



UNIVERSIDADE DO ESTADO DA BAHIA – UNEB  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS HUMANAS – CAMPUS IX

**INIBIÇÃO *in vitro* DO FUNGO *Fusarium oxysporum* f. sp.  
*cupense* UTILIZANDO ISOLADOS DE ACTINOMICETOS DO  
CERRADO**

**RAFAEL SOARES BATISTA**

BARREIRAS - BA  
2017

RAFAEL SOARES BATISTA

**INIBIÇÃO *in vitro* DO FUNGO *Fusarium oxysporum* f. sp.  
*cupense* UTILIZANDO ISOLADOS DE ACTINOMICETOS DO  
CERRADO**

Monografia apresentada ao Colegiado de Engenharia Agrônômica da Universidade do Estado da Bahia – UNEB – Campus IX, como requisito parcial para avaliação do Trabalho de Conclusão do Curso de Engenharia Agrônômica.

Orientador: M.Sc. Jorge da Silva Júnior  
Co-orientador: Dr. João Luís Coimbra

Batista, Rafael Soares.

INIBIÇÃO *in vitro* DO FUNGO *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*  
UTILIZANDO ISOLADOS DE ACTINOMICETOS DO CERRADO: /  
Rafael Soares Batista, , -- Barreiras, 2017.

27 fls : il.

Orientador: Jorge da Silva Júnior Coorientador: João Luís Coimbra.  
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade do Estado da  
Bahia. Departamento de Ciências Humanas, 2017

1. Mal do Panamá. 2. Fusariose. 3. Actinomicetales. 4. Antibiose. I.  
Universidade do Estado da Bahia. Departamento de Ciências Humanas.

CDD: 620

UNIVERSIDADE DO ESTADO DA BAHIA - UNEB

Departamento de Ciências Humanas - *Campus IX*  
Colegiado de Engenharia Agrônômica

RAFAEL SOARES BATISTA

**INIBIÇÃO *in vitro* DO FUNGO *Fusarium oxysporium* f. sp.  
*cubense* UTILIZANDO ISOLADOS DE ACTINOMICETOS DO  
CERRADO**

Aprovado em: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dr. João Luís Coimbra  
Orientador – DCH/UNEB

---

MSc. Heliab Bomfim Nunes  
Convidado – DCH/UNEB

---

MSc. Adilson Alves Costa  
Convidado – DCH/UNEB

*A meus pais, pelo esforço,  
dedicação e compreensão, aos meus  
irmãos e amigos.*

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

A Deus primeiramente, por ter me proporcionado à vida e oportunidade de mais uma vitória.

Aos meus pais, Simone de Jesus Soares e Jaime da Silva Batista (*in memoriam*), pelo amor, apoio, esforço, dedicação e reconhecimento, sendo minha base sólida para enfrentar os obstáculos da vida e que me conduziram a essa jornada.

Aos meus irmãos Jaime Junior, Jarlan, Antônio Fernando, Jessica, José Milton e João Pedro pela amizade.

Ao professor Jorge da Silva Junior pela orientação e dedicação que ajudaram na execução deste trabalho.

Ao professor João Luís Coimbra pela co-orientação e paciência prestada a mim durante a execução do trabalho.

Aos amigos Mariana, Thiago, Daniel, Samara, Liliane e Soraia pelo companheirismo e amizade.

Áos colegas da turma 2013, em especial Aline, Charles, Letícia, Ana Paula pelo apoio, amizade e companheirismo.

Ao programa PICIN pela concessão da bolsa de iniciação científica.

À Uneb pelos anos de curso e estrutura para o desenvolvimento da pesquisa.

**MUITO OBRIGADO!**

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	VII
LISTA DE TABELAS .....	VIII
RESUMO .....	VIII
ABSTRACT .....	IX
1 INTRODUÇÃO .....	10
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	11
2.2 Mal-do-Panamá .....	11
2.2.1 <i>Agente causal e sintomatologia</i> .....	11
2.2.2 <i>Danos que o Mal-do-Panamá causa na bananeira</i> .....	13
2.2.3 <i>Raças fisiológicas de Fusarium oxysporium f. sp. cubense</i> .....	13
2.2.4 <i>Formas de controle</i> .....	13
2.3 ACTINOMICETOS .....	14
2.3.1 <i>Actinomicetos no controle biológico de fitopatógenos</i> .....	15
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	17
3.1 Local do experimento .....	17
3.2 Obtenção dos isolados de Actinomicetos .....	17
3.3 Obtenção dos isolados do <i>Fusarium oxysporum f. sp. cubense</i> .....	17
3.4 Montagem do ensaio experimental .....	17
3.5 Análise estatística .....	20
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	21
5 CONCLUSÃO .....	24
REFERÊNCIAS	

**LISTA DE FIGURAS**

- Figura 1. Murcha e amarelecimento foliar em planta com o mal-do-Panamá. Fonte: CORDEIRO *et al.*, 2004.....12
- Figura 2. Descoloração vascular no pseudocaule de planta com mal-do-Panamá. Fonte: CORDEIRO *et al.*, 2004.....12
- Figura 3. Esquema do pareamento *in vitro* de isolados de actinomicetos no controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense.(A-disco contendo micélio e esporos do fungo; B-Actinomicetos esgotados em estrias múltiplas).....18
- Figura 4. Esquema geral do pareamento *in vitro* de actinomicetos no controle de *F. oxysporum* f. sp. cubense.(A- isolados de actinomicetos e *Fusarium*; B-capela de fluxo laminar, para montagem do pareamento; C-pareamento realizado; D-câmara incubadora para armazenamento).....19
- Figura 5. Comportamento dos isolados de actinomicetos frente a inibição do crescimento micelial do *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense. ....22

**LISTA DE TABELAS**

- Tabela 1. Disposição das unidades experimentais no pareamento *in vitro* do *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* e isolados de actinomicetos. ..19
- Tabela 2. Área de crescimento do *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* frente isolados de actinomicetos oriundo do Cerrado. ....21

BATISTA, Rafael Soares. INIBIÇÃO *in vitro* DO FUNGO *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* UTILIZANDO ISOLADOS DE ACTINOMICETOS DO CERRADO. Em Barreiras – BA, 2017. 27 p. Monografia (Graduação em Engenharia Agrônômica) – Universidade do Estado da Bahia – UNEB.

