



Biocontrole de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* por *Pseudomonas* spp. em banana “Prata anã”

Lara Cristine da Silva Vieira^a, Cristine Vanz Borges^{a*}, Shirley Nascimento Costa^b,
Zalmar Santana Gonçalves^c, Bruno Laecio da Silva Pereira^d, Fernando Haddad^c

^a Faculdade Maria Milza, Brasil

^b Faculdade Santo Antônio, Brasil

^c Embrapa Mandioca e Fruticultura, Brasil

^d Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Brasil

* Autor correspondente (cristine.vanzb@gmail.com)

INFO

Keywords

biological control
banana
Panama disease

ABSTRACT

Fusarium oxysporum f. sp. *cubense* biocontrol mediated by *Pseudomonas* spp. in Prata-Anã banana.

The banana tree is cultivated in the main countries of the world, including Brazil. This crop presents several phytosanitary problems, especially the *Fusarium* wilt caused by the fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc). The use of microorganisms such as *Pseudomonas* has been an alternative for the biocontrol of phytopathogens. In order to investigate the control capacity of rhizobacteria of the genus *Pseudomonas* in relation to the activity of the fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc), two experiments were carried out under greenhouse conditions. The design was completely randomized (DIC) with three treatments, three controls and 10 replications. The treatments of the first experiment consisted of applying *Pseudomonas* spp. on the substrate, with the addition of Foc with and without a time interval. After inoculation period in the substrate infested by Foc and *Pseudomonas*, banana seedlings were planted in tubes. In the second experiment, the application interval was the same as in the pre-inoculation experiment, but *Fusarium* was inoculated first and then the bacteria and then transferred to the substrate. The use of *Pseudomonas* in different treatments, with time intervals, was not efficient to control Foc. It was observed that the disease index was less severe in the treatment without time interval for inoculation of *Fusarium* and *Pseudomonas*, being the best treatment for the biocontrol of *Fusarium* in banana plants of the cultivar Prata Anã. The use of bacteria of the genus *Pseudomonas* spp. is an economically viable alternative to control *Fusarium* Wilt.

RESUMO

A bananeira apresenta diversos problemas fitossanitários, tendo destaque a murcha de *Fusarium* causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc). O uso de microrganismos como o *Pseudomonas*, tem sido uma alternativa para o biocontrole dos fitopatógenos. Com o objetivo de investigar a capacidade de controle da rizobactéria do gênero *Pseudomonas* em relação à atividade do fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc), foi realizado dois experimentos em condições de casa de vegetação. O delineamento foi inteiramente casualizados (DIC) com três tratamentos, três controles e 10 repetições. Os tratamentos do primeiro experimento consistiram em aplicar *Pseudomonas* spp. no substrato, com adição de Foc com e sem intervalo de tempo. Após período de inoculação no substrato infestado por Foc e *Pseudomonas*, realizou-se o plantio das mudas de bananeira nos tubetes. No segundo experimento, o intervalo de aplicações foi o mesmo do experimento de pré-inoculação, porém o *Fusarium* foi inoculado primeiro, posteriormente a bactéria e em seguida foram transferidos para o substrato. A utilização de *Pseudomonas* em tratamentos diferentes, com intervalo de tempo não foi eficiente para o controle do Foc. Observou-se que o índice de doença foi menos severo no tratamento sem intervalo de tempo para inoculação de *Fusarium* e *Pseudomonas*, sendo o melhor tratamento para o biocontrole do *Fusarium* em plantas de banana da cultivar Prata Anã. A utilização de bactérias do gênero *Pseudomonas* spp. é uma alternativa economicamente viável para controle da Murcha de *Fusarium*.

Received 03 November 2021; Received in revised from 10 January 2022; Accepted 17 February 2022



INTRODUÇÃO

Bananas e plátanos representam o quarto alimento mais produzido no mundo, com uma produção anual de 114 milhões de toneladas, são produzidos em larga escala pela Índia, China, Indonésia e Brasil, os quais são os maiores produtores atualmente (FAO, 2021). O Brasil produziu aproximadamente, 6,67 milhões de toneladas em 465 mil hectares de área cultivada no último censo realizado pela FAO, destacando-se entre os maiores produtos da cultura (FAOSTAT, 2019). Desta produção, 99% são destinadas ao mercado interno, destaque para as regiões Nordeste e Sudeste, que são as responsáveis por dois terços da produção do país. Nestas regiões, a cultura apresenta relevante papel social, fixando o homem no campo, gerando empregos e rendas, principalmente para a agricultura familiar (Borges et al., 2009).

Apesar dos avanços nos últimos anos das tecnologias desenvolvidas para a produção de banana, a bananicultura tem sua produção cada vez mais limitada por várias pragas e doenças, tendo destaque a Murcha do *Fusarium* ou Mal-do-panamá. Esta doença é causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc), o qual apresenta ação devastadora em milhares de plantações pelo mundo (Ploetz, 2015).

O Foc pode sobreviver no solo por décadas e se disseminar por diversas maneiras (isto é, infectar solo, águas superficiais, plantas e outras). O patógeno é capaz de penetrar diretamente pelas células da epiderme das regiões apicais e zonas de alongamento das raízes, bem como, por meio de ferimentos naturais causados pela emissão de raízes secundárias. Após a penetração, o Foc movimentase pelos vasos do xilema e coloniza o rizoma da bananeira, causando uma coloração pardo avermelhada no sistema vascular (LIU et al., 2019).

