

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA  
CURSO DE MESTRADO**

***Bacillus* spp. E *Trichoderma asperellum* NO BIOCONTROLE DE  
*Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae***

**MARÍLIA DE JESUS FERREIRA**

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA  
DEZEMBRO- 2021**

***Bacillus* spp. E *Trichoderma asperellum* NO BIOCONTROLE DE  
*Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae***

**MARÍLIA DE JESUS FERREIRA**

Bacharel em Ciências Biológicas

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2011

Dissertação submetida ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e Embrapa Mandioca e Fruticultura, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Microbiologia Agrícola.

Orientador: Dr. Fernando Haddad

Coorientador: Dr. Harllen Sandro A. Silva

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA**

**DEZEMBRO- 2021**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA  
AGRÍCOLA  
CURSO DE MESTRADO**

**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE  
MARÍLIA DE JESUS FERREIRA**



---

Prof. Dr. Harllen Sandro Alves Silva  
Embrapa Mandioca e Fruticultura  
(Coorientador)



---

Prof. Dr. Carlos Augusto Dórea Bragança  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia



---

Profa. Dra. Leilane Silveira D'Ávila  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

“Dissertação homologada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola em \_\_\_\_\_ conferindo o grau de Mestre em Microbiologia Agrícola em \_\_\_\_\_.”

## AGRADECIMENTOS

A Deus toda honra e glória, por ter chegado até aqui. Por todas dificuldades vencidas, por ser meu pilar nos momentos mais difíceis, e por permitir a conclusão desse sonho.

Aos meus pais José e Maria, que me deram apoio e incentivo nas horas difíceis. Amo vocês.

Meus agradecimentos a minha irmã Lívia, pelo amor, paciência e momentos de muita fé, e por ter contribuído para que a conclusão deste curso se tornasse realidade.

Aos meus avós Madalena e Martiniano (*in memoriam*), por tanto amor e ensinamentos ao longo desses anos.

Ao meu cunhado Gilvan, que se tornou um grande amigo e irmão, que nos momentos de maior fragilidade e dificuldade foi sustento, com sua enorme sabedoria.

À Embrapa Mandioca e Fruticultura pela infraestrutura e recursos fornecidos.

Ao meu orientador Dr. Fernando Haddad por toda orientação e conhecimento transmitido.

Ao meu coorientador, Dr. Harllen Sandro Alves Silva, pela orientação, compreensão, disponibilidade e por todas contribuições.

À Leandro de Souza Rocha, por toda contribuição, ensinamentos e compreensão no desenvolvimento do projeto.

À Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e aos professores do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, por todo conhecimento transmitido.

Ao Instituto Federal Baiano pela concessão do Afastamento e suporte e incentivo para cursar o Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola.

Aos meus colegas do laboratório de Fitopatologia da Embrapa, em especial Mariana, Danilo, Flávia, Mateus e Luana por tantos momentos de apoio, compartilhamento de conhecimentos, ajuda e orientação.

À Sidnara e Lucas, por todo suporte na execução e ensinamentos.

## ÍNDICE

### RESUMO

### ABSTRACT

### INTRODUÇÃO GERAL ..... 9

### CAPITULO I

#### Revisão de Literatura

1.A Cultura do maracujazeiro ..... 12

2.Murcha de *Fusarium* no maracujazeiro ..... 14

2.1. O fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* ..... 17

3. Manejo da fusariose ..... 18

3.1 *Trichoderma* spp. como agente de biocontrole ..... 20

3.2. *Bacillus* spp. como agente de biocontrole ..... 23

Referências ..... 28

### CAPÍTULO II

#### ***Bacillus* spp. e *Trichoderma asperellum* no biocontrole de *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae***

RESUMO ..... 40

ABSTRACT ..... 41

INTRODUÇÃO ..... 42

MATERIAL E MÉTODOS ..... 43

Avaliação de antagonismo em teste de pareamento direto ..... 44

Produção de compostos orgânicos voláteis e atividade antifúngica ..... 46

Produção de compostos orgânicos não-voláteis e efeito sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* ..... 47

Produção de enzimas hidrolíticas por isolados bacterianos e características antimicrobianas..... 47

Deteção da produção de sideróforos ..... 48

Análise estatística ..... 49

RESULTADOS E DISCUSSÃO ..... 49

Avaliação de antagonismo em teste de pareamento direto ..... 49

Produção de Compostos Orgânicos Voláteis (COVs) e atividade antifúngica ....53

Produção de compostos orgânicos não-voláteis e efeito sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae*..... 57

Produção de enzimas líticas e sideróforos por isolados bacterianos ..... 58

CONCLUSÃO ..... 62

REFERÊNCIAS ..... 63

## RESUMO

FERREIRA, M. J. *Bacillus* spp. e *Trichoderma asperellum* no biocontrole de *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae*. Cruz das Almas, Bahia, 2021. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

O maracujá amarelo (*Passiflora edulis*) é uma frutífera de grande importância econômica, com ampla distribuição em regiões tropicais. O Brasil assume o ranking de maior produtor e consumidor de maracujá do mundo, com 95% das áreas cultivadas destinadas a comercialização. A expansão das áreas de cultivo tem promovido o aumento expressivo de problemas fitossanitários. A murcha de *Fusarium* ou fusariose, causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* (Fop) tem sido caracterizada como a principal doença fúngica que acomete os pomares da fruteira, o que implica na redução significativa da produtividade, em decorrência da severidade da doença. Diante da grande dificuldade de controle e da baixa eficiência dos defensivos químicos, tem-se buscado medidas alternativas que visam integrar o manejo da fusariose. O presente estudo avaliou o potencial antagonístico de isolados de *Bacillus* spp. e *Trichoderma asperellum* para o biocontrole de *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* e identificação da atividade enzimática relacionada à ação antifúngica. Foram realizados ensaios *in vitro*, para avaliação de antagonismo em teste de pareamento direto, produção de metabólitos voláteis, produção de compostos orgânicos não-voláteis, produção de enzimas líticas bacterianas e sideróforos. Nos testes de antagonismo direto, os isolados de *Bacillus* spp., Bac2, Bac3, Bac4, Bac5, Bac6, APC51, AP07, PA05, 01C e 399, e *T. asperellum* inibiram significativamente o crescimento de Fop. Em relação aos efeitos dos Compostos Orgânicos Voláteis emitidos por *Bacillus* spp., não houve efeito supressivo sobre o crescimento micelial de *Fusarium oxysporum passiflorae*, apenas *Trichoderma asperellum* exibiu efeito antagonístico significativo, com a média de inibição micelial de 53%. Os isolados bacterianos produziram e secretaram enzimas líticas e sideróforos. A avaliação da antibiose evidenciou que *Bacillus* spp. e *T. asperellum* possuem potencial antagonista no crescimento de *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae*, inviabilizando sua atividade patogênica *in vitro*, comportando-se como potenciais agentes de controle biológico.

**Palavras-chave:** Controle biológico, antagonismo, *Passiflora edulis*, fusariose.

## ABSTRACT

FERREIRA, M. J. ***Bacillus* spp. and *Trichoderma asperellum* isolates in the biocontrol of *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae*.** Cruz das Almas, Bahia, Brazil. 2021. Dissertation (Master in Agricultural Microbiology). Federal University of the Recôncavo of Bahia.

The yellow passion fruit (*Passiflora edulis*) is a fruit of great economic importance, with wide distribution in tropical regions. Brazil ranks as the largest producer and consumer of passion fruit in the world, with 95% of cultivated areas destined for commercialization. The expansion of the cultivated areas has promoted the expressive increase of phytosanitary problems. *Fusarium wilt*, caused by the fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* (Fop), has been characterized as the main fungal disease that affects the orchards of this fruit, which implies a significant reduction in productivity due to the severity of the disease. In view of the great difficulty of control and the low efficiency of chemical pesticides, alternative measures have been sought that aim to integrate the management of *Fusarium*. The present study evaluated the antagonistic potential of *Bacillus* spp. and *Trichoderma asperellum* isolates for the biocontrol of *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* and the identification of the enzymatic activity related to the antifungal action. In vitro assays were performed to evaluate antagonism in direct pairing test, production of volatile metabolites, production of non-volatile organic compounds, production of bacterial lytic enzymes and siderophores. In direct antagonism tests, *Bacillus* spp. isolates, Bac2, Bac3, Bac4, Bac5, Bac6, APC51, AP07, PA05, 01C and 399, and *T. asperellum* significantly inhibited the growth of Fop. Regarding the effects of Volatile Organic Compounds emitted by *Bacillus* spp. there was no suppressive effect on the mycelial growth of *Fusarium oxysporum passiflorae*, only *Trichoderma asperellum* exhibited significant antagonistic effect, with the average mycelial inhibition of 53%. The bacterial isolates produced and secreted lytic enzymes and siderophores. The evaluation of the antibiosis showed that *Bacillus* spp. and *T. asperellum* have antagonistic potential on the growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae*, preventing its pathogenic activity in vitro, behaving as potential biological control agents.

**Keywords:** Biological control, antagonism, *Passiflora edulis*, fusarium.



## INTRODUÇÃO GERAL

O maracujá amarelo, *Passiflora edulis* Sims, está entre as fruteiras tropicais mais consumidas no mundo. O Brasil se destaca como o maior produtor e consumidor do fruto, responsável pelo abastecimento do mercado nacional e internacional (Cauz-Santos et al. 2017). Em 2019 a produção brasileira alcançou a média anual de 593.429 mil toneladas, em uma área correspondente a 41.800 hectares, com a maior parte da produção concentrada na região Nordeste.

Devido suas condições edafoclimáticas, para o desenvolvimento da fruticultura, o estado da Bahia se destaca como o maior produtor da cultura, com a produção de 168.457 mil toneladas em uma área colhida de 15.616 hectares (IBGE 2019). Devido suas propriedades organolépticas e seu alto valor nutricional, o maracujá apresenta grande aceitabilidade no mercado internacional (Li et al. 2021).

No entanto a produtividade do maracujá enfrenta grandes limitações, pois o cultivo em determinadas regiões apresenta-se inviabilizado, devido a existência de doenças fúngicas (Pacheco et al. 2016, Pinheiro et al. 2016), forçando a migração da cultura para áreas de cultivo sem histórico de ocorrência de fitopatógenos, pois o cultivo dessa fruteira corresponde a uma das mais importantes cadeias produtivas nacionais, conferindo geração de empregos e renda para a agricultura familiar, vinculada a pequenas propriedades rurais (Pinheiro et al. 2016).

Dentre as doenças de importância econômica, que afetam os maracujazeiros destaca-se a fusariose ou murcha de *Fusarium*, causada pelo agente etiológico *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* (Fop), um dos fitopatógenos mais abundantes do solo, responsável por causar danos severos na produtividade de culturas de importância agrícola (Cerqueira-Silva et al. 2015).

Ao colonizar os vasos xilemáticos, o acúmulo de hifas e conídios pelo fungo (Okungbowa & Shittu 2014, Ortiz et al. 2014) causa a obstrução e o colapso do sistema vascular, impedindo a translocação de água e nutrientes, que com o progresso da doença desencadeia a murcha, com queda de folhas e frutos, surgimento de raízes adventícias e morte da planta (Amorim; Rezende; Bergamin Filho 2011).

A sua capacidade de sobrevivência no solo por longo período, sob a forma de clamidósporos, o torna um fitopatógeno de difícil controle (Anusha et al. 2019,

Fischer & Rezende 2008). Uma vez o solo infestado por *Fusarium oxysporum*, a remoção do inóculo da área contaminada torna-se uma condição impossível (Zhao et al. 2017), corroborando para a importância da adoção de medidas preventivas, de forma a evitar a entrada do patógeno na área de cultivo.

A ausência de resultados satisfatórios no uso de defensivos químicos, associada a existência de fatores de contaminação ambiental, têm promovido a adoção de práticas de manejo e introdução da genética de resistência para o desenvolvimento de cultivares resistentes (Miguel-Wruck et al. 2021) de modo a controlar a propagação do fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae*. No entanto, estes métodos sofrem algumas limitações, em função da indisponibilidade de cultivares resistentes para a espécie *Passiflora edulis* e de características do patógeno. Deste modo, o uso de agentes de controle biológico (BCAs) surge como uma alternativa sustentável e segura de proteção às culturas no gerenciamento de doenças de plantas.

A escassez de dados bibliográficos referente a estudos desenvolvidos sobre seleção e uso de agentes antagonistas no controle biológico de *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae*, corrobora para que seja avaliado o potencial antagonista de microrganismos para possível controle da doença. O objetivo do presente estudo foi avaliar o antagonismo de isolados de *Bacillus* spp. e *Trichoderma asperellum* no controle do patógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae*, agente etiológico da fusariose em maracujazeiros.