### RESUMO

Com a finalidade de avaliar a antibiose *in vitro* de actinomicetos oriundos de plantas do Cerrado no crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, foi realizado um ensaio experimental no laboratório de Fitopatologia da Universidade do Estado da Bahia – *Campus IX*, de Maio a Julho de 2017. No antagonismo *in vitro*, foi empregado o método de cultura pareada em placas de Petri. Foram usados sete isolados de actinomicetos da coleção do laboratório supracitado, denominados Ac.I, Ac.II, Ac.III, Ac.IV, Ac.V, Ac.VI e Ac.VII, sendo em delineamento inteiramente casualizado com 5 repetições, cada parcela foi constituída por duas placas. Após a obtenção dos dados do crescimento micelial, foi calculada a percentagem de inibição (% I) do *F. oxysporum* dos tratamentos em relação à testemunha. Todos os isolados de actinomicetos usados no pareamento *in vitro* inibiram o crescimento do fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. Os valores de taxa de inibição pelos actinomicetos usados apresentaram variação de 44% e 60%. Os actinomicetos testados mostraram-se promissores como agentes de biocontrole no Mal-do-Panamá.

**Palavras-chave:** *F. oxysporum* f. sp. *cubense*; Actinomicetos; Antibiose.

BATISTA, Rafael Soares. INHIBITION *in vitro* OF THE FUNGUS *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* USING ISOLATES FROM ACTINOMICETES OF THE CERRADO. In Barreiras - BA, 2017. 27 p. Monography (Graduation in Agronomic Engineering) - State University of Bahia - UNEB.

### ABSTRACT

In order to evaluate the *in vitro* antibiotics of actinomycetes from Cerrado plants on the mycelial growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* an experiment was carried out at the Phytopathology Laboratory of the State University of Bahia - Campus IX, from May to July 2017. In the *in vitro* antagonism, the paired culture method was used in Petri dishes. Seven isolates of actinomycetes from the aforementioned laboratory collection, named Ac.I, Ac.II, Ac.III, Ac.IV, Ac.V, Ac.VI and Ac.VII, were used in a completely randomized design with 5 replicates, each plot consisted of two plates. After obtaining the mycelial growth data, the percentage of inhibition (% I) of the treatments of *F. oxysporum* relative to the control was calculated. All the isolates of actinomycetes used in the *in vitro* pairing inhibited the growth of the fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense*. The inhibition rate values for the actinomycetes used varied 44% and 60%. The actinomycetes tested proved to be promising as biocontrol agents in Mal-do-Panama.

**Keywords:** *F. oxysporum* f. sp. *cupense*; Actinomycetes; Antibiosis

## 1 INTRODUÇÃO

Dentre as doenças fúngicas que atacam a cultura da banana, está o mal do Panamá, o qual é considerado de grande importância econômica devido seu poder destrutivo e persistência no meio em que se encontra. Estima-se que o prejuízo pode chegar a 100% em perda, quando considerado plantas altamente suscetíveis a esse patógeno (*Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*), como a banana Maçã.

Nos métodos de controle, o mais usado e economicamente eficaz é o uso de variedades resistentes ao parasitismo desse fungo. Porém, a efetividade da resistência das cultivares pode ser reduzida devido à variabilidade genética do patógeno. Outro método, como uso de fungicidas químicos, aumenta muito o custo de produção da lavoura, não são eficiente no controle do fitopatogéno por este ser de solo, além disso pode causar problemas ambientais, a exemplo contaminação de lençol freático.

O uso de microrganismos antagonicos é uma das técnicas de produção que pode contribuir para a reduzir a manifestação de doenças fúngicas, como o mal do Panamá. Com isso, estudos visando controle biológico do *Fusarium* spp. usando microrganismos antagonicos, como as actinobactérias, são uma alternativa no manejo dessa doença na cultura da banana.

Actinobactérias são bactérias gram-positivas que apresentam características de bactérias e fungos, onde formam filamentos ramificados. Esses microrganismos vivem no solo, e possuem capacidade de produzir metabólitos ativos com diversas finalidades, dentre elas está ação antibiótica.

Diversos trabalhos *in vitro* utilizando actinomicetos tem demonstrado bons resultados quanto ao antagonismo de vários fungos fitopatogênicos, dentre eles está o *Fusarium* spp. (ALVES *et al.*, 2013; ROCHA *et al.*, 2013).

Diante do exposto, o objetivo desse trabalho foi avaliar *in vitro* actinomicetos oriundos de plantas do Cerrado no crescimento micelial do *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.2 Mal-do-Panamá

Também conhecida como fusariose ou murcha de fusário, é uma doença fúngica que “infecta diversas variedades de bananeira e causa prejuízos aos bananicultores, por seu grande potencial destrutivo e pela dificuldade de aplicação de medidas de controle” (BORGES *et al.*, 2007). Segundo Cordeiro *et al.* (2004) é um fator limitante para o cultivo de variedades consumidas no mercado, com a cultivar Maçã.