Essa patologia é de caráter endêmico em todas as regiões bananiculoras do mundo, e seu controle é complexo, pois não há efetividade por meio de fungicidas. Com opções limitadas para gerenciar as doenças causadas pelo *Fusarium*, as cultivares resistentes (Gonçalves et al., 2019) e o uso de produtos químicos (Nel et al., 2007) são as únicas ferramentas para controlar a doença em solos infestados pelo patógeno. No entanto, variedades resistentes abre precedentes para o surgimento de novas raças do patógeno (Borges et al., 2009) e o uso de produtos químicos causa uma série de danos ambientais, sendo necessária a busca por novas alternativas de controle (Arya et al., 2018).

O uso de organismos antagonistas, incluindo rizobactérias não patogênicas é um método seguro de controle contra os fitopatógenos, desempenhando um papel importante contra as

principais doenças de plantas (Pandey et al., 2019). Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas, como as cepas *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Actinomicetes*, são os principais colonizadores de raízes e podem induzir a resistência sistêmica nas plantas contra o *Fusarium* (Alzandi e Naguib, 2019; Mohamed et al., 2019; Pandey et al., 2019).

As bactérias do gênero *Pseudomonas* têm a capacidade de promover o crescimento de plantas e também contribuir para o biocontrole de fitopatógenos (Gamez et al., 2019; Islam et al., 2016). Estas bactérias possuem mecanismos que atuam dificultando o desenvolvimento de outros microrganismos, como a síntese de sideróforos (Arya et al., 2018), de antibióticos (Huang et al., 2018) e a indução da atividade de enzimas de defesa da planta contra os patógenos (Alzandi e Naguib, 2019). Estas bactérias foram testadas em bananas das cultivares Great Dwarf e Calcutá (Rivera-Cruz et al., 2008) e Williams (Gamez et al., 2019). No entanto, até o momento, não existem relatos de seus efeitos em bananas do subgrupo Prata, que é de grande interesse econômico, principalmente para a bananicultura brasileira (IBGE, 2017). Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade de controle de rizobactérias, do gênero *Pseudomonas* em relação à atividade do fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, causador da Murcha do *Fusarium* em bananeiras da cv. Prata-Anã.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em condições de casa de vegetação, na Embrapa Mandioca e Fruticultura, no Município de Cruz das Almas – BA (12°40'19"S e 39°06'22"W', altitude de 220 m acima do nível do mar).

Foi avaliado o efeito de *Pseudomonas* no controle do fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) em mudas de bananeira da variedade Prata-anã entre os meses de janeiro a maio de 2016. Foi escolhida a cultivar Prata Anã devido sua importância para a bananicultura brasileira, sendo esta cultivar a mais plantada na região Nordeste, segundo maior produtor de banana do Brasil (IBGE, 2017). Além disso, essa cultivar se comporta como um material moderadamente suscetível em relação ao *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc), então encontrar soluções para inibir a ação do patógeno é de suma importância para a bananicultura.

Foi utilizado para a produção do inoculo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raça 1 o isolado CNPMF-0801 que é o padrão utilizado pela Embrapa para a seleção de genótipos resistentes

tanto em casa de vegetação quanto em campo, onde a empresa possui em sua coleção este material em estudo. Isolado do gênero *Pseudomonas spp.* pré-selecionados para ensaios de controle biológico foram obtidos da coleção do Laboratório de Microbiologia da mesma instituição. A cultura monospórica obtida foi cultivada em meio BDA (Batata, Dextrose e Ágar) e mantido em Demanda Bioquímica de Oxigênio (B.O.D.) a 25 °C com fotoperíodo de 12 horas.

A obtenção das mudas da cultivar Prata Anã foram através de cultura *in vitro* do laboratório da própria Embrapa Mandioca e Fruticultura e aclimatizadas por 60 dias e posteriormente transferidas para casa de vegetação da unidade, e transplantadas para sacos de polietileno com dimensão de 20 x 30 cm, permanecendo até o início das avaliações.

Preparo do inóculo de Foc1

Para o preparo do inóculo de Foc, foram misturados 1330 g de areia lavada, 250 g de fubá de milho umedecido e 150 mL de água destilada. Esse substrato foi colocado em sacos de polipropileno de 500 cm³ e esterilizado em autoclave a 120 °C por uma hora e armazenados em locais livres de contaminações até o início do bioensaio. Discos do meio de cultura contendo micélios e conídios de Foc foram adicionados à mistura, a qual foi armazenada em B.O.D. a 25 °C, durante 20 dias para a multiplicação do inóculo. Após esse período, as unidades formadoras de colônias (UFC) de Foc foram quantificados em câmara de Neubauer utilizando-se da técnica de diluição seriada.

Foi utilizado 1,0 g da mistura e colocada em um tubo de ensaio contendo 9,0 mL de água destilada e, posteriormente, foram realizadas diluições de 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴ e 10⁻⁵. As duas últimas diluições (10⁻⁴ e 10⁻⁵) foram submetidas à multiplicação em placas de Petri com meio BDA. As placas foram mantidas em B.O.D. a 25 °C por 48 horas para posterior contagem do número de unidades formadoras de colônias.

Preparo do inóculo de *Pseudomonas*

Os isolados de *Pseudomonas spp.* foram removidos das placas de Petri com auxílio da alça de Drigalsky e transferidos para um Becker com água destilada. Após este procedimento, 1,0 mL da suspensão formada foi transferida para tubos de ensaio para a realização de diluições seriadas (10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴ e 10⁻⁵).

Uma alíquota de 0,1 mL das duas últimas diluições foi transferida para placas de Petri contendo Agar nutriente e mantidas em B.O.D a 37

°C por 24 horas para posterior quantificação das unidades formadoras de colônias (UFC). Posteriormente, as colônias foram observadas sob luz ultravioleta (UV), sendo realizada a determinação da concentração inicial de cada solução de bactérias, estas foram diluídas com água destilada até atingirem à concentração de 10⁷ UFC mL⁻¹. Para conferir a concentração desta diluição, a absorbância da solução foi analisada por densidade óptica no espectrofotômetro, utilizando o comprimento de onda de 490 nm.