---

# **CAPÍTULO I**

## **Revisão de Literatura**

---

## 1. A Cultura do maracujazeiro

Com ampla distribuição geográfica, em países de clima tropical e subtropical, a família *Passifloraceae* é composta por aproximadamente 700 espécies (Cauz-Santos et al. 2017), subdivididas em 18 gêneros, das quais mais de 150 espécies são nativas do Brasil, destacando-se entre elas, a espécie, mais cultivada, *Passiflora edulis* Sims (Meletti 2011, Pacheco et al. 2016, Silva; Duarte; Barrozo 2017, Lima 2019b, Santos et al. 2021), popularmente conhecida como maracujá-amarelo ou azedo (Oluocha; Nyabogaa; Bargulb 2018).

A espécie *Passiflora edulis* Sims (maracujá-amarelo) é cultivada comercialmente em países como o Brasil, Equador, Venezuela e Colômbia (Fischer & Rezende 2008). *Passiflora edulis* é a espécie com maior representatividade na produção brasileira, correspondente a 95% dos pomares cultivados em todo país (Spadotti et al. 2019), que confere ao Brasil o destaque de maior produtor e consumidor de maracujá do mundo (Pacheco et al. 2016).

A produção do maracujá amarelo, a nível de escala comercial, teve início na década de 1970, a partir da ampliação das áreas cultivadas, seguida da implantação de agroindústrias destinadas ao beneficiamento da fruta e da estruturação do sistema de produção. A expansão dos pomares comerciais foi proporcionada pelo aumento do cultivo em pequenas propriedades rurais, apoiada na intensa participação da agricultura familiar na atividade agrícola, o que conferiu à fruticultura um importante papel social e econômico, ao promover a geração de uma alta taxa de empregabilidade da mão de obra rural (Meletti 2011, Corrêa et al. 2016).

A cultura apresenta grande destaque na cadeia agroindustrial, desde a fase de produção de mudas até a comercialização dos frutos e seus subprodutos, principalmente sob a forma de sucos, polpas e princípios ativos, destinados à indústria farmacêutica, cosmética e alimentícia (Costa et al. 2016, Pacheco et al. 2016).

Em função do seu grande valor nutricional e sabor diferenciado, cerca de 40% da produtividade é destinada à produção de sucos (Silva; Duarte; Barrozo 2017). Características como fontes de fibras, elevado teor de vitaminas B e C, niacina, compostos polifenólicos e potencial antioxidante, são responsáveis por agregar grande valor ao fruto consumido (He et al. 2020, Li et al. 2021). A crescente

demanda do produto no mercado interno tem sido desencadeada pela maior aceitabilidade e inclusão da espécie na alimentação do brasileiro. O aumento do consumo é responsável por absorver a maior parte da produção, o que reflete no aumento significativo da instalação de pomares em diversas regiões do país, as quais possuem características propícias para a exploração da cultura (Lan et al. 2020).

A produção de maracujá no Brasil em 2019 correspondeu a 593.429 toneladas, cultivada em uma área de 41.584 hectares, onde a produtividade alcançou o índice de 14 toneladas por hectares, concentrando-se, principalmente, na região Nordeste, com destaque para o estado da Bahia que atingiu a produção de 168.457 toneladas (IBGE 2019).

No entanto, nos últimos anos, a cultura tem enfrentado um expressivo decréscimo na produtividade e na permanência dos pomares em distintas áreas de produção, o que tem gerado redução da vida útil, período que antes alcançava a estimativa de cinco anos de produção. Fatores como a ocorrência de doenças, ocasionadas por vírus, bactérias, fungos e nematoides, associadas à presença de variedades suscetíveis, estão entre as condições responsáveis por desencadear esse panorama (Fischer & Rezende 2008, Bonfim et al. 2010, Oliveira et al. 2013, Cerqueira-Silva et al. 2015).

Com o aumento da incidência de problemas fitossanitários, a cultura passou a exibir caráter itinerante, com recorrentes migrações das áreas tradicionais de cultivo para áreas sem histórico de ocorrência da doença (Meletti 2011). O crescente aumento da demanda interna associado ao enfrentamento de problemas na produção agrícola, levou o país, em 2017, a ampliar seu comércio de importação de maracujá, integrando o Peru à lista de fornecedores, juntamente com o Equador e a Colômbia (Altendorf 2018).

Dentre as principais doenças, de importância econômica, que afetam a cultura do maracujazeiro em distintas regiões brasileiras, recebem destaque: a bacteriose, causada por *Xantomonas axonopodis* pv. *passiflorae*; o endurecimento dos frutos, por *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV); a fusariose, por *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* e *Fusarium solani* (*Nectria haematococca*); a verrugose, por *Cladosporium* sp.; podridão do colo, causada por *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* e antracnose, por *Glomerella cingulata* (Peruch; Colariccio; Batista 2018).

## 2. Murcha de *Fusarium* no maracujazeiro

As murchas vasculares correspondem a um importante grupo de doenças causadas por patógenos habitantes do solo, responsáveis por impactar na manutenção e produção de importantes culturas agrícolas, que culminam em grandes perdas econômicas (Carrer Filho; Dianese; Cunha 2015, Coque et al. 2020). A murcha de *Fusarium* ou fusariose causada pelo agente etiológico *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* (Fop) é responsável por causar grandes danos na cultura do maracujazeiro, ao interferir na sua produtividade (Peruch; Colariccio; Batista 2018).

A fusariose se apresenta como uma doença difícil de ser detectada precocemente, pois os sintomas iniciais são observáveis tardiamente quando o sistema radicular e vascular já se encontram bastante comprometidos, muitas vezes similares à outras doenças (Viana et al. 2003).

A ocorrência da murcha de *Fusarium* em pomares de cultivo de maracujá foi reportado pela primeira vez no estado australiano de Queensland, no ano de 1951 (Mcknight 1951). Em território brasileiro, os primeiros relatos da doença ocorreram em 1968, em propriedades localizadas na cidade de São Paulo, com posteriores identificações nas cidades do Rio de Janeiro, Espírito Santo e Tocantins (Fischer & Rezende 2008). A alta incidência da doença em pomares brasileiros ocasionou perdas significativas na produtividade ao longo dos anos, principalmente por se tratar de um país com predominância de clima e temperaturas favoráveis, que possibilitam condições para o patógeno atingir alta densidade de inóculo em áreas cultiváveis. De modo geral, a doença é potencializada em temperaturas em torno de 28 °C, e tem seu progresso retardado em valores acima de 34 °C ou em temperaturas inferiores a 17 °C (Joshi 2018).

O cultivo em campos infestados se torna uma condição inviável, pois o patógeno pode sobreviver saprofiticamente, associado a restos culturais ou sob a forma de estruturas de resistência, os clamidósporos, que na ausência de um hospedeiro específico podem permanecer no solo, de forma latente, por mais de 10 anos, sujeitos às intempéries ambientais e ações bióticas até iniciar seu processo de colonização, sob a forma de inóculo primário para novos plantios (Fischer & Rezende 2008, Ortiz & Hoyos-Carvajal 2016, Pinheiro et al. 2016, Anusha et al. 2019).

Os clamidósporos, presentes na rizosfera, tendem a germinar quando encontram condições nutricionais favoráveis, como a liberação de exsudatos radiculares pelas plantas hospedeiras ou hospedeiros alternativos (McGovern 2015). A escolha por hospedeiros alternativos fornece condições importantes para a manutenção das estruturas de resistência por longo prazo (Pegg et al. 2019). A ação de microrganismos supressores, por meio de compostos fungistáticos, também exerce influência no processo germinativo dos clamidósporos, ao inviabilizar a germinação ou promover lise dos tubos germinativos recém-formados (Gordon 2017).

A disseminação do patógeno ocorre de forma eficiente, pois os esporos podem ser veiculados por meio de métodos de irrigação, contato entre raízes saudáveis e infectadas, práticas culturais, uso de materiais propagativos e equipamentos contaminados (Pinheiro et al. 2016, Joshi 2018). A penetração do patógeno ocorre por meio das zonas de crescimento radicular e ferimentos decorrentes da ação de tratamentos culturais e/ou nematoides (Viana et al. 2003). A presença de fitonematoides em áreas de cultivo de maracujá foi identificada como fatores associados à suscetibilidade das espécies à infecção de *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* (Miguel-Wruck et al. 2021).

A colonização por *F. oxysporum* ocorre por meio do reconhecimento radicular, via sinalização dos metabólitos produzidos pela planta hospedeira, seguida da adesão e secreção de enzimas hidrolíticas (Srinivas et al. 2019). Nos estágios iniciais da infecção, as hifas de *Fop* aderem à superfície da raiz e formam um denso micélio, que recobre toda a extensão radicular. Após a penetração das células epidérmicas, as hifas se expandem entre as células parenquimáticas adjacentes e colonizam os vasos xilemáticos, onde o crescimento fúngico se estabelece e o micélio move-se passivamente ao longo dos elementos de vaso, e promove a exsudação de micotoxinas (fumonisinas, ácido fusárico, licomarasmina e ácido desidrofusárico), correspondentes a fatores de virulência (Zhang et al. 2015).

Respostas fisiológicas e bioquímicas, como hipertrofia e hiperplasia de células parenquimáticas, produção de gomas e tiloses, desintegração de tecidos vasculares e formação de cavidades, tendem a surgir de forma precoce em cultivares resistentes, como mecanismo para impedir o estabelecimento da infecção sistêmica (Ortiz et al. 2014, Zhang et al. 2015). As plantas suscetíveis,

tendem a desenvolver uma resposta mais tardia quanto à colonização do fungo, desenvolvendo sintomas mais evidentes (Joshi 2018, Pegg et al. 2019).

Ao longo do sistema vascular infectado é evidenciado o aspecto de coloração ferruginosa, decorrente da oxidação de compostos fenólicos (Ortiz & Hoyos-Carvajal 2016, Preisigke et al. 2017, Santos et al. 2021), e de compostos resultantes da ação enzimática do metabolismo patogênico sobre as células da planta hospedeira (Agrios 2004), caracterizando o estabelecimento de um processo necrótico (Ortiz & Hoyos-Carvajal 2016).

Os sintomas de murcha podem se desenvolver em qualquer estágio fenológico de desenvolvimento da planta. As plantas em estágio de floração tendem a apresentar maior índice de mortalidade (Silva et al. 2017), porém cultivares suscetíveis podem apresentar sintomas no período de 25 dias, após a semeadura, característico da murcha precoce, com a ocorrência de folhas flácidas, seguida da descoloração, dessecação e colapso total da planta (Jiménez-Díaz et al. 2015).

Em mudas, os sintomas iniciais caracterizam-se pela alternância da coloração das folhas, de verde-brilhante para verde pálido, seguida da abscisão das folhas inferiores, e murcha em toda a planta; já as plantas adultas, são acometidas pelo amarelecimento das folhas jovens, seguidas da senescência prematura, seca e morte de ramos ou da planta toda (Fischer & Rezende 2008, Srinivas et al. 2019).

A adoção de cultivares resistentes e enxertia em porta-enxertos configuram-se como alternativas sustentáveis para o manejo de patógenos transmitidos pelo solo, em culturas de maracujá, mas que retratam algumas limitações, pois a resistência não se torna permanente, já que fatores como oscilações e a forte pressão exercida dentro da população, permite que o patógeno supere a resistência da planta hospedeira ao longo do tempo (Ploetz 2005, Carrer Filho; Dianese; Cunha 2015, Khan; Maymon; Hirsch 2017, Nishioka et al. 2019). Mesmo quando o hospedeiro apresenta resistência à ação de *Fusarium* spp., observa-se que as plantas tendem a apresentar uma redução na qualidade e produtividade dos frutos (Meletti 2011), o que não é correspondente às expectativas do mercado, tornando-se um grande desafio para o produtor (Haddad et al. 2018, Marostega et al. 2021).

Com a intensificação da produção e o aumento das áreas de plantio, a incidência de patógenos em áreas cultiváveis tornou-se um problema fitossanitário recorrente, comprometendo a sanidade dos pomares e a produtividade da cultura.



## 2.1. O fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae*

*Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* (Fop) é uma espécie anamórfica (Gordon 2017), pertencente ao filo *Ascomycota*, classe *Ascomycetes*, família *Hypocreaceae* e gênero *Fusarium* (Okungbowa & Shittu 2014). O gênero é classificado como um dos dez principais patógenos fúngicos de plantas, de grande importância científica e econômica no mundo (Dean et al. 2012). Sem identificação de formas teleomórficas, o alto grau de variabilidade intraespecífica presente entre as linhagens de *F. oxysporum* (Dariva et al. 2015), frequentemente, está relacionado à parassexualidade (Leslie 1993), mecanismo não sexual que contribui para a transferência horizontal de genes de patogenicidade (Baayen et al. 2000), e a ocorrência de mutações, que correspondem a importantes mecanismos evolutivos, presentes em populações de fungos anamórficos (Costa et al. 2015, Nirmaladevi et al. 2016).