#### 2.2.1 Agente causal e sintomatologia

O agente causal da murcha de fusário é o fungo mitospórico *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (E. F. Smith) Snyder & Hansen pertencente ao filo Ascomycota, classe Ascomycetes, ordem Hypocreales e a família Tuberculariaceae, cuja forma perfeita não é conhecida (STOVER, 1972). É um fungo de solo, onde apresenta alta capacidade de sobrevivência na ausência do hospedeiro, fato que, provavelmente, deve-se à formação de estruturas de resistência denominadas clamidósporos (CORDEIRO *et al.*, 2004).

As plantas infectadas exibem um amarelecimento progressivo das folhas mais velhas para as mais novas, começando pelos bordos do limbo foliar e evoluindo sentido da nervura principal. Após isso, elas murcham, secam e quebram junto ao pseudocaule (CORDEIRO *et al.*, 2004). Em consequência, ficam pendentes, o que dá à planta a aparência de um guarda-chuva fechado (CORDEIRO, 2000), como demonstrado na Figura 1.



**Figura 1.** Murcha e amarelecimento foliar em planta com o mal-do-Panamá. Fonte: CORDEIRO *et al.*, 2004.

Internamente, observa-se uma descoloração pardo-avermelhada provocada pela presença do patógeno nos vasos (CORDEIRO *et al.*, 2004), sendo mostrado na figura 2. Sintomas da doença não têm sido observados nos frutos, no entanto, plantas doentes quando produzem frutos que apresentam valor comercial comprometido (CARDOSO, 2010).



**Figura 2.** Descoloração vascular no pseudocaule de planta com mal-do-Panamá. Fonte: CORDEIRO *et al.*, 2004.

Cordeiro *et al.* (1997) relatam que o estabelecimento do patógeno no tecido hospedeiro ocorre via sistema radicular e, principalmente, via raízes secundárias, atingindo posteriormente o xilema, onde ocorre abundante esporulação, com transporte de conídios pelo fluxo transpiratório. Em relação à ocorrência da murcha, o autor explica duas hipóteses, sendo a primeira mediante a produção de toxinas pelo fitopatógeno, e a outra devido ao impedimento físico ao fluxo de água na planta.

### **2.2.2 Danos que o Mal-do-Panamá causa na bananeira**

Segundo Cordeiro *et al.* (2004) quando a doença se manifesta em variedades que são consideradas altamente suscetíveis, as perdas chegam a 100% na produção de banana, a exemplo tem a variedade “Maçã”. Em outras, como as tipo Prata, as quais possuem um grau de suscetibilidade bem menor em comparação à “Maçã”, a incidência do mal do Panamá fica aproximadamente 20% de perdas na produtividade da cultura.

“Por outro lado, o nível de perdas é também influenciado por características do solo, que, em alguns casos, comporta-se como supressivo ao patógeno” (CORDEIRO *et al.*, 2004).

### **2.2.3 Raças fisiológicas de *Fusarium oxysporium f. sp. cubense***

O fungo *Fusarium oxysporum f. sp. cubense* afeta as espécies de *Musa* e *Heliconia*. Apresentando quatro raças fisiológicas, caracterizadas com base na reação de cultivares. A raça 1 infecta as cultivares Gross Michel, Maçã e as do subgrupo Prata; a raça 2 atinge as cultivares Bluggoe e outros plátanos (PEREIRA *et al.*, 2003). Já a raça 3 afeta apenas *Heliconias* sp., enquanto a raça 4, as cultivares do subgrupo Cavendish, como a Nanica e Nanicão (PEREIRA *et al.*, 2003).

### **2.2.4 Formas de controle**

Dentre os métodos mais usados no controle de *Fusarium* estão: a utilização de cultivares resistentes, desinfestação do solo com fungicida químico e rotação de cultura utilizando plantas não hospedeiras (AGRIOS,

1988). O primeiro método supracitado seria uma ótima alternativa, porém, segundo Sutton (2000) há dificuldades como a identificação dos genes que codificam essa resistência ou a habilidade que o patógeno tem de adaptação a novos genótipos, podendo se tornar uma solução temporária.

Estudo tem centrado seus esforços na busca de fontes naturais de resistência ao patógeno em espécies e cultivares silvestres, através do uso de ferramentas biotecnológicas se tem selecionado plantas de banana *in vitro* tolerantes ao mal-do-Panamá (MATSUMOTO *et al.* 1999; CÁRDENAS, 2001), bem como se tem identificado cultivares resistente às raças 1 e 4 de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* (ORJEDA, 1998). Porém, a nível comercial, segundo Fiallos (2009), estas cultivares não apresentou aceitação devido a seus ciclos de cultivos serem excessivamente longo e pela qualidade da fruta que produz. Até o momento não existe uma cultivar resistente que apresente a alta qualidade organoléptica do subgrupo Cavendish e muito menos da cultivar Gros Michel (FIALLOS, 2009).

Além do mais, o controle químico do *Fusarium* spp. não é totalmente eficiente, uma vez que o patógeno penetra no tecido vascular da planta (MARTINS, 2005). Outro ponto seria os impactos negativos que o uso de insumos químicos causa, segundo Tokeshi (2000), representados por contaminação das águas, resíduos químicos no solo, efeitos nos microrganismos e danos à saúde humana. Quanto à rotação, seria de pouca eficiência já que este patógeno encontra-se no solo, capaz de sobreviver nos restos de cultura e apresenta várias espécies vegetais como hospedeiras (SUTTON, 2000).