Montagem dos experimentos

Para a avaliação do efeito de *Pseudomonas* no controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) em plantas de bananeira da cultivar Prata Anã previamente isoladas em ambiente livres de ataques de pragas e doenças, o delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado em casa de vegetação, possuindo três tratamentos com três controles e 10 repetições (uma planta por unidade experimental). O trabalho experimental foi montado de duas formas distintas (dois experimentos).

Vale ressaltar que o protocolo utilizado neste experimento teve como base o trabalho de Vieira et al, 2020, com modificações, pois os autores citados trabalharam com controle de *Fusarium* utilizando *Bacillus* na cultivar Prata Anã. Fornecendo desta forma, informações relevantes para o êxito desse artigo.

Os tratamentos do primeiro experimento consistiram em: T1- uma aplicação de *Pseudomonas* no substrato, com adição de Foc sete dias após; T2- duas aplicações de *Pseudomonas* em intervalo de sete dias no substrato e aplicação de Foc sete dias após a última aplicação de *Pseudomonas*; T3- *Pseudomonas* aplicado no substrato no mesmo momento que Foc. Os controles consistiram de infestação do substrato apenas com *Pseudomonas* (C1), apenas com Foc (C2) e sem infestação do substrato (C3) protocolo ajustado de Vieira et al. (2020).

No segundo experimento, o intervalo de aplicações foi o mesmo do experimento de pré-inoculação, porém o *Fusarium* foi aplicado primeiro e posteriormente a bactéria foi transferida para o substrato. Os tratamentos foram: T1- uma aplicação de Foc no substrato, com adição de *Pseudomonas* sete dias depois; T2- duas aplicações de Foc em intervalo de sete dias no substrato e aplicação de *Pseudomonas* sete dias após a última aplicação de Foc; T3- Foc aplicado no substrato no mesmo momento que *Pseudomonas*. Os controles consistiram de infestação do substrato apenas com Foc (C1), apenas com *Pseudomonas* (C2) e sem

infestação do substrato (C3). Na tabela 1, constam os tratamentos realizados nos diferentes experimentos.

Tabela 1 - Distribuição das diferentes amostras aplicadas em substrato com a cultivar Prata Anã.

EXPERIMENTO 1 MÉTODOS	
T1*	Uma aplicação de <i>Pseudomonas</i> no substrato, com adição de Foc sete dias após a aplicação de <i>Pseudomonas</i>
T2	Duas aplicações de <i>Pseudomonas</i> no substrato e aplicação de Foc sete dias após a segunda aplicação de <i>Pseudomonas</i>
T3	<i>Pseudomonas</i> e Foc aplicados simultaneamente no substrato
C1	Infestação do substrato apenas com <i>Pseudomonas</i>
C2	Apenas com Foc
C3	Sem inoculação no substrato
EXPERIMENTO 2 MÉTODOS	
T1**	Uma aplicação de Foc no substrato, com adição de <i>Pseudomonas</i> sete dias após a aplicação de Foc
T2	Duas aplicações de Foc no substrato e aplicação de <i>Pseudomonas</i> sete dias após a segunda aplicação de Foc
T3	Foc aplicado no substrato no mesmo momento que <i>Pseudomonas</i>
C1	Infestação do substrato apenas com <i>Pseudomonas</i>
C2	Apenas com Foc
C3	Sem inoculação no substrato

*Tratamento 1 (com utilização de *Pseudomonas* antes da aplicação de Foc);

**Tratamento 2 (aplicação de Foc antes da aplicação de *Pseudomonas*). O controle (C1, C2 e C3) foram iguais para ambos os tratamentos. Fonte: Embrapa (2016).

Foram realizadas seis avaliações em intervalos de 15 dias. A primeira avaliação externa foi feita aos 15 dias após o plantio, utilizando-se da escala de notas proposta por Cordeiro et al. (1993), perfazendo um total de 90 dias de avaliação.

As plantas foram mantidas em casa de vegetação com temperatura de aproximadamente 26 °C. As variáveis avaliadas foram: o número de folhas; altura da planta (cm) medida entre a base do pseudocaulo até a última folha totalmente aberta e o diâmetro do pseudocaulo (cm), com o auxílio de um paquímetro e por fim, foi calculado o índice de severidade da doença (ID %) proposto por Mckinney (1923).

Para facilitar a visualização dos sintomas internos, as raízes foram lavadas em água corrente para a retirada do substrato e em seguida separou-se as raízes das plantas de sua parte aérea. Essas medidas associadas com os sintomas internos foram realizadas ao final dos 90 dias ou no momento da morte das plantas (escala 5), a partir do corte transversal do rizoma para a análise da descoloração vascular causada pela presença de *Foc*. Com base na escala proposta por Cordeiro et al. (1993) e citada por Gonçalves et al. (2019), as plantas receberam as seguintes notas: (1) ausência de descoloração vascular, planta sadia; (2) pontos

isolados de descoloração no câmbio vascular; (3) descoloração em 1/3 do câmbio vascular; (4) descoloração entre 1/3 e 2/3 do câmbio vascular; (5) descoloração acima de 2/3 do câmbio vascular; e (6) completa descoloração do câmbio vascular. Posteriormente, foi realizada a transformação para o índice de severidade da doença (ID %) pela expressão de Mckinney (1923):

$$ID (\%) = \sum \frac{(\text{grau da escala} \times \text{frequência}) \times 100}{(\text{n}^\circ \text{ total de unidades} \times \text{grau máximo da escala})}$$