*Fusarium oxysporum* produz três tipos de esporos assexuados: macroconídios, microconídios e clamidósporos. Os macroconídios são formados a partir de conidióforos ramificados ou esporodóquios; possuem células com paredes delgadas e septadas, em formato fusóide e pontiagudo, medindo  $15\text{--}37,5\ \mu \times 2,5\text{--}4\ \mu$ . Os microconídios, formados em fiáldes simples, possuem forma elipsoidal e não septada, ou com septo único, quando presente, medindo  $2,5\text{--}15\ \mu \times 2\text{--}3\ \mu$ . E por fim, os clamidósporos são estruturas especializadas de resistência, que possuem aspecto globoso, com paredes espessas, lisas ou rugosas; são produzidos isoladamente ou em pares, nas estruturas terminais e intercalares das hifas ou conídios. Os macroconídios ocorrem em maior frequência na superfície de plantas infectadas, já os microconídios estão presentes no micélio aéreo (Fischer & Rezende 2008, Kang et al. 2014, Mcgovern 2015, Ortiz & Hoyos-Carvajal 2016, Gordon 2017).

Os efeitos da patogenicidade de *F. oxysporum* podem ser evidenciados nos processos fotossintéticos e nas relações hídricas de plantas hospedeiras. Plantas de pepino infectadas por *Fusarium oxysporum*, apresentaram redução nas suas taxas fotossintéticas, na condutância estomática, na concentração de dióxido de carbono intercelular e na respiração, culminando em perdas significativas em sua biomassa. A membrana plasmática das células mesofílicas apresentaram lesões características, com presença de inclusões celulares e extravasamento da

membrana celular com perda de água pela via não estomática nas folhas (Wang et al. 2015).

A alta complexidade de *Fusarium oxysporum* dentro das populações lhe confere a capacidade de adaptação e evolução dentro dos patossistemas, o que corrobora para a inserção de práticas de manejo integrado no gerenciamento da doença (Pegg et al. 2019).

### 3. Manejo da fusariose

O controle químico de *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* em culturas de maracujá se mostra muito ineficiente, em função da sua variabilidade genética e capacidade de permanência no solo (Nirmaladevi et al. 2016). No entanto, o uso de fungicida sistêmico com a finalidade de minimizar as infecções causadas por *Fusarium oxysporum* é considerado uma prática muito comum entre os produtores de maracujá (Thangavel et al. 2021). Os fungicidas de amplo espectro tendem a exibir efeitos indesejáveis sobre os microrganismos não alvo, presentes na comunidade microbiológica residente (Mishra et al. 2018).

O uso excessivo de fungicidas químicos em culturas agrícolas são responsáveis por desencadear distúrbios ambientais, como inibição de microrganismos fixadores de nitrogênio e solubilizadores de fósforo (Hussain et al. 2009); desequilíbrio da microflora e microbiota associada à deterioração da fertilidade do solo; impactos na saúde humana por intermédio da cadeia alimentar (Kumar et al. 2021); impactos sobre a produtividade da cultura (Abbas et al. 2019); e o desenvolvimento de cepas patogênicas potencialmente resistentes, que, conseqüentemente, conduz ao aumento do número de aplicações, com implicações econômicas para os agricultores (Baker; Green; Loker 2020).

O desenvolvimento de cultivares resistentes é abordado como a medida de controle mais apropriada para *F. oxysporum* (Nirmaladevi et al. 2016), porém é provido de limitações, decorrente da grande variabilidade genética presente no gênero fúngico. Tal panorama, conduz o controle biológico como um caminho promissor para os sistemas agrícolas, como um método alternativo e sustentável para o manejo integrado de fitopatógenos (Amorim; Rezende; Bergamin Filho 2011), como forma de viabilizar a produção agrícola e atenuar os efeitos deletérios

sobre o meio ambiente (Gava & Menezes 2012, Xu et al. 2020). O controle biológico propõe resultados prolíficos ao atuar em consonância com a implementação de cultivares resistentes na proteção de culturas agrícolas (Lecomte et al. 2016).

O controle biológico, enquanto estratégia de controle de fitopatógenos foi elucidada em 1965, no primeiro simpósio sobre Ecologia de patógenos transmitidos pelo solo (Lecomte et al. 2016). Definido por Baker & Cook (1983), o controle biológico se propõe à “redução na densidade de inóculo ou atividade produtora de doenças de um patógeno realizada por ou através de um ou mais organismos, exceto o homem” (Stenberg et al. 2021), de forma a manter os níveis insuficientes para provocar grandes danos na cultura (Fernandez-San Millan et al. 2021).

Os agentes de bioproteção devem ser provenientes da natureza ou ser idênticos à natureza quando sintetizados; com baixo impacto à saúde e ao meio ambiente, e com capacidade de sobrevivência, colonização e multiplicação no ambiente ou no tecido hospedeiro, de forma a obter sucesso na interação antagônica (Fischer et al. 2010). Os agentes de biocontrole, geralmente, fungos ou bactérias oriundas da rizosfera, filosfera ou endosfera, devem atuar na prevenção da infecção ou no estabelecimento do patógeno nos tecidos do hospedeiro (O’Brien 2017, Thambugala et al. 2020).

Os agentes de biocontrole apresentam mecanismos de interação, que devem ser identificados como forma de potencializar o controle e possibilitar a seleção de linhagens eficientes (Mishra et al. 2018). Os métodos selecionados para a triagem de microrganismos promissores visam abordagens que englobam uma ampla gama de mecanismos relacionados às atividades antagônicas, como produção de metabólitos, competição, parasitismo, utilização de fontes de carbono específicas e atividades enzimáticas antimicrobiana (Rojas et al. 2020).

O desempenho dos agentes de biocontrole é fortemente dependente do nível de tolerância às condições abióticas (Fernandez-San Millan et al. 2021), pois o metabolismo microbiano é sensível a fatores nutricionais e ambientais, os quais são determinantes para a síntese e secreção de metabólitos secundários (Keswani et al. 2019), durante as interações antagônicas.

Os principais microrganismos descritos e utilizados, como promissores agentes de biocontrole, referem-se a fungos e bactérias, detentores de mecanismos benéficos para a proteção e manutenção da sanidade de culturas agrícolas. Destacam-se os gêneros bacteriano: *Bacillus* spp., *Streptomyces* sp. e

*Pseudomonas* sp., e o gênero fúngico, *Trichoderma* spp. (Moreira; Nesi; May De Mio 2014, Li et al. 2018, Han et al. 2021). Registros atuais, descrevem o quantitativo de 31 gêneros utilizados em bioformulações como agentes de biocontrole, dos quais 26 pertencem ao filo Ascomycota e 4 ao Basidiomycota (Rush et al. 2021).

O uso de agentes antagonistas, de forma isolada ou combinada, pode exibir redução na produção de esporos, na germinação e no crescimento micelial de *Fusarium oxysporum*, além de aumentar os rendimentos produtivos do hospedeiro, pela atuação de mecanismos antagônicos (McGovern 2015).

### 3.1 *Trichoderma* spp. como agente de biocontrole

O gênero *Trichoderma* (Teleomorfo *Hypocrea*) é constituído por fungos filamentosos, pertencentes à ordem *Hypocreales*, família *Hypocreaceae* (Druzhinina et al. 2011), com distribuição cosmopolita, devido sua alta capacidade de colonizar diferentes habitats e substratos (Suárez-Estrella et al. 2007, Sharma et al. 2017, Mukhopadhyay & Kumar 2020).

São considerados organismos de vida livre, oportunistas e simbiontes avirulentos de plantas (Benítez et al. 2004). De fácil identificação, as cepas apresentam características morfológicas comuns, como a presença de micélio aéreo, ramificado e hialino; conídios globosos agregados às fiáides; pigmentação verde brilhante e rápido crescimento micelial (Zin & Badaluddin 2020).

Fungos do gênero *Trichoderma* destacam-se como potenciais agentes de biocontrole, comumente, usados contra um amplo espectro de patógenos radiculares, foliares e pós-colheita. Seu sucesso na supressão de agentes fitopatogênicos, provem de características, como: alta capacidade de crescimento, elevada taxa reprodutiva, especificidade para o alvo, assimilação de nutrientes, tolerância às condições bióticas e abióticas, modificação do ambiente rizosférico e indução do mecanismo de defesa nas plantas (Benítez et al. 2004, Zin & Badaluddin 2020, Thambugala et al. 2020). Seu efeito promissor enquanto agente de biocontrole foi evidenciado na década de 1930 (Lopes et al. 2012). A atividade de biocontrole exercida por *Trichoderma* spp. envolve mecanismos antagônicos, como antibiose, micoparasitismo, competição por nutrientes e nicho ecológico e indução de resistência (Mukhopadhyay & Kumar 2020), que são empregados no manejo de

diversos fitopatógenos (Arellano et al. 2021), como *Fusarium verticillioides* (Galletti; Paris; Cianchetta 2020), *Sclerotinia sclerotiorum* (Singh et al. 2021), *Botrytis cinérea* e *Rhizoctonia solani* (Deng et al. 2018).

No mecanismo de antibiose, a atividade antagônica entre os microrganismos envolvidos é estabelecida por meio da biossíntese e secreção de metabólitos secundários antimicrobianos (voláteis e não voláteis) e enzimas, que exercem papéis ecológicos com efeitos tóxicos e inibidores do metabolismo patogênico (Alfiky 2019, Stenberg et al. 2021).

Diversos compostos bioativos com propriedades antimicrobianas, como  $\beta$ -glucanases, celulasas, proteases, gliotoxina, tricotecenos harzianum A, peptaibóis, policetídeos, trichodermina, viridina e 6-pentil-2 H -piran-2-ona, entre outras, são produzidos por cepas de *Trichoderma* sp. (Druzhinina et al. 2011). A natureza anfipática possibilita que estes metabólitos promovam interações com a membrana plasmática patogênica, desencadeando a formação de canais iônico, responsáveis por estabelecer alterações na permeabilidade celular (Keswani et al. 2019).

Propriedades físico-químicas, como reduzida massa molecular, alta pressão de vapor e potencial hidrofóbico, conferem vantagens cinética à difusão dos metabólitos voláteis entre as partículas do solo, criando, assim, um ambiente fungistático ao entorno do ambiente rizosférico, ao serem propagados a longa distância (Jalali; Zafari; Salari 2017).

O micoparasitismo representa o mecanismo antagônico mais expressivo desempenhado por *Trichoderma* spp. na supressão de fitopatógenos. O mecanismo parasitário envolve eventos complexos, modulados pelo reconhecimento molecular do hospedeiro fúngico, por meio da liberação de moléculas pelo patógeno ou por peptídeos provenientes de ação enzimática, seguido da fixação e enrolamento nas hifas do hospedeiro (Druzhinina et al. 2011). Sinergicamente, a produção de uma cascata de sinalização, induzida pelo hospedeiro patogênico (Köhl; Kolnaar; Ravensberg 2019), ativa a reprogramação transcricional, evento responsável pela expressão de genes codificadores de enzimas destinadas à síntese de metabólitos secundários e de funções hidrolíticas, específicas para cada hospedeiro fúngico (Sharma et al. 2017, Pimentel et al. 2020).

A secreção de enzimas extracelulares promove a hidrólise de polímeros constituintes da parede celular, ocasionando desestruturação e instabilidade

osmótica na célula, com interferência direta sobre o potencial de infecção do fitopatógeno (Sanz et al. 2005, Pimentel et al. 2020, Han et al. 2021).

A competição por uma mesma fonte nutricional corresponde a um mecanismo antagônico muito utilizado por agentes de biocontrole. A presença de habilidades e a alta eficiência na obtenção de recurso disponíveis na rizosfera torna os microrganismos antagonistas, potencialmente, eficazes na inibição do crescimento ou da atividade patogênica (O'Brien 2017).

A eficiente assimilação de nutrientes por *Trichoderma* decorre da sua capacidade de síntese de moléculas de ATP a partir do metabolismo de açúcares, exsudado de raízes e polímeros hidrolisáveis (quitina, celulose e glucana), o que os tornam potenciais competidores nutricionais (Benítez et al. 2004). A indisponibilidade de nutrientes na rizosfera compete para que microrganismos estabeleçam relações de competição, a fim de suprimir suas necessidades nutricionais, associado ao aumento da sua competência rizosférica (Shafi; Tian; Ji 2017). Os metabólitos antimicrobianos também exercem um papel fundamental na ciclagem de nutrientes, além da sua capacidade saprofítica (Mishra et al. 2018, Mukhopadhyay & Kumar 2020, Raymaekers et al. 2020).

Fatores como a disponibilidade de nutrientes, características físico-químicas do solo, salinidade, pH e temperatura, podem ser fatores determinantes para a eficiência da atividade antagônica exercida por cepas de *Trichoderma* spp. (Benítez et al. 2004, Köhl; Kolnaar; Ravensberg 2019).