Diante disso, uma alternativa para o manejo de doenças causadas pelo fungo *Fusarium* seria o uso de microrganismos que apresentem ação antagonica a elas, como os actinomicetos.

### **2.3 ACTINOMICETOS**

Actinomicetos ou actinobactérias são um grupo de bactérias gram-positivas que formam filamentos ramificados e possuem características de bactérias e fungos (BOREM, 1998), formando hifas multinucleadas que se ramificam em um micélio. Possuem alto teor de G+C em seu DNA, com valores de 70% para *Streptomyces* e *Frankia* (VENTURA *et al.*, 2007). Segundo

Gottlieb (1973), são importantes produtores de compostos bioativos e possuem grande potencial como agentes de controle de fitopatógenos, visto que 85% dos antibióticos conhecidos são produzidos por esses microrganismos. Esses microrganismos produzem antibióticos, enzimas e inibidores enzimáticos de interesse industrial (WILLIAMS *et al.*, 1986).

As actinobactérias, em sua maioria, são aeróbias, heterotróficas e habitam naturalmente o solo. Elas se adaptam às diversas condições do ambiente, produzem diversos metabólitos secundários e são capazes de colonizar a rizosfera e tecidos internos das plantas, sendo abundante em solos secos e quentes (SILVA *et al.*, 2015).

De acordo a Oliveira *et al.* (2017) estas bactérias realizam no solo funções importantes no processo de ciclagem de nutrientes, degradando compostos complexos de difícil decomposição como lignocelulose, lignina, celulose e outros materiais recalcitrantes, devido à sua capacidade em produzir diversas enzimas hidrolíticas e lipolíticas.

Arasu *et al.* (2009) relata que dos 23.000 metabólitos secundários descritos produzidos por microrganismos, cerca de 10.000 são metabólitos bioativos produzidos por actinobactérias, sendo que o gênero *Streptomyces* é responsável pela produção de mais de 70% destes compostos.

### **2.3.1 Actinomicetos no controle biológico de fitopatógenos**

O controle biológico visa manter, por meio de certas práticas, um equilíbrio no agroecossistema, de modo que o hospedeiro, na presença do patógeno, não sofra danos significativos, em função da ação controladora dos organismos não patogênicos do sistema (BETTIOL, 1991).

Actinomicetos em geral e estreptomicetos em particular, são conhecidos por possuir muitas espécies que podem inibir o desenvolvimento de muitos fitopatógenos “*in vitro*” (GAVA *et al.*, 1998). Nos solos tem-se observado a ação antagônica dos actinomicetos a *Fusarium oxysporum*, *Verticillium albo-atrum*, *Phytophthora cinnamoni*, *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas solanacearum*, *Rizocthonia solani* e *Alternaria tenuis* entre outros (WILLIAMS, 1982).

O conhecimento dos mecanismos envolvidos no controle biológico é de fundamental importância para aumentar as vantagens competitivas no ambiente. Os exsudatos radiculares podem favorecer a proliferação e a

atividade de microrganismos competidores, produtores de antibióticos, ou antagonistas, que reduzem a atividade dos patógenos, podendo evitar a manifestação de doenças. No controle das doenças vegetais os principais mecanismos incluem: heterólise, produção de toxinas não específicas, autólise, competição por nutrientes e inibidores voláteis em adição a antibiose (SIQUEIRA *et al.*, 1988; CARDOSO *et al.*, 1992).

Spadari *et al.* (2010) avaliando a atividade antifúngica de 25 isolados de *Streptomyces* sp. frente a 10 isolados do fungo *Bipolaris sorokiniana*, através do método de dupla-camada, observaram halos de inibição em 100% dos fungos com o uso do isolado *Streptomyces* 1S.

Fiallos (2009) trabalhando com bactérias endofíticas no controle biológico do mal do Panamá, observou que os isolados F6B25 e F1B9 obtiveram efeito de antibiose com uma redução de 65% do crescimento radial da colônia fúngica do patógeno.

Soares *et al.* (2009) avaliaram o efeito de metabólitos secundários produzidos por estreptomicetos na germinação de esporos e no crescimento micelial dos fungos *Cladosporium fulvum* Cooke e *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, observaram que os isolados AC-147 e AC-92 causaram 94,1% de inibição da germinação de esporos. Para *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, o AC-92 obteve 94,2% de inibição da germinação de esporos. Para crescimento micelial, os AC-26 e AC-92 foram mais eficientes na inibição dos fungos *C. fulvum*, em 46,6% e *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, em 29,9%.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Local do experimento**

O experimento foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia da Universidade do Estado da Bahia/UNEB, Departamento de Ciências Humanas – *Campus IX*, situada no município de Barreiras, região oeste do estado da Bahia.

#### **3.2 Obtenção dos isolados de Actinomicetos**

Os isolados de actinomicetos foram cedidos da coleção do laboratório de Fitopatologia da Uneb-*Campus IX*. Estes são oriundos de rizosfera de plantas do cerrado baiano. Dos actinomicetos disponíveis dessa coleção, 7 isolados, que apresentaram maior potencial de antagonismo frente ao fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, foram testados no pareamento com o *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*.

#### **3.3 Obtenção dos isolados do *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense***

Os isolados do fungo foram fornecidos pela empresa JCO Indústria e Comércio de Fertilizantes Ltda. Estes foram repicados para placas de Petri contendo meio BDA (200 g batata, 20 g dextrose e 15 g ágar), sendo mantidos em incubadora a 25 °C até a montagem do ensaio.