Para a análise estatística, foi estimado o índice de severidade da doença (ID) a partir da escala de sintomas externos e internos, respectivamente, para isso foi obtido através de três repetições (duas compostas por dados de três plantas e outra composta por quatro plantas), de forma aleatória. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANAVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a nível de 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2011). Os dados do índice de severidade de doença foram transformados em $\sqrt{x + 0,5}$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve variações significativas nos atributos físicos entre os tratamentos, independente do experimento analisado (Tabelas 2 e 3). No primeiro experimento, os valores médios de altura da planta, diâmetro do pseudocaule e número de folhas das plantas, somente diferiram entre si no Tratamento T1 (inoculação com *Pseudomonas* e após com *Fusarium* com intervalo), o qual apresentou uma redução significativa nos valores destas variáveis. Em campo, plantas que apresentam porte reduzido facilitam na colheita e manuseio do cacho, porém em casa de vegetação plantas mais baixas podem apresentar tamanho reduzido, devido ao constante ataque de patógenos (Roque et al., 2014).

Não houve diferenças significativas entre os controles para as variáveis altura do pseudocaule, número de folhas e diâmetro do pseudocaule, nem mesmo o controle C2, onde ocorreu a aplicação apenas de Foc. Cabe ressaltar, que plantas com incidência ou severidade de murcha de *Fusarium* tendem a apresentar menores números de folhas e

pseudocaule mais frágil e de tamanho reduzido, como pode ser verificado no tratamento T1 das tabelas 2 e 3, onde todas as variáveis apresentaram redução significativa.

O estudo de poucas variáveis são justificáveis, pois alguns trabalhos relatam que não há a necessidade de avaliar um grande número de caracteres devido a sua pouca importância ou pouco peso nas análises do trabalho, como pode ser visto nos trabalhos de Pereira et al. (2012), que utilizaram o método para selecionar variáveis capazes de discriminar diploides melhorados; Brandão et al. (2013) eliminaram 20 dos 27 descritores quantitativos utilizados na caracterização de acessos de bananeira, Roque et al. (2014) descartaram aproximadamente 70% das características agronômicas utilizadas para a fenotipagem de cultivares de bananeira e Gonçalves et al. (2019), eliminaram 22 das 31 variáveis agronômicas em seu estudo com bananeiras do tipos diploides, triploides e tetraploides.

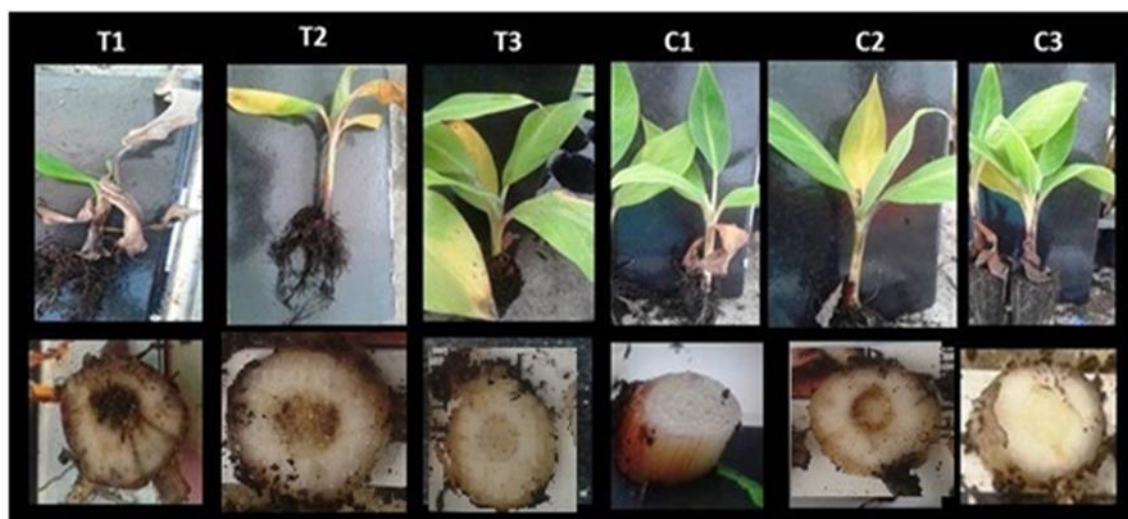
Tabela 2 - Teste de médias entre três características agronômicas e índice de severidade da doença (ID) na cultivar Prata Anã infestada por *Pseudomonas* e depois por *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* (Foc) sob condições de ambiente controlado.

Tratamentos	Altura (cm)	Número de folhas	Diâmetro (cm)	ID ¹ (%)
T1	10,80b*	1,40b	0,53b	33,33a
T2	30,80a	4,70a	1,10a	35,56a
T3	27,50a	3,80a	1,05a	28,89a
C1	30,80a	3,90a	0,99a	0,00b
C2	34,70a	3,90a	0,97a	27,78a
C3	28,80a	4,00a	1,09a	0,00b

T1 - *Pseudomonas* + Foc com intervalo; T2 - *Pseudomonas* + *Pseudomonas* + Foc com intervalo; T3 - *Pseudomonas* + Foc sem intervalo; C1 - Apenas *Pseudomonas*; C2 - Apenas Foc; C3 - Sem infestação. *Médias seguidas com diferentes letras minúsculas na coluna diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Tukey. ¹Dados de ID originais não transformados.

