
- R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. **R Foundation for Statistical Computing**. Vienna, Austria, 2017. Disponível em: <https://www.R-project.org/>. Acesso em: 08 set. 2018.
- RAMAMOORTHY, V.; VISWANATHAN, R.; RAGUCHANDER, T.; PRAKASAM, V.; SAMIYAPPAN, R. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. **Crop Protection**, v. 20, p. 1-11, 2001.
- RENWICK, A.; CAMPBELL, R.; COE, S. Assessment of *in vitro* screening systems for potential biocontrol agents of *Gaeumannomyces graminis*. **Plant Pathology**, v. 40, p. 524-532, 1991.
- ROMEIRO, R.S. **Controle biológico de enfermidades de plantas**: procedimentos. Viçosa, MG: UFV, 2007. 172p.
- SHIOMI, H. F.; SILVA, H. S. A.; MELO, I. S.; NUNES, F. V.; BETTIOL, W. Bioprospecting endophytic bacteria for biological control of coffee leaf rust. **Scientia Agricola**, v. 63, n. 1, p. 32-39, 2006.
- SILVA, H. S. A.; OLIVEIRA, S. A. S. de; HADDAD, F. **Uso de imagens digitalizadas em metodologias de seleção para resistência à podridão radicular de mandioca em condições controladas**. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2011. (Embrapa Mandioca e Fruticultura. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 54). Disponível em: http://www.cnpmf.embrapa.br/publicacoes/boletins/boletim_54.pdf Acesso em: 08 set. 2018.

SILVA, H. S. A.; TOZZI, J. P. L.; TERRASAN, C. R. F.; BETTIOL, W. Endophytic microorganisms from coffee tissues as plant growth promoters and biocontrol agents of coffee leaf rust. **Biological Control**, v. 63, p. 62-67, 2012.

SPADARO, D.; GULLINO, M. L. Improving the efficacy of biocontrol agents against soilborne pathogens. **Crop Protection**, v. 24, p. 601–613, 2005.

SZANDALA, E. S.; BACKHOUSE, D. Suppression of sporulation of *Botrytis cinerea* by antagonists applied after infection. **Australasian Plant Pathology**, v. 30, p. 165–170, 2001.

ZHANG, X.; ZHOU, Y.; LI, Y.; FU, X.; WANG, Q. Screening and characterization of endophytic Bacillus for biocontrol of grapevine downy mildew. **Crop Protection**, v. 96, p. 173-179, 2017.

ZHENG, Y.; XUE, Q.-Y.; XU, L.-L.; XU, Q.; LU, S.; GU, C.; GUO, J.-H. A screening strategy of fungal biocontrol agents towards Verticillium wilt cotton. **Biological Control**, v. 56, p. 2009-2016, 2011.



Mandioca e Fruticultura

MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA



PÁTRIA AMADA
BRASIL
GOVERNO FEDERAL