#### **3.4 Montagem do ensaio experimental**

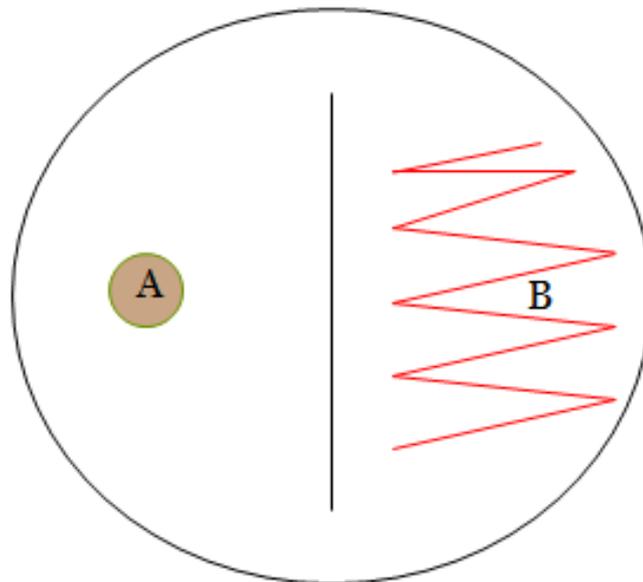
Para os estudos do antagonismo *in vitro*, empregou-se o método de cultura pareada em placas de Petri descrita por Dennis *et al.* (1971), contendo meio BDA (Batata, Dextrose, Ágar), preparado com 200g de batata, 20g de dextrose e 15g de ágar por litro de água destilada, sendo que o meio foi devidamente esterilizado em Autoclave Vertical, com temperatura de 120°C e

pressão de 1 kgf/cm<sup>2</sup>, durante 20 minutos. Posteriormente o meio BDA foi vertido à base de 20 mL por placa.

Após a solidificação do meio, foi realizado o pareamento de cada actinomiceto com o isolado do fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. Dentro da câmara de fluxo laminar, discos de 9 mm de diâmetro contendo meio e micélio do fungo, foram retirados de cultura pura e colocados a 1 cm da borda da placa de Petri, contendo o meio BDA.

Na outra extremidade da placa, foram colocados isolados de actinomicetos, utilizando-se a técnica de semeadura de estrias múltiplas, que se resume em espalhar o material com o auxílio de uma alça bacteriológica de platina, fazendo estrias sucessivas na superfície do meio, formando assim, o pareamento das colônias (Figura 3).

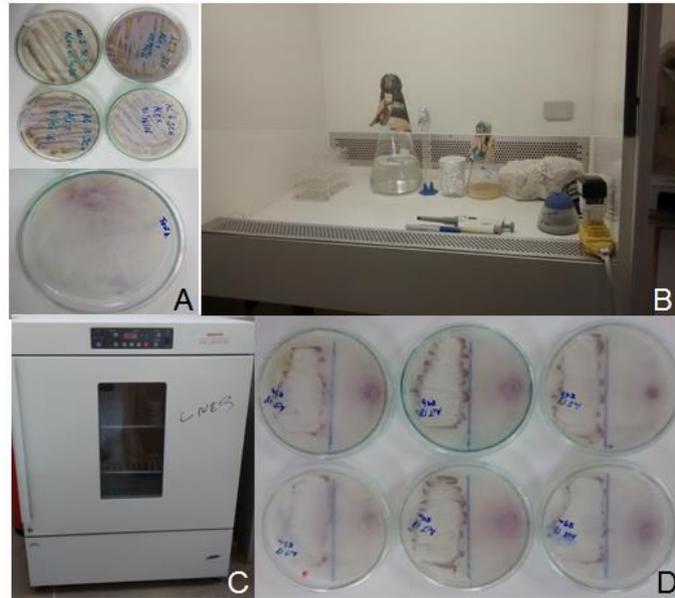
A testemunha consistiu em placas contendo apenas o meio BDA e o disco com meio e micélio de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* colocado a 1 cm da borda da placa.



**Figura 3.** Esquema do pareamento *in vitro* de isolados de actinomicetos no controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. (A-disco contendo micélio e esporos do fungo; B-Actinomicetos esgotados em estrias múltiplas).

O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com sete tratamentos (Tabela 1) e quatro repetições, sendo cada repetição duas placas de Petri, considerando-a como uma parcela experimental. Foi armazenado em câmara de germinação à temperatura de 25

°C, por um período de 10 dias (Figura 4), sendo feita as medições a cada 2 dias.



**Figura 4.** Esquema geral do pareamento *in vitro* de actinomicetos no controle de *F. oxysporum* f. sp. *cubense*. (A- isolados de actinomicetos e *Fusarium*; B- capela de fluxo laminar, para montagem do pareamento; C- pareamento realizado; D- câmara incubadora para armazenamento).

**Tabela 1.** Disposição das unidades experimentais no pareamento *in vitro* do *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* e isolados de actinomicetos (Ac).

Tratamentos	Descrição
T0	<i>F. oxysporum</i>
T1	Ac I* + <i>F. oxysporum</i>
T2	Ac II + <i>F. oxysporum</i>
T3	Ac III + <i>F. oxysporum</i>
T4	Ac IV + <i>F. oxysporum</i>
T5	Ac V + <i>F. oxysporum</i>
T6	Ac VI + <i>F. oxysporum</i>
T7	Ac VII + <i>F. oxysporum</i>

\*Denominação dos isolados de actinomicetos.