Em relação às avaliações do índice de severidade da doença, não houve diferenças significativas entre os tratamentos T1, T2 e T3 e não diferindo do controle C2, onde foi aplicado somente o Foc. Com este resultado, pode-se inferir que os tratamentos com *Pseudomonas*, mesmo quando aplicado duas vezes, não apresentou controle sobre o Foc. Cabe ressaltar, que os controles C1 (somente *Pseudomonas*) e C3 (sem infestação) não apresentaram sintomas da doença, mostrando que não houve contaminação com o fungo nestes tratamentos.

As plantas dos tratamentos T1, T2 e T3, mesmo apresentando índices de doença semelhantes, apresentaram diferentes respostas externas. O decréscimo das variáveis morfológicas no Tratamento T1, comparado aos outros tratamentos, pode estar associado ao maior desenvolvimento do *Fusarium* no substrato ou a produção ineficiente de compostos químicos inibidores de *Pseudomonas* para controlar o Foc. Neste tratamento, foi observado um intenso amarelecimento nas folhas, típicos dos sintomas da Murcha do *Fusarium* (Figura 1).



T1- uma aplicação de *Pseudomonas* no substrato, com adição de *Foc* sete dias após; T2- duas aplicações de *Pseudomonas* no substrato (a primeira no dia um e a segunda com sete dias após a primeira) e aplicação de *Foc* sete dias após a segunda aplicação de *Pseudomonas*; T3- *Pseudomonas* e *Foc* aplicados simultaneamente no substrato. Os controles consistiram de infestação do substrato apenas com *Bacillus* (C1), apenas com *Foc* (C2) e sem inoculação no substrato (C3). Após período de 14 dias de incubação do substrato inoculado por *Foc* e *Bacillus*.

Figura 1 - Sintomas externos e interno da murcha de *Fusarium*, do primeiro experimento, após avaliação da interação *Pseudomonas* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, na cultivar Prata-anã

Após a infecção do *Foc*, o patógeno se move pelos vasos do xilema e coloniza o rizoma da bananeira, o que resulta na descoloração interna do sistema vascular. Posteriormente, a colonização do patógeno ocasiona marchas vasculares, que tem início com o surgimento de manchas verde-claras e listras marrom-avermelhadas nos tecidos vasculares da base do pecíolo (Ploetz, 2015; Li et al., 2017). O sintoma mais comum é o amarelecimento da borda de folhas mais velhas para as mais novas e quando a doença se encontra em estágios mais avançados, ocorre a colonização do tecido parenquimatoso adjacente, com produção elevada de conídios e clamidósporos (Ploetz, 2015; Li et al., 2017).

No presente trabalho, os tratamentos T1, T2, T3 e o controle C2 apresentaram danos externos na planta característicos da infecção causada pelo *Foc* (Figura 1). A ineficiência do tratamento com *Pseudomonas* uma semana antes da aplicação do *Foc* sugere que a produção de compostos químicos por parte da bactéria, capazes de inibir o patógeno, pode ter sido baixa e seu tempo de resposta foi ineficiente, sugerindo assim um tempo maior de avaliação. Além disso, esses compostos podem ter diminuído ou apresentado baixa vida útil antes da inserção do *Foc* no meio, ocasionando resultados mascarados. Quando se leva em consideração os aspectos epidemiológicos de murcha de *Fusarium*

e a ecologia da maioria das plantações de banana, fica evidente que o manejo para a murcha de *Fusarium* é bastante complexo (Gonçalves et al., 2019).

Na segunda parte do experimento, (*Foc* é aplicado antes da *Pseudomonas*) a variável “altura da planta” apresentou comportamento semelhante entre os tratamentos, ou seja, não houve diferenças estatísticas entre eles (Tabela 3). Sua variação foi entre 23,20 cm (T1) a 25,40 cm (T2), respectivamente. Quando se analisa o comportamento dos controles do experimento 2 nota-se que houve destaque do C1 e C3 para altura da planta. Para o C2 (apenas com *Foc*) o valor foi inferior aos demais, como já era esperado. Corrêa et al. (2010) trabalhando com *Fusarium* em alface hidropônica apresentaram resultados de crescimento das plantas semelhantes aos encontrados no presente trabalho, apresentando ainda murcha das folhas, clorose e podridão radicular. Vieira et al., (2020) avaliando a eficiência de dosagens de aplicações de *Bacillus spp.* para controle do *Foc* em banana demonstraram que é viável economicamente utilizar biocontrole como agente antagonista a Murcha de *Fusarium*, além disso, eles demonstraram que o uso desse tipo de biocontrole é capaz de inibir o crescimento e ataque do *Foc*, quando usado em dosagens aplicadas sete dias antes do inóculo.

Tabela 3 - Teste de médias entre três características agrônômicas e índice de severidade da doença (ID) na cultivar Prata Anã infestada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* (Foc) e depois por *Pseudomonas* sob condições de ambiente controlado

Tratamentos	Altura (cm)	Número de folhas	Diâmetro (cm)	ID ¹ (%)
T1	23,20b*	4,50a	1,02a	55,00a
T2	25,40ab	3,40b	0,99a	55,56a
T3	24,60ab	4,40ab	0,95a	14,44c
C1	29,40 ^a	4,70a	1,05a	0,00d
C2	23,60b	4,50a	0,91a	32,22b
C3	29,70 ^a	3,80ab	1,04a	0,00d