Endofiticamente, *Trichoderma* spp. pode colonizar tecidos radiculares localizados entre as regiões apoplástica e epidérmica (Mendoza-Mendoza et al. 2018), e promover o desenvolvimento da superfície radicular e a síntese de ácidos orgânicos (ácido harziânico) e fitohormônios, que confere uma maior incorporação de biomassa e aumento da produtividade (Benítez et al. 2004, Vinale et al. 2008, Bean et al. 2021). Cepas do gênero *Trichoderma* além de proporcionar o controle biológico, também exercem papel de biofertilizantes ao estimular a promoção de crescimento, por meio da disponibilidade de nutrientes e produção de fitohormônios (Ji et al. 2020).

De acordo com Li et al. (2018), *Trichoderma asperellum* promoveu redução na severidade da murcha de *Fusarium* e exibiu características de promoção de crescimento, ao solubilizar fosfato, produzir sideróforos e ácido indol acético, em mudas de tomate, o que proporcionou um aumento significativo da absorção de

nutrientes, principalmente de manganês. O acúmulo de manganês em plantas está associado à inibição de atividades patogênicas, devido seu efeito antimicrobiano e indutor de respostas fisiológicas à invasão de patógenos, como a deposição de lignina e produção de compostos fenólicos (Eskandari; Höfte; Zhang 2020).

Cepas de *Trichoderma koningiopsis* foram responsáveis pela redução de 92% da incidência de dumping-off em mudas de *Pinus massoniana* Lamb causada por *Fusarium oxysporum*, além de contribuir para o aumento da fertilidade do solo, incorporação de biomassa e crescimento das mudas (Yu & Luo 2020). A associação entre *Trichoderma asperellum* e matéria orgânica, no manejo integrado de *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae*, foram responsáveis pela redução da incidência dos sintomas de clorose e necrose em mudas de *Passiflora edulis* cultivadas em campos acometidos por murcha de *Fusarium* (Thuranira; Wasilwa; Matiru 2011).

### 3.2. *Bacillus* spp. como agente de biocontrole

O gênero *Bacillus* pertence ao Filo *Firmicutes*, o qual é constituído por bactérias gram-positivas, aeróbicas e anaeróbicas facultativas, habitantes naturais da rizosfera e filosfera de plantas (Yu et al. 2015, Fira et al. 2018). A capacidade de formar estruturas de resistência, os endósporos, confere ao gênero caráter adaptativo, frente à tolerância adquirida às variações de dessecação, temperatura, radiação, flutuações de pH e estresses bióticos (Khan; Maymon; Hirsch 2017, Ben Khedher; Mejdoub-Trabelsi; Tounsi 2021). Vantagens que torna o gênero particularmente adequado à produção de bioformulações e propício para condições de armazenamento a longo prazo (Ben Khedher; Mejdoub-Trabelsi; Tounsi 2021).

*Bacillus* spp. têm sido amplamente estudadas e utilizadas, devido sua capacidade de promoção de crescimento de plantas e do potencial de biocontrole de doenças que acometem uma ampla diversidade de culturas de grande importância agrícola (Guleria et al. 2016), principalmente no manejo de doenças acometidas pelo patógeno *Fusarium oxysporum*.

Ao colonizarem raízes, suas interações são potencialmente benéficas, devido a diversidade de mecanismos envolvidos, estabelecendo a formação de biofilmes, produção de sideróforos, ácidos orgânicos, fitohormônios, produção de

antibióticos e síntese de enzimas hidrolíticas (Khan; Maymon; Hirsch 2017).

Bactérias do gênero *Bacillus* são bastante relatadas, devido seu elevado potencial de síntese de moléculas bioativas de baixo peso molecular, como policetídeos, peptídeos, lipopeptídeos, sideróforos e bacteriocinas, que apresentam ação antimicrobiana de amplo espectro (Fira et al. 2018). Cerca de 5 a 8% do seu genoma é destinado à biossíntese de compostos antimicrobianos (Poveda et al. 2021).

Os principais mecanismos de supressão de fitopatógenos estão atrelados à produção de metabólitos secundários antimicrobianos, como antibióticos, compostos orgânicos voláteis e não voláteis, sideróforos, enzimas hidrolíticas extracelulares, competição por nutrientes e espaço e indução de resistência sistêmica na planta (Haas & Défago 2005).

Os antibióticos peptídicos representam a classe predominante, resistentes à hidrólise de peptidases e proteases (Stein 2005). São os principais compostos responsáveis pela ação antagônica que controla fungos e bactérias patogênicas de plantas (Moreira; Nesi; May De Mio 2014). Os lipopeptídeos cíclicos são representados pelas famílias das surfactinas, fengicinas e iturinas, responsáveis por interagir diretamente com o envelope nuclear das células alvo. De origem não-ribossomal, sua heterogeneidade é conferida pela presença de resíduos de aminoácidos, ligados a um único ácido graxo  $\beta$ -amino ou  $\beta$ -hidroxi, modificados por processos de acilação, metilação ou glicosilação (Fira et al. 2018), o que lhe confere baixa toxicidade e alta biodegradabilidade.

A família das surfactinas possuem propriedades antibacterianas e hemolíticas, sem exibir caráter fungitóxico. Sua função biosurfactante promove a solubilização da camada fosfolipídica e a formação de canais na membrana plasmática, ao promover interação com a porção lipídica e projetar-se para os espaços apolares (Ongena et al. 2007). A formação de biofilmes na superfície do hospedeiro, decorrente da atuação das surfactinas, confere funções de proteção à ação do antagonista e eficiência durante a colonização em toda extensão da superfície radicular (Arguelles-Arias et al. 2009).

Já a iturina, subdividida em A, C, D, e nas variantes micossutilina e bacilomicina, atuam na formação de canais iônicos e promovem efeito sinérgico à ação da fengicina e surfactina. E as fengicinas são lipopeptídeos altamente fungitóxicos, responsáveis por se associar à membrana celular do organismo



patogênico e desencadear a formação de canais ou poros, alterando sua permeabilidade (Fira et al. 2018). Os antibióticos lipopeptídicos, também são responsáveis por desencadear mecanismos de defesa em plantas hospedeiras em resposta à ação de patógenos (Arroyave-Toro; Mosquera; Villegas-Escobar 2017, Guardado-Valdivia et al. 2018).

O peptídeo antifúngico fengicina, purificado a partir de cepas de *Bacillus velezensis* apresentou efeito inibitório sobre o fitopatógeno *Fusarium solani*, agente etiológico da podridão do caule em mudas de maracujá *Passiflora edulis*, quando comparado ao efeito de dois fungicidas. O peptídeo promoveu inchaço nas hifas, com acúmulo de ácido nucléico e quitina, e alterações na permeabilidade da membrana celular, provocando desintegração na estrutura celular do patógeno (Wang et al. 2021).

As enzimas hidrolíticas, como quitinases,  $\beta$ -1,3 glucanases, proteases e celulases, são produzidas por meio do metabolismo secundário bacteriano, e desempenham funções nas obstruções e degradação dos constituintes químicos da parede celular dos fungos patogênicos (Guleria et al. 2016, Shafi; Tian; Ji 2017). As quitinases são subdivididas em 1,4- $\beta$ acetilglucosaminidases (GlcNAcases), endocitinases e exochitinases, e a sua degradação induz a liberação de exoquitinase, responsáveis por modular mecanismo de defesa contra fitopatógenos (Benítez et al. 2004). A síntese da quitinase é desencadeada pelo mecanismo de interação entre o agente de biocontrole e o patógeno. Análises de informações filogenéticas de comunidades bacterianas, evidenciaram que a formação da composição de quitinases bacterianas são determinadas pelo pH e o tipo de solo avaliado, além da interação com os organismos presente na microbiota (Terahara et al. 2009).

As proteases ao longo da atividade antagônica desempenham o papel de clivar ligações peptídicas presentes na parede celular fúngica (Cherkupally; Amballa; Bhoomi 2017). Uma ampla gama de espécies microbiana produz complexos de celulase responsáveis por desencadear a resistência sistêmica induzida nas plantas, ao produzir resíduos de celobiose e glicose, resultantes da hidrólise das ligações 1,4- $\beta$ -D-glucano na celulose, os quais, também, são convertidos em fonte de energia (Saravanakumar et al. 2016). Em função da sua natureza insolúvel a celulose é degradada extracelularmente, e os produtos

disponibilizados como fonte de carbono, tornando-se disponíveis para os microrganismos residentes na zona rizosférica (Behera et al. 2017).

Islam e colaboradores (2019), ao selecionar bactérias provenientes de solo rizosférico, em zonas agroecológicas na região de Bangladesh, para biocontrole da murcha de *Fusarium* em cultivo de tomate, verificaram que a aplicação de isolados de *Bacillus methylotrophicus* apresentaram atividade antagônica contra *F. oxysporum*, com redução dos sintomas da murcha, associado à produção de enzimas líticas.

Durante a competição entre microrganismos, a indisponibilidade de nutrientes ou espaço se torna um fator primordial capaz de desencadear a produção de metabolitos secundários, que interrompem o crescimento microbiano, conferindo ao organismo produtor uma vantagem seletiva sobre o agente patogênico (Marzano; Gallo; Altomare 2013). As bactérias podem exibir efeito fungistático sobre a germinação de esporos de fungos fitopatogênicos, privando-os da disponibilidade de nutrientes e secretando compostos antifúngicos. A fungistase condiciona o fungo a uma relação adaptativa, onde a capacidade de germinação é conservada, ao permanecer em estado de dormência, até ser favorecida pela disponibilidade de recursos nutricionais, como açúcares e aminoácidos (Gordon 2017).

A produção de sideróforos por bactérias está correlacionada à inibição de fitopatógenos presentes no solo, pois atuam antagonicamente ao complexar íons de ferro e torná-los indisponíveis para o metabolismo fitopatogênico. Como, fornecê-los sob a forma solúvel para serem absorvidos pela planta, e atuar enquanto promotores de crescimento (Arguelles-Arias et al. 2009, Ben Khedher; Mejdoub-Trabelsi; Tounsi 2021).

Aplicações da cepa w176 do *Bacillus* sp. mostrou-se efetiva no controle do mofo verde do citrus, doença pós-colheita acometida por *Penicillium digitarium*, responsável por perdas significativas durante o armazenamento. A inibição do crescimento micelial *in vitro* de *P. digitarium* ocorreu por meio do processo de competição por nicho ecológico e nutrientes, associada à produção de compostos antimicrobianos (Tian et al. 2020). Cepas de *Bacillus* spp. isoladas do filoplano de macieiras exibiram atividades inibitórias sobre o crescimento micelial de *Colletotrichum acutatum in vitro*, por meio da produção de metabólitos antifúngicos (Moreira; Nesi; May De Mio 2014).

De acordo com esse contexto, a inserção de microrganismos com potenciais antagonistas, enquanto estratégia ecologicamente sustentável, no gerenciamento de doenças que acometem culturas agrícolas, se torna uma importante alternativa de biocontrole, como forma de propor a redução da densidade populacional do patógeno no solo e da sua capacidade de infectar hospedeiros, mitigando os danos severos ocasionados nos principais patossistemas, como forma de proporcionar a proteção da cultura e manutenção da produtividade agrícola.

## REFERÊNCIAS

ABBAS, A.; KHAN, S.U.; KHAN, W.U.; SALEH, T.; KHAN, M.H.U.; ULLAH, S.; ALI, A.; KRAM, M. Antagonist effects of strains of *Bacillus* spp. against *Rhizoctonia solani* for their protection against several plant diseases: Alternatives to chemical pesticides. **Comptes Rendus - Biologies**, v. 342, n. 5–6, p.124–135, 2019.

AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 5. ed. San Diego: Elsevier Academic Press, 922 p., 2004.

ALFIKY, A. Effects of ultraviolet irradiation on the *in vitro* antagonistic potential of *Trichoderma* spp. against soil-borne fungal pathogens. **Heliyon**, v. 5, n. 7, 2019.

ALTENDORF, S. MINOR TROPICAL FRUITS Mainstreaming a niche market. **Food and Agriculture Organization of the United Nations** (www.fao.org), p. 67–74, 2018.

AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos**, v.1. 4 ed. Piracicaba: Agronômica Ceres, 2011.

ANUSHA, B.G.; GOPALAKRISHNAN, S.; NAIK, M.K.; SHARMA, M. Evaluation of *Streptomyces* spp. and *Bacillus* spp. for biocontrol of *Fusarium* wilt in chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Phytopathology and Plant Protection**, v.5, n.5-6, p.417-442, 2019.

ARELLANO, A.D.V.; SILVA, G.M.; GUATIMOSIM, E.; DORNELES, K.R.; MOREIRA, L.G.; DALLAGNOL, L.J. Seeds coated with *Trichoderma atroviride* and soil amended with silicon improve the resistance of *Lolium multiflorum* against *Pyricularia oryzae*. **Biological Control**, v. 154, 2021.

ARGUELLES-ARIAS, A.; ONGENA, M.; HALIMI, B.; LARA, Y.; BRAN, A.; JORIS, B.; FICKERS, P. *Bacillus amyloliquefaciens* GA1 as a source of potent antibiotics and other secondary metabolites for biocontrol of plant pathogens. **Microbial Cell Factories**, v. 8, p. 1–12, 2009.