Para avaliar o potencial de antagonismo dos isolados de actinomicetos, foram realizadas medições do diâmetro da colônia do fungo com auxílio de uma régua milimetrada, em dois sentidos transversais, obtendo-se a média do seu crescimento micelial. Em seguida, foi calculada a percentagem de inibição (% I) do *F. oxysporum* dos tratamentos em relação à testemunha, utilizando a seguinte fórmula de EDGINGTON *et al.* (1971):

$$%I = \frac{(C - T)}{C} \times 100\%$$

$%I$  = Percentagem de inibição;

$C$  = Diâmetro do crescimento micelial da testemunha

$T$  = Diâmetro do crescimento micelial do tratamento.

### **3.5 Análise estatística**

Os resultados obtidos foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade, utilizando-se o programa estatístico ASSISTAT beta 7.7.

#### 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os isolados de actinomicetos usados no pareamento *in vitro* inibiram o crescimento do fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* (tabela 2). O desenvolvimento da colônia fúngica sob todos os tratamentos apresentaram-se abaixo da testemunha.

**Tabela 2.** Área de crescimento do *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* frente isolados de actinomicetos oriundo do Cerrado.

Isolado	2 dias	4 dias	6 dias	8 dias	10 dias
	-----Área (cm <sup>2</sup> )-----				
Test.	7,04 a	24,52 a	42,49 a	51,91 a	61,41 a
Ac. I	2,21 d	8,76 d	18,54 d	26,74 b	30,32 bc
Ac. II	2,20 d	9,40 d	21,51 d	30,05 b	34,25 b
Ac. III	5,44 bc	18,81 b	28,71 bc	26,41 b	26,41 bc
Ac. IV	5,49 bc	18,81 b	30,08 b	28,60 b	28,60 bc
Ac. V	5,95 b	17,67 b	27,41 bc	28,98 b	28,98 bc
Ac. VI	4,58 c	14,33 c	22,93 cd	24,29 b	24,29 c
Ac. VII	5,71 b	18,93 b	29,32 b	27,53 b	27,53 bc
Test F	75,74**	71,17**	34,33**	48,85**	49,56**
CV (%)	8,36	7,67	9,02	8,24	10,37

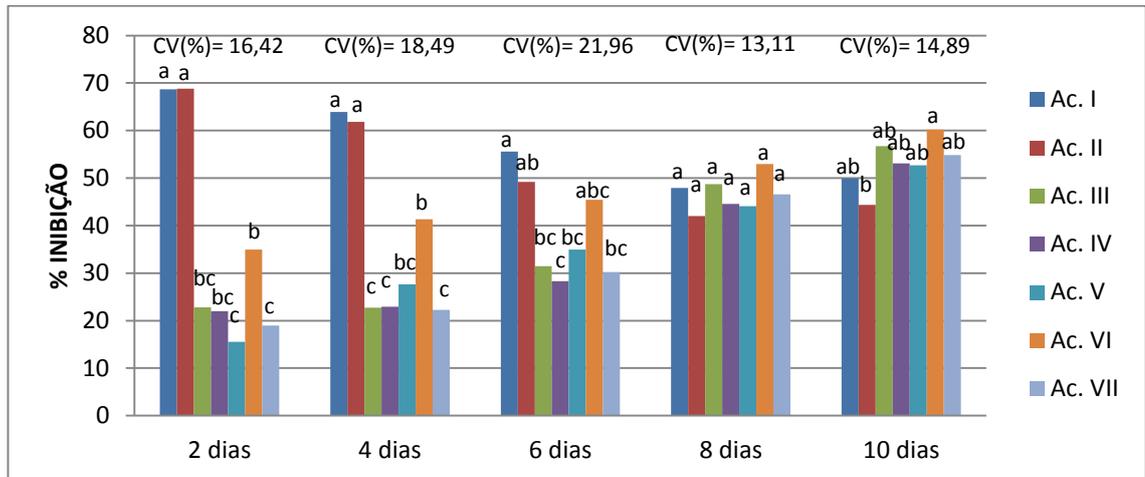
\*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey (5%) e \*\*(1%) de probabilidade.

Até o sexto dia de avaliação os tratamentos Ac.I e Ac.II tiveram os menores resultados, sendo 18,54 e 21,51 cm<sup>2</sup> respectivamente, os quais correspondem a 56,37% e 49,38% a menos que a testemunha.

No último dia avaliado (10 dias) os T-Ac.I (30,32 cm<sup>2</sup>), T-Ac.III (26,41 cm<sup>2</sup>), T-Ac.IV (28,6 cm<sup>2</sup>), T-Ac.V (28,98 cm<sup>2</sup>), T-Ac.VI (24,29 cm<sup>2</sup>) e T-VII (27,53 cm<sup>2</sup>) foram os que obtiveram os melhores resultados, ou seja, reduziram significativamente o crescimento do *Fusarium* em 50,6%, 57%, 53,4%, 52,8%, 60,4%, 55,2% respectivamente, quando comparado com a testemunha.

Quanto a taxa de inibição, todos os actinomicetos usados apresentaram valores que variaram de 44% a 60% aos 10 dias de avaliação (Figura 5, a seguir). Os tratamentos que obtiveram as maiores taxas de inibição foram

Ac.VI com 60,23%, T-Ac.I (49,91%), T-Ac.III (56,69%), T-Ac.IV (53,12%), T-Ac.V (52,72%) e T-Ac.VII (54,84%), em relação a testemunha.



**Figura 5.** Comportamento dos isolados de actinomicetos frente a inibição do crescimento micelial do *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*.