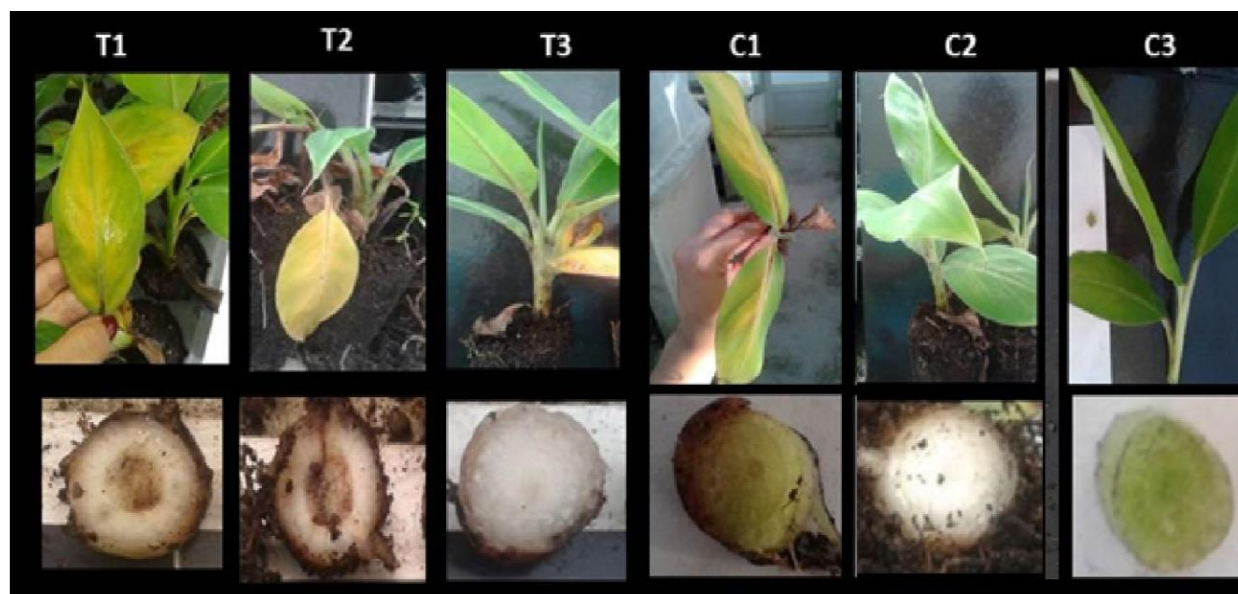
T1- Foc + *Pseudomonas* com intervalo; T2 – Foc + Foc + *Pseudomonas* com intervalo; T3 – Foc + *Pseudomonas* sem intervalo; C1 – Apenas *Pseudomonas*; C2 – Apenas Foc; C3 – Sem infestação. *Médias seguidas com diferentes letras minúsculas na coluna diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Tukey. ¹Dados de ID originais não transformados.

Para o número de folhas o tratamento T1 se destacou, sendo superior aos demais, assim como o controle C1, tendo como indicativo que a aplicação de Foc de alguma forma acelera a produção de folhas nas plantas, podendo ainda ser considerado como um meio de sobrevivência e perpetuação da espécie. Não houve variação no diâmetro do pseudocaule entre os tratamentos e os controles, formando apenas um grupo.

Com relação ao ID, houve a formação de quatro grupos, onde todos os tratamentos que foram infectados por Foc demonstraram o desenvolvimento da doença com alterações significativas resultantes dos sintomas internos da doença. No entanto, o tratamento T3 (sem intervalo de tempo entre a aplicação dos dois inóculos) resultou em melhor controle da doença e, conseqüentemente, em menor ID (Tabela 3). Embora a doença tenha se manifestado e sua

intensidade tenha sido significativamente reduzida, esse controle não demonstra ser uma alternativa viável a campo. Considerando que o Foc já esteja no solo, à hipótese de inoculação da *Pseudomonas* logo após a detecção do Foc no substrato e/ou no solo no campo é remota. No entanto, em condições de casa de vegetação, este tratamento mostrou-se o mais efetivo.

Nos tratamentos T1 e T2 as plantas apresentaram amarelecimento progressivo das folhas, característico da doença, bem como o enegrecimento do pseudocaule (Figura 2). Os sintomas da doença apresentados nestes tratamentos sugerem que o tempo de inoculação e/ou a quantidade de bactérias presente no substrato não foi suficiente à inibição do Foc, independentemente da quantidade do fungo inoculada.



T1- uma aplicação de Foc no substrato, com adição de *Pseudomonas* sete dias após; T2- duas aplicações de Foc no substrato (a primeira no dia um e a segunda com sete dias após a primeira) e aplicação de *Pseudomonas* sete dias após a segunda aplicação de Foc; T3- Foc e *Pseudomonas* aplicados simultaneamente no substrato. Os controles consistiram de infestação do substrato apenas com *Bacillus* (C1), apenas com Foc (C2) e sem inoculação no substrato (C3).

Figura 2 - Sintomas externos e internos da murcha de Fusarium, do segundo experimento após avaliação da interação *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* e *Pseudomonas* na cultivar Prata-anã.

No presente estudo percebe-se que, mesmo quando Foc é aplicado antes de *Pseudomonas*, como verificado no experimento 2, as plantas apresentaram sintomas característicos da doença causada pelo fungo, não sendo verificada eficiência para a redução do índice de doença (ID) (Tabela 3). A ineficiência do controle do desenvolvimento do fungo pela bactéria pode ser explicada pela colonização ineficiente da *Pseudomonas* nas raízes das plantas de bananeira. A colonização das rizobactérias é muito importante para o controle efetivo de patógenos do solo, incluindo o Foc (Ploetz, 2015). Estudos indicam que a colonização por *P. fluorescens* Ps006, por exemplo, é escassa, sem colônias visíveis, especialmente quando observadas por microscopia confocal após coloração com FISH (Gamez et al., 2019). Isso pode indicar que essa linhagem requer um tempo maior para se aderir firmemente às raízes da bananeira comparadas com outras rizobactérias, e.g., *B. amyloliquefaciens* Bs006. No entanto, observando os valores e comportamentos do tratamento T3 de ambos os experimentos, acredita-se que fatores como a viabilidade do inóculo pode ter interferido nas diferenças encontradas, considerando-se que houve uma redução quando a *Pseudomonas* foi empregada logo à adição do Foc.