ARROYAVE-TORO, J.J.; MOSQUERA, S.; VILLEGAS-ESCOBAR, V. Biocontrol activity of *Bacillus subtilis* EA-CB0015 cells and lipopeptides against postharvest fungal pathogens. **Biological Control**, v. 114, n. 7, p. 195–200, 2017.

BAAYEN, R. P.; O'DONNELL, K.; BONANTS, P.J.M.; CIGELNIK, E.; KROON, L.P.N.M.; ROEBROECK, E.J.A.; WAALWIJK, C. Gene genealogies and AFLP analyses in the *Fusarium oxysporum* complex identify monophyletic and nonmonophyletic *formae speciales* causing wilt and rot disease. **Phytopathology**, v. 90, n. 8, p. 891–900, 2000.

BAKER, B.P.; GREEN, T.A.; LOKER, A. J. Biological control and integrated pest management in organic and conventional systems. **Biological Control**, v. 140, 2020.

BEAN, K.M.; KISIALA, A.B.; MORRISON, E.N.; EMERY, R.J.N. *Trichoderma* Synthesizes Cytokinins and Alters Cytokinin Dynamics of Inoculated *Arabidopsis* Seedlings. **Journal of Plant Growth Regulation**, 2021. <https://doi.org/10.1007/s00344-021-10466-4>.

BEHERA, B.C.; SETHI, B.K.; MISHRA, R.R.; DUTTA, S.K.; THATOI, H.N. Microbial cellulases – Diversity & biotechnology with reference to mangrove environment: A review. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 15, n. 1, p. 197–210, 2017.

BEN KHEDHER, S.; MEJDOUB-TRABELSI, B.; TOUNSI, S. Biological potential of *Bacillus subtilis* V26 for the control of *Fusarium* wilt and tuber dry rot on potato caused by *Fusarium* species and the promotion of plant growth. **Biological Control**, v. 152, 2021.

BENÍTEZ, T.; RINCON, A.M.; LIMON, M.C.; CODON, A.C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 249–260, 2004.

BOMFIM, M.P.; SÃO JOSÉ, A.R.; REBOUÇAS, T.N.H.; ALMEIDA, S.S.; SOUZA, I.V.B.; DIAS, N.O. Avaliação antagônica *in vitro* e *in vivo* de *Trichoderma* spp. a *Rhizopus stolonifer* em maracujazeiro amarelo. **Summa Phytopathologica**, v.36, n.1, p.61-67, 2010.

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

CAUZ-SANTOS, L.A.; MUNHOZ, C.F.; RODDE, N.; CAUET, S.; SANTOS, A.A.; PENHA, H.A.; DORNELAS, M.C.; VARANI, A.M.; OLIVEIRA, G.C.X.; BERGES, H.; VIEIRA, M.L. The chloroplast genome of *Passiflora edulis* (*Passifloraceae*) assembled from long sequence reads: Structural organization and phylogenomic studies in malpighiales. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 1–17, 2017.

CERQUEIRA-SILVA, C.B.M.; JESUS, O.N.; OLIVEIRA, E. J.; SANTOS, E.S.; SOUZA, A.P. Characterization and selection of passion fruit (yellow and purple) accessions based on molecular markers and disease reactions for use in breeding programs. **Euphytica**, v. 202, p.345–359, 2015.

CHERKUPALLY, R.; AMBALLA, H.; BHOO MI, N.R. *In vitro* screening for enzymatic activity of *Trichoderma* species for biocontrol potential. **Annals of Plant Sciences**, v. 6, n. 11, p. 1784, 2017.

COQUE, J.J.R.; ÁLVAREZ-PEREZ, M.; COBOS, R.; GONZALEZ-GARCÍA, S.; IBAÑEZ, A.M.; GALÁN, A.D.; CALVO-PENÁ, C. Advances in the control of phytopathogenic fungi that infect crops through their root system. **Advances in Applied Microbiology**, v. 111, p. 123–170, 2020.

CORREA, R.C.G.; PERALTA, R.M.; HAMINIUK, C.W.I.; MACIEL, G.M.; BRACHT, A.; FERREIRA, I.C.F.R. The past decade findings related with nutritional composition, bioactive molecules and biotechnological applications of *Passiflora*

spp. (passion fruit). **Trends in Food Science and Technology**, v. 58, p. 79–95, 2016.

COSTA, G.M.; GAZOLA, A.C.; ZUCOLLOTO, S.M. CASTELLANOS; RAMOS, F.A.; REGINATTO, F. H.; SCHENKEL, E.P. Chemical profiles of traditional preparations of four South American *Passiflora* species by chromatographic and capillary electrophoretic techniques. **Brazilian Journal of Pharmacology**, v.26, p. 451-452, 2016.

COSTA, S.N.; BRAGANCA, C.A.D.; RIBEIRO, L.R.; AMORIM, E.P.; OLIVEIRA, S.A.S.; DITA, M.A.; LARANJEIRA, F.F.; HADDAD, F. Genetic structure of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* in different regions from Brazil. **Plant Pathology**, v. 64, n. 1, p. 137–146, 2015.

DARIVA, J.M.; XAVIER, A.A.; COSTA, M.R.; RIBEIRO, R.C.F.; SOUSA, T.V.; Variabilidade genética de isolados de *Fusarium solani* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* associados ao maracujazeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 37, n. 2, p. 377–386, 2015.

DEAN, R. A.; LICHENS-PARK, A.; KOLE, C. *Fusarium oxysporum*. **Seogchan Genomics of Plant-Associated Fungi and Oomycetes: Dicot Pathogens**, p. 1–239, 2014.

DEAN, R.; VAN KAN, J.A.; PRETORIUS, Z.A.; HAMMOND-KOSACK, K.E.; DI PIETRO, A.; SPANU, P.D., RUDD, J.J.; DICKMAN, M.; KAHMANN, R.; ELLIS, J.; FOSTER, G.D. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, v. 13, n. 4, p. 414–430, 2012.

DENG, J. J.; HUANG, W.; LI, Z.; LU, D.; ZHANG, Y.; LU, X. Biocontrol activity of recombinant aspartic protease from *Trichoderma harzianum* against pathogenic fungi. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 112, p. 35–42, 2018.

DRUZHININA, I.S.; SEIDL-SEIBOTH, V.; HERRERA-ESTRELLA, A.; HORWITZ, B.A.; KENERLEY, C.M.; MONTE, E.; MUKHERJEE, P.K.; ZEILINGER, S.; GRIGORIEV, I.V. *Trichoderma*: The genomics of opportunistic success. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 10, p. 749–759, 2011.

ESKANDARI, S.; HÖFTE, H.; ZHANG, T. Foliar manganese spray induces the resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. **Journal of Plant Physiology**, p. 246–247, 2020.

FERNANDEZ-SAN MILLAN, A.; LARRAYA, L.; FARRAN, I.; ANCIN, M.; VERAMENDI, J. Successful biocontrol of major postharvest and soil-borne plant pathogenic fungi by antagonistic yeasts. **Biological Control**, v. 160, 2021.

FIRA, D.; DIMKIĆ, I.; BERIĆ, T.; LOZO, J.; STANKOVIĆ, S. Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. **Journal of Biotechnology**, v. 285, p. 44–55, 2018.

FISCHER, I.H.; ALMEIDA, A.M.; FILETI, M.S.; BERTANI, R.M.A.; ARRUDA, M.C.; BUENO, C. J. Avaliação de *Passifloraceas*, fungicidas e *Trichoderma* para o manejo da Podridão-do-colo do maracujazeiro, causada por *Nectria haematococca*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 3, p. 709–717, 2010.

FISCHER, I.H.; REZENDE, J.A.M. Diseases of passion flower (*Passiflora* spp.). **Pest Technology**, v. 2, n.1, p.1-19, 2008.

FORERO, R.; ORTIZ, E.; LEÓN, W.; GÓMEZ, J.C.; HOYOS-CARVAJAL, L. Análisis de la resistencia a *Fusarium oxysporum* en plantas de *Passiflora maliformis* L. **Revista Colombiana de Ciências Hortícolas**, v. 9, n. 2, p. 197, 2016.

GALLETTI, S.; PARIS, R.; CIANCHETTA, S. Selected isolates of *Trichoderma gamsii* induce different pathways of systemic resistance in maize upon *Fusarium verticillioides* challenge. **Microbiological Research**, v. 233, 2020.

GAVA, C.A.T.; MENEZES, M. E.L. Eficiência de isolados de *Trichoderma* spp. no controle de patógenos de solo em meloeiro amarelo. **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, n. 4, p. 633-640, 2012.

GORDON, T. R. *Fusarium oxysporum* and the *Fusarium* Wilt Syndrome. **Annual Review of Phytopathology**, v. 55, p. 23–39, 2017.

GUARDADO-VALDIVIA, L.; TOVAR-PÉREZB, E.; CHACÓN-LÓPEZA, A.; LÓPEZ-GARCÍA, U.; GUTIÉRREZ-MARTÍNEZA, P.; STOLL, A.; AGUILERA, S. Identification and characterization of a new *Bacillus atrophaeus* strain B5 as biocontrol agent of postharvest anthracnose disease in soursop (*Annona muricata*) and avocado (*Persea americana*). **Microbiological Research**, v. 210, p. 26–32, 2018.

GULERIA, S.; WALIA, A.; CHAUHAN, A.; SHIRKOT, C.K. Molecular characterization of alkaline protease of *Bacillus amyloliquefaciens* SP1 involved in biocontrol of *Fusarium oxysporum*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 232, p. 134–143, 2016.

HAAS, D.; DÉFAGO, G. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent *Pseudomonads*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 4, p. 307–319, 2005.

HADDAD, F.; ROCHA, L.S.; SOARES, A.C.F.; MARTINS, I.P.S.; TEIXEIRA, L.A.J.; STAVER, C.; DITA, M. Management of *Fusarium* wilt of bananas in Minas Gerais, Brazil. **Acta Horticulturae**, v. 1196, p. 137–146, 2018.

HAN, S.; CHEN, J.; ZHAO, Y.; CAI, H.; GUO, C. *Bacillus subtilis* HSY21 can reduce soybean root rot and inhibit the expression of genes related to the pathogenicity of *Fusarium oxysporum*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.178, 2021.

HE, X.; LUAN, F.; YANG, Y.; WANG, Z.; ZHAO, Z.; FANG, J.; WANG, M.; ZUO, M.; LI, Y. *Passiflora edulis*: An Insight Into Current Researches on Phytochemistry and Pharmacology. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, p. 1–16, 2020.

HUSSAIN, S.; SIDDIQUE, T.; SALEEM, M.; ARSHAD, M.; KHALID, A. **hapter 5 Impact of Pesticides on Soil Microbial Diversity, Enzymes, and Biochemical Reactions**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc, v. 102, 2009.

IBGE-Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção Brasileira de maracujá em 2019. Disponível em: [http://www.cnpmf.embrapa.br/Base\\_de\\_Dados/index\\_pdf/dados/brasil/maracuja/b1\\_maracuja.pdf](http://www.cnpmf.embrapa.br/Base_de_Dados/index_pdf/dados/brasil/maracuja/b1_maracuja.pdf), em: 20/02/2021.

ISLAM, A.; KABIR, M. S.; KHAIR, A. Molecular identification and evaluation of indigenous bacterial isolates for their plant growth promoting and biological control activities against fusarium wilt pathogen of tomato. **Plant Pathology Journal**, v. 35, n. 2, p. 137–148, 2019.

JALALI, F.; ZAFARI, D.; SALARI, H. Volatile organic compounds of some *Trichoderma* spp. increase growth and induce salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. **Fungal Ecology**, v. 29, p. 67–75, 2017.

JI, S.; LIU, Z.; LIU, B.; WANG, Y.; WANG, J. The effect of *Trichoderma* biofertilizer on the quality of flowering Chinese cabbage and the soil environment. **Scientia Horticulturae**, v. 262, 2020.

JIMÉNEZ-DÍAZ, R. M.; CASTILLO, P.; JIMENEZ-GASCO, M.D.; LANDA, B.B.; NAVAS-CORTES, J.A. *Fusarium* wilt of chickpeas: Biology, ecology and management. **Crop Protection**, v. 73, p. 16–27, 2015.

JOSHI, R. A review of *Fusarium oxysporum* on its plant interaction and industrial use. **Journal of Medicinal Plants Studies**, v. 6, n. 3b, p. 112–115, 2018.

KANG, S.; DEMERS, J.; JIMENEZ-GASCO, M.D.M.; REP, M. *Fusarium oxysporum*. **Genomics of Plant-Associated Fungi and Oomycetes: Dicot Pathogens**, Ed: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, p. 99-119, 2014.