O antagonismo dos isolados de actinomicetos sobre o *F. oxysporum* f. sp. *cubense* provavelmente se deve ao mecanismo de antibiose. Silva *et al.* (2013) usando isolados de actinomicetos oriundos de plantas nativas do cerrado frente a *F. oxysporum* f. sp. *Passiflorae* obtiveram taxa de inibição que variam de 27,59% a 35,85%, os quais foram abaixo do encontrado na pesquisa (44 a 60%).

Esses autores relatam o fato dos actinomicetos apresentarem características de produzirem antibióticos antifúngicos, que por sua vez impedem o crescimento micelial do fungo fitoparasita.

Alves *et al.* (2013) avaliando o potencial antagonista de 80 isolados, de bactérias e actinomicetos, *in vitro* por meio do método de culturas pareadas, verificaram a eficiência dos isolados Act.336, B.1433 e Act.9 sobre o fungo *Fusarium verticillioides*, onde inibiram o crescimento do fitopatógeno em 66,9%, 53,1% e 51,9% respectivamente.

Spadari *et al.* (2010) relatam que a ocorrência dos halos de inibição nos ensaios *in vitro* depende do nível de difusão do composto que o isolado de actinomiceto produz no meio sólido. Isso explica a diferença nos dados encontrados no presente trabalho, onde os isolados apresentaram variação na porcentagem de inibição do fungo.

Outro fato a ser discutido é que os isolados de actinomicetos testados no presente trabalho obtiveram efeito positivo na inibição do agente etiológico do mal-do-Panamá devido, provavelmente, a produção de substâncias com ação fungistática ao fitopatógeno.

Porém, isso não descarta a necessidade de testes em campo para avaliar a eficiência desses microrganismos em um outro substrato, como o solo rizosférico. Gava (1998) relata que além das diferenças intrínsecas que ocorrem entre as espécies de actinomicetos, outras características do ambiente como pH, temperatura e disponibilidade de nutrientes, pode interferir na quantidade, bem como a composição dos metabolitos produzidos. Isso, por sua vez, pode afetar a eficiência desses microrganismos no controle de doenças fitopatogênicas.

## 5 CONCLUSÃO

Todos os actinomicetos testados no pareamento *in vitro* reduziram o crescimento micelial do fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, mostrando-se promissores como possíveis agentes de biocontrole do mal do Panamá.

Os actinomicetos apresentaram valores de taxas de inibição maior que 44%, sendo os maiores obtidos pelos tratamentos Ac.I (49,91%), Ac.III (56,69%), Ac. IV (53,12%), Ac.V (52,72%), Ac.VII (54,84%) e Ac.VI (60,23%).

## REFERÊNCIAS

AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**, 3 ed., New York: Academic Press, 1988, 803p.

ALVES, E. N. T.; MARRIEL, I. E.; OLIVEIRA, C. A.; COSTA, R. V.; COTA, L. V.; SILVA, D. D.; MATTOS, B. B.; VERDOLIN, A. L. G. Seleção de Microrganismos Antagonistas para Biocontrole de *Fusarium verticillioides* na Cultura do Milho (*Zea mays L.*). Sete Lagoas: **Embrapa Milho e Sorgo**, 2013. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, ISSN 1679-0154;75).

ARASU, M. V.; DURAIKANDIYAN, V.; AGASTIAN, P.; IGNACIMUTHU, S. In vitro antimicrobial activity of *Streptomyces* spp. Eri-3 isolated from western ghats rock soil (India). J. Mycol. Méd./J. Med. Mycol. 2009;19(1):22-28.

BETTIOL, W. Componentes do Controle biológico de doenças de plantas. In: BETTIOL, W. (Org.). **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: Embrapa-Cnpda, 1991. 338p. (Embrapa-Cnpda. Documentos, 15).

BOREM, A. **Pequeno glossário de termos agrônômicos**. Viçosa: A. Borém. 1998. 169p.

BORGES, A. J. S.; TRINDADE, A. V.; MATOS, A. P.; PEIXOTO, M. F. S. Redução do mal-do-panamá em bananeira-maçã por inoculação de fungo micorrízico arbuscular. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.42, n.1, p.35-41, jan. 2007.

CÁRDENAS, J. **Selección de vitroplantas provenientes de microsecciones de banana de la variedad Gros Michel (AAA) resistentes a la raza 1 del Mal de Panamá (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*)**. Tese Mag. Sc. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 107 p. 2001.

CARDOSO, E. J. B. N.; FREITAS, S. S. A Rizosfera. In: CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, S. M.; NEVES, M. C. P., (Ed.). **Microbiologia dos Solos**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. P.41-58.

CARDOSO, K. G. V. **Rizobactérias promotoras do Crescimento de Mudanças Micropropagadas de Bananeira e Agentes de Biocontrole do Mal-do-panamá**. Tese (Mestrado). Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – Programa de Pós-graduação em Microbiologia. Cruz das Almas – Ba, 2010.

CORDEIRO, Z. J. M. BANANA: Fitossanidade. **Embrapa Mandioca e Fruticultura** (Cruz das Almas – Ba). – Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 2000. (Frutas do Brasil; 8).

CORDEIRO, Z. J. M.; KIMATI, H. DOENÇAS DA BANANEIRA. In: Manual de Fitopatologia, 3 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. 2v.:il. (ISBN 85-318-0008-0)

CORDEIRO, Z. J. M.; MATOS, A. P.; FILHO, P. E. M. Doenças e métodos de controle. In: Borges, A. L.; Souza, L. S. **O cultivo da Bananeira**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004. 279p.

DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. II. Production of volatile antibiotics. **Transactions British Mycological Society**, Manchester, v. 57, n. 11, p. 41-48, 1971.

EDGINGTON, L.V.; KNEW, K.L.; BARRON, G.L. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. **Phytopathology**, St. Paul, v.61, n.1, p.42-44, 1971.

FIALLOS, D. F. L. **Uso de bacterias endofíticas para el control biológico del Mal de Panamá (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*) en el cultivos Gros Michel (AAA)**. Tese (*Magister scientiae*). Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza – Turrialba, Costa Rica, 2009.

GAVA, C. A. T. **Seleção de estreptomicetos para controle biológico de *Ralstonia solanacearum* e *Erwinia carotovora***. 1998. 114f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Curso de Pós-graduação em Produção Vegetal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

GOTTLIEB, D. General consideration and implications of the actinomycetales. In: SYKES, G.; SKINNER, F. A. (Eds.). **Actinomycetales: Characteristics and practical importance**. London: Academic Press. p.1-10, 1973.

MATSUMOTO, K.; BARBOSA, M.L.; COPATI SOUZA, L.A.; TEIXEIRA, J.B. *In vitro* selection for *Fusarium* wilt resistance in banana. II. Resistance to culture filtrate of race 1 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Fruits* 54(3):151-157. 1999.

OLIVEIRA, S. M. de; SILVA, D. F. da.; SANTOS, I. N. dos; CORRÊA, C. V. P.; LIBERAL, T. C. F.; BRANCO, F. L. C.; COLARES, C. N. J.; ESCHER, S. K. S.; ISHIDA, J. K.; MUI, T. S.; ARAÚJO, J. M. de; AMORIM, E. L. C. de. Prospecção de enzimas de interesse industrial produzidas por actinobactérias isolado de solo na Amazônia. **Scientia Plena**. Vol.13, n.03, 2017. doi: 10.14808/sci.plena.2017.031001.

ORJEDA, G. Evaluation of Musa germplasm for resistance to Sigatoka diseases and Fusarium wilt. Montpellier, Francia. **INIBAP** (International Network for Improvement of Banana and Plantain). p. 19-29. 1998.

PEREIRA, J. C. R.; GASPAROTTO, L.; COELHO, A. F. S.; VÉRAS, S. M. **Doenças da Bananeira no Estado do Amazonas (3º Edição Revisada)**. EMBRAPA, Manaus-AM. Dez, 2003. (Circular Técnica 20, ISSN 1517-2449).

ROCHA, D. J. A.; MOURA, A. B. Controle biológico da murcha do tomateiro causada por *Ralstonia solanacearum* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* por rizobactérias. **Tropical Plant Pathology**, vol. 38(5):423-430, 2013.

SILVA, J. M.; RUARO, L.; MALAFAIA, G.; PAZ-LIMA, M. L. Seleção *in vitro* populações de microrganismos antagonistas e relacionamento contra a Fusariose-do-feijoeiro (*Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*). **Gl. Sci. Technol**, Rio Verde, v.08, n. 01, p. 96-109, jan/abr. 2015.

- SILVA, J. S.; COIMBRA, J. L.; TAVARES, D. G.; AFONSO, G. O. Inibição in vitro crescimento micelial do fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* utilizando isolados de actinomicetos obtidos da rizosfera de plantas nativas do cerrado baiano. **Natureza on line** 11(1): 15-19, 2013.
- SILVA, V. M. A.; BRITO F. A. E. de; RAMOS, K. A.; SILVA, R. M. de; MARTINS, C. M.; MARTINS, S. C. S. Atividade enzimática de actinobactérias do semiárido (Enzymatic activity of actinobacteria from semiarid). **R. Bras. Geogr. Fís.** 2015; 8:560-572.
- SIQUEIRA, J. O.; FRANCO, A. A. **Biotecnologia do solo: fundamentos e perspectivas.** Brasília: MEC, 1988. 236p.
- SOARES, A. C. F.; SOUSA, C. S.; GARRIDO, M. S. *Streptomyces* antagonism against *Cladosporium fulvum* Cooke and *Fusarium ocysporium* f. sp. *lycopersici*. **Ciência Rural** 39: 1897-1900. 2009.
- SPADARI, C. de C.; VAN DER SAND, S. T. **Atividade antifúngica de actinomicetos frente a isolados de *Bipolaris sorokiniana*.** Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade federal do Rio Grande do Sul. Bacharelado em Ciências Biológicas. Porto Alegre – RS. 2010.
- STOVER, R. H. **Banana Plantain and Abaca Diseases.** Commonwealth: Mycological Institute, 1972. 316p.
- SUTTON, J. C. Strategies for biological control of necrotrophic pathogens in perennial crops. **Fitopatologia Brasileira**, v.25, p.235-238, 2000.
- TOKESHI, H. Doenças e pragas agrícolas geradas e multiplicadas pelos agrotóxicos. **Fitopatologia Brasileira**, v.25, p.264-271, 2000.
- VENTURA, M.; CANCHAYA, C.; TAUCH, A.; CHANDRA, G.; FITZGERALD, G. F.; CHATER, K. F.; SINDEREN, van.D. Genomics of *Actinobacteria*: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v.71, n.3, p.495-548, 2007.
- WILLIAMS, S. T. Are antibiotics produced in soil? **Pedobiologia**, Jena, v.23, p.427-453, 1982.
- WILLIAMS, S. T.; VICKERS, J. C. The ecology of antibiotic production. **Microbiology Ecology**, New York, v.12, p.43-52, 1986.