Embora apenas o tratamento T3, do segundo experimento tenha sido eficiente, outros trabalhos utilizando *Pseudomonas fluorescentes*, tiveram resultados significativos no controle da murcha do *Fusarium* na cultura da bananeira (Gamez et al., 2019). Estes trabalhos relatam que o controle do Foc pela bactéria *Pseudomonas* pode estar associado, principalmente à produção de sideróforos pela bactéria, que tem a capacidade de limitar a quantidade de ferro disponível ao crescimento do patógeno (Arya et al., 2018; Lecomte et al., 2016), ou também por meio da produção de enzimas líticas capazes de degradar a parede das células fúngicas (Durairaj et al., 2018).

Diferenças encontradas nos inúmeros estudos podem estar relacionadas com a composição e condição do meio utilizado, a redução na sobrevivência do controle, condições climáticas, tempo de inoculação, entre outros, que necessitam ser investigados. Diante disso, este trabalho evidenciou que o controle de Foc com a bactéria do gênero *Pseudomonas* não foi eficiente, nem como controle preventivo, nem no controle curativo da doença, exceto quando esta intervenção foi direta.

Corrêa et al. (2010), ao dobrar a dose de *Pseudomonas* em seu experimento, foi detectado um nível significativo de controle da murcha de *Fusarium*, aumentando a massa da planta e diâmetro do pseudocaule em até 6,0 %, tendo como mecanismos de ação a produção de antibióticos e a

competição por espaço e nutrientes com os patógenos.

Outros trabalhos demonstram a importância da pré-seleção das cepas de *Pseudomonas*, quanto a capacidade de produção de sideróforos, antes do uso da bactéria como biocontrole do Foc. Estes estudos indicam que cepas de *Pseudomonas* suprimem a Murcha do *Fusarium*, principalmente pela competição pelo ferro na rizosfera, sendo a produção de sideróforos essencial, conferindo vantagens competitivas às bactérias. Além disso, a produção de sideróforos pela bactéria depende do teor de ferro, pH e temperatura do meio (Arya et al., 2018), sendo essencial o controle eficiente das condições do experimento e/ou do cultivo da bananeira. Concomitantemente, o ajuste da acidez do solo, por meio de fertilizantes alcalinos, é uma característica correlacionada positivamente com a supressão da doença da Murcha do *Fusarium* em bananas (Huang et al., 2019), podendo ser um manejo adequado para melhorar a eficácia do biocontrole utilizado.

Novos estudos devem ser realizados para melhor entendimento do comportamento da *Pseudomonas* e seu poder antagonista junto ao fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* na cultura da bananeira “Prata Anã”, devendo ainda ser testadas com outras cultivares mais resistentes e mais suscetíveis ao ataque da murcha de *Fusarium*.

CONCLUSÕES

A utilização de bactérias do gênero *Pseudomonas* spp., para controle biológico é uma alternativa economicamente viável. A aplicação da bactéria sem intervalo de tempo depois de aplicado o *Fusarium*, demonstrou melhor biocontrole do fungo em planta de bananeira da cv. Prata Anã. Entretanto, estudos quanto a seleção eficiente das cepas das bactérias utilizadas no biocontrole, o período de aplicação, quantidade a ser aplicada, viabilidade dessas bactérias após transferência para o solo, bem como as condições do meio de cultivo da bananeira, precisam ser mais estudados, tendo em vista que, apenas um dos tratamentos teve ação eficaz.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alzandi AA, Naguib DA. *Metabólitos de Pseudomonas fluorescens* como agente de biopriming para indução de resistência sistêmica em tomateiro contra *Fusarium* murcha. *Rhizosphere*, v.11, p.124-128, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2019.100168>
- Anjum S, Sundaram S, Rai GK. Nutraceutical application and value addition of banana peel: A review. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, v.6, n.10, p.81-85, 2014.