KESWANI, C.; SINGH, H.B.; HERMOSA, R.; GARCÍA-ESTRADA, C.; CARADUS, J.; HE, Y.; MEZAACHE-AICHOOR, S.; GLARE, T.R.; BORRISS, R.; VINALE, F.; SANSINENEA, E. Antimicrobial secondary metabolites from agriculturally important fungi as next biocontrol agents. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 23–24, p. 9287–9303, 2019.

KHAN, N.; MAYMON, M.; HIRSCH, A. Combating *Fusarium* Infection Using *Bacillus*-Based Antimicrobials. **Microorganisms**, v. 5, n. 4, p. 75, 2017.

KÖHL, J.; KOLNAAR, R.; RAVENSBERG, W.J. Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: Relevance beyond efficacy. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 1–19, 2019.

KUMAR, M.; YADAV, A.N.; SAXENA, R.; PAUL, D.; TOMAR, R.S.; Biodiversity of pesticides degrading microbial communities and their environmental impact. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 31, 2021.



LAN, H.; LAIB, B.; ZHAO, P.; DONG, X.; WEI, W.; YE, Y.; WU, Z. Cucumber mosaic virus infection modulated the phytochemical contents of *Passiflora edulis*. **Microbial Pathogenesis**, v. 138, 2020.

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.

LESLIE, J. F. Fungal vegetative compatibility. **Annual Review of Phytopathology**, v. 31, p. 127–150, 1993.

LI, C.; XIN, M.; HE, X.; LI, L.; YI, P.; TANG, Y.; LI, J.; ZHENG, F.; LIU, G.; SHENG, J.; LI, Z.; SUN, J. Characterization of the aromatic profile of purple passion fruit (*Passiflora edulis* Sims) during ripening by HS-SPME-GC/MS and RNA sequencing. **Food Chemistry**, v. 355, 2021.

LI, Y. T.; HWANG, A.G.; HUANG, C.M.; HUANG, C.H. Effects of *Trichoderma asperellum* on nutrient uptake and Fusarium wilt of tomato. **Crop Protection**, v. 110, p. 275–282, 2018.

LIMA, P.A.M.; MACIEL, K.S.; ALEXANDRE, R.S.; LOPES, J.C. The physiological quality of yellow passion fruit (*'Passiflora edulis'* sims. f. *'flavicarpa'* deg.) seeds with different water content placed in a cold chamber room and environmental conditions. **Australian Journal of Crop Science**, v. 13, n. 3, p. 452-457, 2019.

LOPES, F.A.C.; STEINDORFF, A.S.; GERALDINE, A.M.; BRANDAO, R.S.; MONTEIRO, V.N.; LOBO JUNIOR, M.; COELHO, A.S.G.; ULHOA, C.J.; SILVA, R.N.; Biochemical and metabolic profiles of *Trichoderma* strains isolated from common bean crops in the Brazilian Cerrado, and potential antagonism against *Sclerotinia sclerotiorum*. **Fungal Biology**, v. 116, n. 7, p. 815–824, 2012.

MAROSTEGA, T. N.; PREISIGKE, S.C.; CHIMELLO, A.M.; SILVA, G.C.; GILIO, T.A.S.; ARAÚJO, K.L.; BARELLI, M.A.A.; NEVES, L.G. Different strategies for estimating genetic parameters for collar rot resistance characteristics in *Passiflora* spp. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v. 81, n. 3, p. 281–290, 2021.

MARZANO, M.; GALLO, A.; ALTOMARE, C. Improvement of biocontrol efficacy of *Trichoderma harzianum* vs. *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* through UV-induced tolerance to fusaric acid. **Biological Control**, v. 67, p. 397-408, 2013.

MCGOVERN, R. J. Management of tomato diseases caused by *Fusarium oxysporum*. **Crop Protection**, v. 73, p. 78–92, 2015.

MCKNIGHT, T. A wilt disease of the passion vine (*Passiflora edulis*) caused by a species of *Fusarium*. **Queensland Journal of Agricultural Science**, v. 8, p. 1-4, 1951.

MELETTI, L. M. M. Avanços na Cultura do Maracujá no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 1, p. 083–091, 2011.

MENDOZA-MENDOZA, A.; ZAID, R.; LAWRY, R.; HERMOSA, R.; MONTE, E.; HORWITZ, B.A.; MUKHERJEE, P.K. Molecular dialogues between *Trichoderma* and roots: Role of the fungal secretome. **Fungal Biology Reviews**, v. 32, n. 2, p. 62–85, 2018.

MIGUEL-WRUCK, D.S.; RONCATTO, G.; BEHLING, M.; FALEIRO, V.O.; BONALDO, S.M.; TARDIN, F.D. Identification of sources of resistance of *Passiflora* rootstocks to fusariosis in areas with disease outbreaks in Mato Grosso state, Brazil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 43, n. 4, 2021.

MISHRA, R.K.; BOHRA, A.; KAMAAL, N.; KUMAR, K.; GANDHI, K.; SUJAYANAND, G.K.; SAABALE, P.R.; SATHEESH, N.S.J.; SARMA, B.K.; KUMAR, D.; MISHRA M.; SRIVASTAVA, D.K.; SINGH, N.P. Utilization of biopesticides as sustainable solutions for management of pests in legume crops: Achievements and prospects. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 28, n. 1, p. 1–11, 2018.

MOREIRA, R.R.; NESI, C.N.; MAY DE MIO, L.L. *Bacillus* spp. and *Pseudomonas putida* as inhibitors of the *colletotrichum acutatum* group and potential to control glomerella leaf spot. **Biological Control**, v.72, p. 30–37, 2014.

MUKHOPADHYAY, R.; KUMAR, D. *Trichoderma*: a beneficial antifungal agent and insights into its mechanism of biocontrol potential. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 30, n.1, 2020.

NIRMALADEVI, D.; VENKATARAMANA, M.; SRIVASTAVA, R.K.; UPPALAPATI, S. R.; GUPTA, V.K.; YLI-MATTILA, T.; CLEMENT TSUI, K.M.; SRINIVAS, C.; NIRANJANA, S.R.; CHANDRA, N.S. Molecular phylogeny, pathogenicity and toxigenicity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1–14, 2016.

NISHIOKA, T.; MARIAN, M.; KOBAYASHI, I.; KOBAYASHI, Y.; YAMAMOTO, K.; TAMAKI, H.; SUGA, H.; SHIMIZU, M. Microbial basis of *Fusarium* wilt suppression by *Allium* cultivation. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–9, 2019.

O'BRIEN, P. A. Biological control of plant diseases. **Australasian Plant Pathology**, v. 46, n. 4, p. 293–304, 2017.

OKUNGBOWA, F. I.; SHITTU, H. O. *Fusarium* Wilts: An Overview. **Trends in Environmental Science**, n.2, p. 83–104, 2014.

OLIVEIRA, E.J.; SOARES, T.L.; BARBOSA, C.J.; SANTOS-FILHO, H.P.; JESUS, O.N. Severidade de doenças em maracujazeiro para identificação de fontes de resistência em condições de campo. **Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal - SP**, v. 35, n. 2, p. 485-492, 2013.

OLUOCH, P.; NYABOGA, E.N.; BARGUL, J.L. Analysis of genetic diversity of passion fruit (*Passiflora edulis* Sims) genotypes grown in Kenya by sequence-related amplified polymorphism (SRAP) markers. **Annals of Agrarian Science**, v.16, n. 4, p. 367–375, 2018.

ONGENA, M.; JOURDAN, E.; ADAM, A.; PAQUOT, M.; BRANS, A.; JORIS, B.; ARPIGNY, J.; THONART, P. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. **Environmental Microbiology**, v. 9, n. 4, p. 1084–1090, 2007.

ORTIZ, E.; CRUZ, M.; MELGAREJO, L.M.; MARQUÍNEZ, X.; HOYOS-CARVAJAL, L. Histopathological features of infections caused by *Fusarium oxysporum* and *F. solani* in purple passionfruit plants (*Passiflora edulis* Sims). **Summa Phytopathologica**, v.40, n.2, p.134-140, 2014.

ORTIZ, E.; HOYOS-CARVAJAL, L. Standard methods for inoculations of *F. oxysporum* and *F. solani* in *Passiflora*. **African Journal of Agricultural Research**, v.11, n.17, pp. 1569-1575, 2016.

PACHECO, G.; SIMÃO, M.J.; VIANNA, M.G.; GARCIA, R.O.; VIEIRA, M.L.C.; MANSUR, E. *In vitro* conservation of *Passiflora*—A review. **Scientia Horticulturae**, v.211, p. 305-311, 2016.

PEGG, K.G.; COATES, L.M.; O'NEILL, W.T.; TURNER, D.W. The Epidemiology of *Fusarium* Wilt of Banana. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 1–19, 2019.

PERUCH, L.A.M.; COLARICCIO, A.; BATISTA, D.C. Controle de doenças do maracujazeiro: situação atual e perspectivas. **Agropecuária Catarinense**, v.31, n.1, p.37-40, 2018.

PIMENTEL, M.F.; ARNÃO, E.; WARNER, A.J.; SUBEDI, A.; ROCHA, L.F.; SROUR, A.; BOND, J.P.; FAKHOURY, A.M. *Trichoderma* isolates inhibit *Fusarium virguliforme* growth, reduce root rot, and induce defense-related genes on soybean seedlings. **Plant Disease**, v. 104, n. 7, p. 1949–1959, 2020.  
**Horticulturae**, v. 262, 2020.

PINHEIRO, G.S.; CAJUHI, L.F.; GUIMARÃES, A.L.S.; ROSA, R.C.C.; LARANJEIRA, F.F. Identificação e modelagem do risco de fatores químicos e físicos à incidência da fusariose do maracujazeiro na Bahia. **Revista Brasileira de Geografia Física**, v.9, n.4, p. 1168-1182, 2016.

PLOETZ, R.C. *Fusarium*-Induced Diseases of Tropical, Perennial Crops. **Annual Meeting of The American Phytopathological Society**, v. 96, n.1, p. 648-652, 2005.

POVEDA, J.; ROESCHLIN, R.A.; MARANO, M.R.; FAVARO, M.A. Microorganisms as biocontrol agents against bacterial citrus diseases. **Biological Control**, v. 158, 2021.

PREISIGKE, S.C.; SILVA, L.P.; SERAFIM, M.E.; BRUCKNER, C.H.; ARAUJO, K.L.; NEVES, L.G. Seleção precoce de espécies de *Passiflora* resistente a fusariose. **Summa Phytopathologica**, v. 43, n. 4, p. 321–325, 2017.

RAYMAEKERS, K.; PONET, L.; HOLTAPPELS, D.; BERCKMANS, B.; CAMMUE, B.P.A. Screening for novel biocontrol agents applicable in plant disease management – A review. **Biological Control**, v. 144, 2020.

ROJAS, E. C.; JENSENA, B.; JØRGENSEN, H.J.L.; LATZ, M.A.C.; ESTEBAN, P.; DING, Y.; COLLINGE, D.B. Selection of fungal endophytes with biocontrol potential against *Fusarium* head blight in wheat. **Biological Control**, v. 144, 2020.

RUSH, T.A.; SHRESTHA, H.K.; MEENA, M.G.; SPANGLER, M.K.; ELLIS, C.; LABBÉ, J.L.; ABRAHAM, P.E. Bioprospecting *Trichoderma*: A Systematic Roadmap to Screen Genomes and Natural Products for Biocontrol Applications. **Frontiers in Fungal Biology**, v. 2, 2021.

SANTOS, J.T.C.; PETRY, F.C.; TOBARUELA, E.C.; MERCADANTE, A.Z.; GLORIA, M.B.A.; COSTA, A.M.; LAJOLO, F.M.; HASSIMOTTO, N.M.A. Brazilian native passion fruit (*Passiflora tenuifila* Killip) is a rich source of proanthocyanidins, carotenoids, and dietary fiber. **Food Research International**, v. 147, 2021.

SANZ, L.; MONTERO, M.; REDNDO, J.LLOBELL, A.; MONTE, E. Expression of an  $\alpha$ -1,3-glucanase during mycoparasitic interaction of *Trichoderma asperellum*. **FEBS Journal**, v. 272, n. 2, p. 493–499, 2005.

SARAVANAKUMAR, K.; FAN, L.; FUL, K.; YUL, C.; WANG, M.; XIAL, H.; SUN, J.; LI, Y.; CHE, J. Cellulase from *Trichoderma harzianum* interacts with roots and triggers induced systemic resistance to foliar disease in maize. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1–18, 2016.

SHAFI, J.; TIAN, H.; JI, M. *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens: a review. **Biotechnology and Biotechnological Equipment**, v. 31, n. 3, p. 446–459, 2017.

SHARMA, V.; SALWANA, R.; SHARMA, P.N.; KANWAR, S.S. Elucidation of biocontrol mechanisms of *Trichoderma harzianum* against different plant fungal pathogens: Universal yet host specific response. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 95, p. 72–79, 2017.

SILVA, N. C.; DUARTE, C. R.; BARROZO, M. A. S. Effects of dehydration methods on quality characteristics of yellow passion fruit co-products. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, n. 14, p. 4750–4759, 2017.