- Arya A, Gupta K, Chundawat TS, Vaya D. Biogenic Synthesis of Copper and Silver Nanoparticles Using Green Alga *Botryococcus braunii* and Its Antimicrobial Activity. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, v.2018, p.1-9, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/7879403>
- Bholay AD, Jadhav UP, Borkhataria BV. Fluorescent pseudomonads as plant growth promoting rhizobacteria and their siderophoregenesis. *Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, v.3, p.27-32, 2012. <https://doi.org/10.9790/3008-0312732>
- Borges AL, Souza LS, Oliveira AMG. Banana in: Crisóstomo, L. A.; Naumov, A.(org.). *Adubando para alta produtividade e qualidade: fruteiras tropicais do Brasil*. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 238p., 2009. (IIP. Boletim 18).
- Brandão LP, Souza CPF, Pereira VM, SILVA SO, Santos-Serejo JA, Ledo CAS, Amorim EP. Descriptor selection for banana accessions based on univariate and multivariate analysis. *Genetics and Molecular Research*, v.12, n.2, p.1603-1620, 2013. <http://dx.doi.org/10.4238/2013.May.14.1>
- Cordeiro ZJM, Shepherd K, Soares Filho WS, Dantas JLL. Avaliação de resistência ao mal-do-Panamá em híbridos de triploides de bananeira. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.18, n.4, p.478-483, 1993.
- Cordeiro ZJM; Doenças fúngicas e bacterianas In: Ferreira CF (org.) *O agronegócio da banana*. 1 ed. Brasília-DF, Embrapa/ Cruz das Almas, p.547-575, 2016.
- Corrêa EB, Bettiol W, Sutton JC. Controle biológico da podridão radicular (*Pythium aphanidermatum*) e promoção de crescimento por *Pseudomonas chlororaphis* 63-28 e *Bacillus subtilis* GB03 em alface hidropônica. *Summa Phytopathologica*, v.36, n.4, p.275-281, 2010. <https://doi.org/10.1590/S0100-54052010000400001>
- Durairaj K, Velmurugan P, Park JH, Chang WS, Park YJ, Senthilkumar P, Oh BT. An investigation of biocontrol activity *Pseudomonas* and *Bacillus* strains against *Panax* ginseng root rot fungal phytopathogens. *Biological control*, 9 ed., v.125, p.138-146, 2018.
- FAOSTAT (2021). Banco de dados online FAOSTAT. Disponível em <http://faostat.fao.org/> (acessado em janeiro de 2021).
- Ferreira DF. Sisvar: a computerstatisticalanalysis system. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v.35, n.6, p.1039-1042, 2011.
- Freitas SS. Rizobactérias promotoras do crescimento de plantas. In: SILVEIRA, A. P. D.; FREITAS, S. S. *Microbiologia do solo e qualidade ambiental*. Campinas: Instituto Agrônomo, 2007.
- Gamez RM, Rodríguez F, Vidal NM, Ramirez S, Alvarez RV, Landsman D, Mariño-Ramirez L. Perfil do transcriptoma de banana (*Musa acuminata*) em resposta a rizobactérias: *Bacillus amyloliquefaciens* Bs006 e *Pseudomonas fluorescens* Ps006. *BMC Genomics*, v.20, n.378, p.121-133, 2019. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5763-5>
- Gonçalves zs, Haddad f, Amorim vbo, Ferreira cf, de Oliveira sa. s, Amorim ep. Agronomic characterization and identification of banana genotypes resistant to *Fusarium* wilt race 1. *European Journal of Plant Pathology*, v.155, p.1093-1103, 2019. <https://doi.org/10.1007/s10658-019-01837-5>
- Huang Y, Hickman JE, Wu S. 2018: Impactos de aplicações aprimoradas de fertilizantes no ozônio troposférico e danos às colheitas na África Subsaariana. *Atmospheric Environmental*, v.180, p.117-125, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2018.02.040>
- IBGE. Banco de Dados Agregados. Sistema IBGE de Recuperação Automática –SIDRA.2015. Disponível em: <<http://www2.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/listabl.asp?c=1613&z=t&o=11>>. Acesso em: 27 nov. 2016.
- Islam MT, Kim KH, Choi J. Wheat Blast in Bangladesh: The Current Situation and Future Impacts. *The Plant Pathology Journal*, v.35, n.1, p.1-10, 2019. <https://doi.org/10.5423/PPJ.RW.08.2018.0168>
- Lecomte C, Alabouvette C, Edel-Hermann V, Robert F, Steinberg, C. Biological control of ornamental plant diseases caused by *Fusarium oxysporum*: A review. *Biological Control*, v.101, p.17-30, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.06.004>
- Li C, Yang J, Li W, Sun J, Peng M. 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*, v.101, n.12, p.2073-2078, 2017. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-17-0467-RE>
- Mckinney HH. Influence of soil, temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. *Journal of Agricultural Research*, Washington, v.26, p.195-217, 1923.
- Pandey PK, Samanta R, Yadav, RNS. Inside the plant: addressing bacterial endophytes in biotic stress alleviation. *Archives Microbiology*, v.201, n.4, p. 415-429, 2019. <https://doi.org/10.1007/s00203-019-01642-y>
- Pereira VM, Borges CV, Brandão LP, Oliveira LS, Souza CPF, Gonçalves ZS, Silva SO, Santos-Serejo JA, Ferreira CF, Amorim EP, Ledo CAS. Genetic diversity between improved banana diploids using canonical variables and the Ward-MLM Methods. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.47, n.10, p.1480-1488, 2012. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2012001000010>
- Ploetz RC. *Fusarium* wilt of Banana. *Review Phytopathology*, v.105, p.1512-1521, 2015. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-04-15-0101-RVW>
- Rivera-Cruz MC, Narcia AT, Ballana GC, Kohler J, Coravaca F, Roldán A. Poultry manure and banana waste are effective biofertilizer carriers for promoting plant growth and soil sustainability in banana crops. *Soil Biology and Biochemistry*, v.40, n.12, p.3092-3095, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.09.003>
- Roque RL, Amorim TB, Ferreira CF, Ledo CAS, Amorim EP. Desempenho agrônomo de genótipos de bananeira no recôncavo da Bahia. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v.36 n.3, p.598-609, 2014. <https://doi.org/10.1590/0100-2945-361/13>
- Silva ER. Exsudação radicular e sua utilização por rizobactérias. 2011. 23 p. Dissertação (mestrado em Gestão de recursos agroambientais). Faculdade de agricultura tropical e subtropical, Instituto Agrônomo, Campinas.

Srivastava S, Sharma PK, Guru K. Nutraceuticals: a review.
Journal of Chronotherapy and Drug Delivery, v.6, n.1, p.1-10, 2015.

Vieira LCS, Costa SN, Borges CV, Gonçalves ZS, Haddad F.
Fusarium oxysporum f. sp. *ubense* biocontrol mediated by
Bacillus spp. in Prata-Anã banana. Revista Brasileira de
Ciências Agrárias, v.15, n.3, p.1-7, 2020.
<https://doi.org/10.5039/agraria.v15i3a8030>