SILVA, R.M.; AMBROSIO, M.M.Q.; AGUIAR, A.V.M.; FALEIRO, F.G.; CARDOSO, A.M.S.C.; MENDOÇA, V. Reação de cultivares de maracujazeiro em áreas com fusariose. **Summa Phytopathologica**, v. 43, n. 2, p. 98–102, 2017.

SINGH, S. P.; KESWANI, C.; SINGH, S.P.; SANSINENEA, E.; HOAT, T.X. *Trichoderma* spp. mediated induction of systemic defense response in brinjal against *Sclerotinia sclerotiorum*. **Current Research in Microbial Sciences**, v. 2, 2021.

SPADOTTI, D.M.A.; FAVARA, G.M.; NOVAES, Q.S.; MELLO, A.P.O.A.; FREITAS, D.M.S.; EDWARDS MOLINA, J.P.; REZENDE, J.A.M. Long-lasting systematic roguing for effective management of CABMV in passion flower orchards through maintenance of separated plants. **Plant Pathology**, v.68, p.1259–1267, 2019.

SRINIVAS, C.; DEVI, D.N.; MURTHY, N.; MOHAN, C.D.; LAKSHMEESHA, T.R.; SINGH, B.; KALAGATUR, N.V.; NIRANJANA, S.R.; HASHEM, A.; ALQARAWI, A.A.; TABASSUM, B.; ABD ALLAH, E.F.; NAYAKA, C.; SRIVASTAVA, R.K. *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* causal agent of vascular wilt disease of tomato: Biology to diversity– A review. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 26, n. 7, p. 1315–1324, 2019.

STEIN, T. *Bacillus subtilis* antibiotics: Structures, syntheses and specific functions. **Molecular Microbiology**, v. 56, n. 4, p. 845–857, 2005.

STENBERG, J.A.; SUNDH, I.; BECHER, P.G.; BJÖRKMAN, C.; DUBEY, M.; EGAN, P. A.; FRIBERG, H.; GIL, J.F.; JENSEN, D.F.; JONSSON, M.; KARLSSON, M.; KHALIL, S.; NINKOVIC, V.; REHERMANN, G.; VETUKURI, R.R.; VIKETOFT, M. When is it biological control? A framework of definitions, mechanisms, and classifications. **Journal of Pest Science**, 2021.

SUÁREZ-ESTRELLA, F.; VARGAS-GARCÍA, C; LÓPEZ, M.J.; CAPEL, C.; MORENO, J. Antagonistic activity of bacteria and fungi from horticultural compost against *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. **Crop Protection**, v. 26, n. 1, p. 46–53, 2007.

TERAHARA, T.; IKEDA, S.; NORITAKE, C.; MINAMISAWA, K.; ANDO, K.; TSUNED, S.; HARAYAMA, S. Molecular diversity of bacterial chitinases in arable soils and the effects of environmental factors on the chitinolytic bacterial community. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 41, n. 3, p. 473–480, 2009.

THAMBUGALA, K. M.; DARANAGAMA, D.A.; PHILLIPS, A.J.L.; ANNANGARA, S.D.; PROMPUTYHA, I. Fungi vs. Fungi in Biocontrol: An Overview of Fungal Antagonists Applied Against Fungal Plant Pathogens. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, n.11, p. 1–19, 2020.

THANGAVEL, R.; PATTEMORE, J.A.; REBIJITH, K.B.; GRBAVAC, N.; GANEV, S.; CHAN, N.; PEARSON, H.G.; ALEXANDER, B.J.R. *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* infecting passionfruit in New Zealand in a changing taxonomic landscape. **Australasian Plant Pathology**, v. 50, n. 4, p. 365–377, 2021.

THURANIRA, M.D.; WASILWA, L.A.; MATIRU, V.N. Effect of soil management and *Trichoderma asperellum* on severity of Passion fruit wilt disease. **Acta Horticulturae**, v. 911, p. 243–249, 2011.

TIAN, Z.; CHENB, C.; CHENC, K.; LIUB, P.; FANB, Q.; ZHAOA, J.; LONG, C. Biocontrol and the mechanisms of *Bacillus* sp. w176 against postharvest green mold in citrus. **Postharvest Biology and Technology**, v. 159, 2020.

VIANA, F.M.P.; FREIRE, F.C.O.; CARDOSO, J.E.; VIDAL, J.C. *Principais doenças do maracujazeiro na Região Nordeste e seu controle*: Embrapa Agroindústria Tropical. **Comunicado Técnico 86**, p. 1-11, 2003.

VINALE, F.; SIVASITHAMPARAM, K.; GHISALBERTI, E.L.; MARRA, R.; WOO, S.L.; LORITO, M. *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, n. 1, p. 1–10, 2008.

WANG, C.; YE, X.; NG, T.B.; ZHANG, W. Study on the biocontrol potential of antifungal peptides produced by *Bacillus velezensis* against *Fusarium solani* that infects the passion fruit *Passiflora edulis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 69, n. 7, p. 2051–2061, 2021.

XU, W.; WANG, K.; WANG, H.; LIU, Z.; SHI, Y.; GAO, Z.; WANG, Z. Evaluation of the biocontrol potential of *Bacillus* sp. WB against *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*. **Biological Control**, v. 147, 2020.

YU, C.; LUO, X. *Trichoderma koningiopsis* controls *Fusarium oxysporum* causing damping-off in *Pinus massoniana* seedlings by regulating active oxygen metabolism, osmotic potential, and the rhizosphere microbiome. **Biological Control**, v. 150, 2020.

YU, G.; CHENG, W.X.; HONG, T.W.; CHUN, S.J.; BIN, W.; QIANG, YE.; GUO, D.S.; MING, Z.; ZHI, W.J. Genomic Diversity and Evolution of *Bacillus subtilis*. **Biomedical and Environmental Sciences**, v. 28, n. 8, p. 620–625, 2015.

ZHANG, M.; XU, J.H.; LIU, G.; YAO, X.F.; LI, P.F.; YANG, X.P. Characterization of the watermelon seedling infection process by *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*. **Plant Pathology**, v. 64, n. 5, p. 1076–1084, 2015.

ZHAO, J.; MEI, Z.; ZHANG, X.; XUE, C.; ZHANG, C.; MA, T.; ZHANG, S. Suppression of *Fusarium* wilt of cucumber by ammonia gas fumigation via reduction of *Fusarium* population in the field. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1–8, 2017.

ZIN, N. A.; BADALUDDIN, N. A. Biological functions of *Trichoderma* spp. for agriculture applications. **Annals of Agricultural Sciences**, v. 65, n. 2, p. 168–178, 2020.

---

## **CAPÍTULO II**

***Bacillus spp. e Trichoderma asperellum no biocontrole de  
Fusarium oxysporum f. sp. passiflorae***

---

## ***Bacillus* spp. e *Trichoderma asperellum* no biocontrole de *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae***

Marília de Jesus Ferreira<sup>1</sup>, Fernando Haddad<sup>2</sup>, Harllen Sandro Alves Silva<sup>2</sup>

### **RESUMO**

O maracujá amarelo, *Passiflora edulis*, é acometido por diversas doenças dentre elas a fusariose, causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* (Fop), considerada uma doença destrutiva devido a sua complexidade de manejo e inexistência de cultivares resistentes. O emprego de microrganismos para o controle biológico de doenças constitui-se uma alternativa sustentável, segura e eficiente no manejo integrado das enfermidades em culturas agrícolas. Portanto, o presente estudo objetivou avaliar o potencial antagonista *in vitro* de isolados de *Bacillus* spp. e um isolado de *Trichoderma asperellum* na supressão de *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* e identificar a presença de atividade enzimática relacionadas à ação antifúngica. Foram realizados ensaios para avaliação de antagonismo em teste de pareamento direto, produção de metabólitos voláteis, produção de compostos orgânicos não-voláteis e produção de enzimas líticas bacterianas e sideróforos. Os isolados bacterianos exibiram potencial antagônico, estatisticamente, significativo, nos testes de confrontação direta, por meio da redução do crescimento micelial de Fop, com percentuais de inibição entre 59% e 68,5%. *Trichoderma asperellum*, exibiu atividade inibitória direta sobre o patógeno, com o percentual de inibição de 72%. Em relação aos efeitos dos Compostos Orgânicos Voláteis emitidos por *Bacillus* spp., não houve efeito supressivo significativo sobre o crescimento micelial de *Fusarium oxysporum passiflorae*, apenas *Trichoderma asperellum* exibiu efeito antagônico significativo com a média de inibição micelial de 53%. Os filtrados livres de células e os metabólitos voláteis bacterianos não apresentaram interferências significativas no crescimento das colônias de Fop, quando comparadas ao controle. As cepas bacterianas apresentaram produção extracelular de enzimas hidrolíticas, com maior destaque para as atividades proteolíticas e celulolíticas. *Bacillus* spp. Bac6, APC51, APC07 e 399 apresentaram a produção de quitinases. E apenas, *Bacillus* spp. Bac 2 e 01C não exibiram a produção de sideróforos, por meio da identificação de pigmento extracelular fluorescente. A avaliação da atividade antagônica evidenciou que *Bacillus* spp. e *T. asperellum* impossibilitou o crescimento de *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* *in vitro*, comportando-se como organismos detentores de mecanismos diretos, viáveis no controle biológico de fitopatógenos.

**Palavras-chave:** *Passiflora*, controle biológico, fitopatógeno, murcha.

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, R. Rui Barbosa, Cruz das Almas - BA, 44380-000. <sup>2</sup>EMBRAPA Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, Bahia, Brasil.

\*E-mail:marilliaferreira1@hotmail.com



## ***Bacillus* spp. and *Trichoderma asperellum* isolates in the biocontrol of *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae***

Marília de Jesus Ferreira<sup>1</sup>, Fernando Haddad<sup>2</sup>, Harllen Sandro Alves Silva<sup>2</sup>

### **ABSTRACT**

The yellow passion-fruit, *Passiflora edulis*, is affected by several diseases among them the fusarium, caused by the fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* (Fop), considered a destructive disease due to its complexity of management and lack of resistant cultivars. The use of microorganisms for the biological control of diseases is a sustainable, safe and efficient alternative in the integrated management of diseases in agricultural crops. Therefore, the present study aimed to evaluate the in vitro antagonist potential of *Bacillus* spp. isolates and an isolate of *Trichoderma asperellum* in the suppression of *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* and to identify the presence of enzymatic activity related to the antifungal action. Assays were performed to evaluate antagonism in direct pairing test, production of volatile metabolites, production of non-volatile organic compounds, and production of bacterial lytic enzymes and siderophores. The bacterial isolates exhibited statistically significant antagonistic potential in direct confrontation tests by reducing the mycelial growth of Fop, with inhibition percentages between 59% and 68.5%. *Trichoderma asperellum*, exhibited direct inhibitory activity on the pathogen, with the percentage of inhibition of 72%. In relation to the effects of the Volatile Organic Compounds emitted by *Bacillus* spp., there was no significant suppressive effect on the mycelial growth of *Fusarium oxysporum passiflorae*, only *Trichoderma asperellum* exhibited significant antagonistic effect with the average of mycelial inhibition of 53%. The cell-free filtrates and the bacterial volatile metabolites showed no significant interference on the growth of Fop colonies when compared to the control. The bacterial strains showed extracellular production of hydrolytic enzymes, most prominently proteolytic and cellulolytic activities. *Bacillus* spp. Bac6, APC51, APC07 and 399 showed the production of chitinases. And only, *Bacillus* spp. Bac 2 and 01C did not exhibit the production of siderophores, through the identification of fluorescent extracellular pigment. The evaluation of the antagonistic activity showed that *Bacillus* spp. and *T. asperellum* prevented the growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* in vitro, behaving as organisms possessing direct mechanisms, viable in the biological control of phytopathogens.

**Keywords:** *Passiflora*; biological control; phytopathogen; wilt.

## INTRODUÇÃO

*Passiflora edulis* representa uma espécie de grande importância econômica para o mercado nacional. A produção agrícola do maracujá-amarelo, nos últimos anos, tem sofrido decréscimo e o tempo de exploração tem sido limitado pela ocorrência de doenças nas áreas de cultivo (Monzani et al. 2015). A suscetibilidade a problemas fitossanitários torna a espécie propensa a infecções ocasionadas principalmente por patógenos fúngicos veiculados pelo solo, como *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* (Fop), o agente etiológico da murcha de *Fusarium*.

A murcha de *Fusarium* é uma das principais doenças que afeta severamente a produtividade dos maracujazeiros. A limitação quanto à existência de métodos curativos no controle da murcha de *Fusarium* na cultura do maracujá, associada à inconsistência dos métodos químicos e da resistência genética, tem dado suporte à investigação de práticas alternativas e sustentáveis como forma de implementar o manejo integrado de doenças de plantas.

O uso de agentes de controle biológico no manejo de fitopatógenos em culturas agrícolas, tem apresentado um aumento expressivo devido à grande demanda por alternativas que evidenciam funções ecológicas e sustentáveis, como forma de mitigar ou suprimir a ação de patógenos e seus efeitos nocivos sobre o metabolismo das plantas e nas interações na microbiota rizosférica (Niu et al. 2020, Stenberg et al. 2021). As estratégias devem propor a redução da densidade populacional do patógeno em solos infestados e a sua capacidade de infectar hospedeiros.

Ao atuar diretamente sobre o metabolismo celular patogênico, os agentes de biocontrole podem interferir nos processos fisiológicos referentes ao crescimento micelial, germinação e esporulação, que em alguns casos podem induzir à supressão do patógeno. O gênero *Trichoderma* é considerado um potencial agente de biocontrole biológico, em função da sua eficiência e do seu amplo espectro de ações antimicrobianas (Kamaruzzaman et al. 2021). Tal feito é proporcionado pela presença de mecanismos de ação como micoparasitismo, produção e secreção de compostos orgânicos voláteis ativos, competição e indução de defesa nas plantas hospedeiras (Benítez et al. 2004, Mukhopadhyay & Kumar, 2020).

Bactérias do gênero *Bacillus* estão entre os microrganismos que apresentam elevado potencial de sucesso durante as interações ecológicas, em meio às

atividades de biocontrole, devido a capacidade de formação de estruturas de resistência e a rápida colonização (El-Bendary; Hamed; Moharam 2016), que favorecem a capacidade de manutenção e sobrevivência, em solos de áreas cultivadas (Cruz et al. 2013). Cepas de *Bacillus* spp. são extensivamente avaliadas quanto ao seu potencial em proteção de plantas e promotores de crescimento (Huang et al. 2012).

Os agentes de biocontrole apresentam mecanismos de interação, que devem ser elucidados como forma de potencializar o controle e selecionar linhagens eficientes (Mishra et al. 2018). Os métodos selecionados para triagem de microrganismos promissores visam abordagens que englobam uma ampla gama de mecanismos relacionados às atividades antagônicas, como produção de metabólitos, competição, parasitismo, utilização de fontes de carbono específicas e atividades enzimáticas antimicrobiana (Rojas et al. 2020).

Diante deste contexto, o presente estudo foi realizado com o objetivo de avaliar o potencial antagônico e a eficiência *in vitro* de isolados de *Bacillus* spp. e *Trichoderma asperellum* no controle do patógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* e elencar possíveis mecanismos de ações envolvidos.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Fitopatologia Hermes Peixoto da Embrapa Mandioca e Fruticultura, unidade localizada no município de Cruz das Almas, Bahia. Foi utilizada a cepa de *Trichoderma asperellum* (Tri-81), já empregada no desenvolvimento de estudos como potencial agente de biocontrole de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, em cultura de banana. Os isolados de *Bacillus* spp. e o patógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* foram obtidos da coleção microbiológica do laboratório de Fitopatologia (Tabela 1). O isolado patogênico foi proveniente de plantas da espécie *Passiflora edulis* que apresentavam sintomas típicos da murcha de *Fusarium* em uma área produtora de maracujá, no município de Cruz das Almas, o qual foi selecionado como o isolado mais agressivo em análise de sobrevivência de *P. edulis* (Pires 2020).

Os isolados fúngicos e bacterianos foram reativados em meios de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA) e Ágar nutriente (NA), respectivamente, e mantidos

em câmara de germinação tipo BOD (Demanda Bioquímica de Oxigênio) a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , em fotoperíodo de 12 horas.

Foram realizados testes *in vitro* quanto à capacidade de inibição do crescimento micelial de *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae* por meio de testes de antagonismo direto, compostos orgânicos voláteis e não voláteis e a identificação qualitativa da síntese de enzimas líticas extracelulares com perfil antimicrobiano.

**Tabela 1.** Identificação dos isolados *Bacillus* spp., *Trichoderma asperellum* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* utilizados nos ensaios *in vitro*.

Código	Isolados	Local de coleta	Hospedeiro	Origem
CMF1007	<i>T. asperellum</i>	nd	Plantio Sisal	Solo
BAC 2	<i>Bacillus</i> sp.	Cruz das Almas-BA	nd	Nd
BAC 3	<i>Bacillus</i> sp.	Cruz das Almas-BA	nd	nd
BAC 4	<i>Bacillus</i> sp.	Cruz das Almas-BA	nd	nd
BAC 5	<i>Bacillus</i> sp.	Cruz das Almas-BA	nd	nd
BAC 6	<i>Bacillus</i> sp.	Cruz das Almas-BA	nd	nd
APC51	<i>Bacillus</i> sp.	Cruz das Almas-BA	Prata Anã	Pseudocaule
APC07	<i>Bacillus</i> sp.	Cruz das Almas-BA	Prata Anã	Pseudocaule
PA05	<i>Bacillus</i> sp.	Cruz das Almas-BA	Prata Anã	Rizosfera
01C	<i>Bacillus</i> sp.	Cruz das Almas-BA	Feijão	Endofítica
399	<i>Bacillus</i> sp.	nd	nd	Nd
CMF3115	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>passiflorae</i>	Cruz das Almas-BA	<i>P. edulis</i>	Colo/raiz

\*nd= não identificável

### Avaliação de antagonismo em teste de pareamento direto

O potencial antagônico dos isolados de *Bacillus* spp. e *Trichoderma asperellum* sobre o desenvolvimento micelial de *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* foi avaliado por meio do método de cultura pareada, descrito por Dennis & Webster (1971), adaptado.

Para o antagonismo de *Bacillus* spp., discos miceliais de 6 mm de diâmetro retirados da borda da cultura de Fop, com 10 dias de crescimento, foram repicados no centro de placas de Petri de 90 mm de diâmetro, contendo meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA). Os isolados de *Bacillus* spp., cultivados em caldo nutriente por 24 h a  $28^\circ\text{C}$  sob agitação orbital de 120 rpm, foram depositados sobre

quatro discos de papel filtro Whatman nº 1, esterilizados, em posições equidistantes a 1cm da borda da placa, utilizando-se 10 µL da suspensão bacteriana a  $10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>. E então, acondicionados em BOD à temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  com fotoperíodo de 12 horas.

Os tratamentos foram compostos pelo isolado Fop x 10 isolados de *Bacillus* spp., com dez repetições em delineamento inteiramente casualizado. Como controle foram mantidas apenas discos miceliais de Fop, inoculados no centro de cada placa com meio BDA, e quatro discos de papéis filtro contendo 10 µL de água destilada esterilizada e incubadas em BOD a  $28^\circ\text{C}$  com fotoperíodo de 12 horas por 10 dias.

As avaliações consistiram na mensuração do crescimento micelial do patógeno, aos 10 dias do acréscimo do patógeno, utilizando o software Image J, até a testemunha completar seu crescimento, compreendendo toda a superfície do meio. Os valores obtidos das medições foram convertidos em porcentagem de inibição do crescimento micelial do patógeno (PICM), utilizando a fórmula de Menten et al. (1976):  $\text{PICM} (\%) = [(T - t) / T] \times 100$ . Onde, T é a testemunha e t o tratamento.

Para o antagonismo de *Trichoderma asperellum*, discos miceliais de 6 mm de diâmetro de *Trichoderma* (antagonista) foram colocados em posições opostas ao disco de *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae*, em placas de Petri contendo meio de cultivo BDA, e com o distanciamento de aproximadamente 1 cm da borda da placa. As placas foram incubadas em BOD a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  com fotoperíodo de 12 horas, por 10 dias, com 10 repetições em delineamento inteiramente casualizado.

Após o período de incubação, foram feitas medições dos diâmetros das colônias de Fop e transformados em PICM. A avaliação do crescimento micelial de *T. asperellum* foi utilizada para classificar o grau de antagonismo de acordo com a escala de notas proposta por Bell et al. (1982): Categorias de antagonismo: 1- antagonista cresce sobre o patógeno e ocupa toda a superfície do meio; 2- antagonista cresce sobre pelo menos 2/3 do meio; 3- antagonista e o patógeno crescem cada um sobre a metade do meio; 4- o patógeno cresce sobre pelo menos 2/3 do meio; 5- o patógeno ocupa toda a superfície do meio.

## Produção de Compostos Orgânicos Voláteis e atividade antifúngica

Para a identificação de atividade antifúngica por meio de compostos orgânicos voláteis produzidos por isolados de *Bacillus* spp. e *Trichoderma asperellum*, sobre o crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae*, foi utilizada a metodologia das placas sobrepostas proposta por Dick & Hutchinson (1966).

A montagem das unidades experimentais foi estruturada através da utilização de duas placas de Petri de 90 mm, sobrepostas. Para os isolados bacterianos, na placa inferior foi inoculada 100 µL de suspensão bacteriana a  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> sobre o meio Agar Nutriente, e espalhadas uniformemente com a alça de Drigalsky, de forma a produzir uma camada uniforme de células na superfície do meio. E na placa superior, contendo meio de cultura BDA, um disco de micélio da cultura de Fop (6mm), foi depositado no centro. As placas foram seladas com filme de PVC e incubadas a 28 °C em BOD, com fotoperíodo de 12 horas, por 12 dias, até que o micélio do fungo, na placa controle, atingisse o crescimento máximo em toda placa.

Para *Trichoderma asperellum*, um disco de micélio da cultura foi depositado sobre o meio BDA, na placa inferior, e um disco micelial do patógeno, na placa superior. As placas foram sobrepostas e vedadas com filme PVC e incubadas em BOD a  $25 \pm 2$  °C, com fotoperíodo de 12 horas, por 12 dias. No tratamento controle, as placas de Petri contendo o patógeno foram invertidas sobre placas contendo apenas meio de cultura, sem a presença do antagonista.

Todas as placas foram fotografadas, e o diâmetro médio das colônias do patógeno foi mensurado aos 12 dias, por meio do software Image J. os valores médios de inibição, foram determinados por meio da fórmula PCIM (%) =  $[(T-t) / T] \times 100$  (Menten et al. 1976), onde “T” representa o valor do diâmetro do controle e “t” o valor do diâmetro do tratamento na presença do antagonista, medidas em milímetros. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com dez repetições.

## **Produção de Compostos Orgânicos Não-voláteis e efeito sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae***

A produção e o efeito de metabólitos secundários não voláteis sobre o crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* foi verificado a partir da incorporação de filtrados de culturas de *Bacillus* spp. e *Trichoderma asperellum* ao meio de cultura, conforme Mello et al. (2007). Isolados de *Bacillus* spp. foram transferidos para frascos de Erlenmeyers com capacidade para 150 mL contendo caldo nutriente, e incubados por sete dias, sob agitação orbital (Lab line Instruments, Inc., modelo 60160) de 120 rpm, à temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ .

Para *T. asperellum*, 3 discos miceliais foram cultivados em meio Batata Dextrose (BD), em Erlenmeyers de 250 mL, durante 7 dias em agitação orbital a 120 rpm e temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ . Após o período de incubação, as culturas foram centrifugadas (Hettich® ROTINA 420/420R centrifuge) a 4000 rpm por 10 minutos, e em seguida filtradas, utilizando filtro Millipore Millex® com porosidade de  $0,45\mu\text{m}$ , acoplado a seringas de 10 mL. 5 mL do filtrado de cada cultura de *Bacillus* spp. e *T. asperellum*, foram acrescidos a 15 mL de meio BDA fundente, próximo a solidificação, após esterilização em autoclave, e vertidos em placas de Petri. Discos miceliais, 6 mm, do patógeno foram depositados sobre o meio de cultura contendo os filtrados.

Como controle foram adicionados 5 mL de água destilada esterilizada ao meio de cultura fundente. As placas foram incubadas em BOD a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  com fotoperíodo de 12 horas. As placas foram fotografadas, e o diâmetro das colônias patogênicas foram mensurados aos 12 dias, por meio do software Image J.

## **Produção de enzimas hidrolíticas por isolados bacterianos e características antimicrobianas**

Os isolados de *Bacillus* spp. foram submetidos a testes enzimáticos para determinação de atividades enzimáticas de protease, celulase e quitinase, envolvidas em atividade antagônica contra fitopatógenos.

Para determinação de atividade proteolítica, os isolados bacterianos foram semeados em meio ágar, suplementado com leite desnatado, conforme Kazanas

(1968), adaptado. Os isolados foram repicados em locais distintos na superfície do meio, quatro repetições por tratamento, e incubadas a 28°C por 48 horas. Colônias que apresentaram, após incubação, formação de halos transparentes ao redor da área de crescimento da colônia, em contraste com o aspecto leitoso do meio, determinaram a presença de atividade proteolítica.

Para detecção da produção de celulase, os isolados foram cultivados em meio de cultura sais minerais, de acordo com Breccia et al. (1995), modificado ( $\text{NaNO}_3$ , 1,2 g.L<sup>-1</sup>;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 3,0 g.L<sup>-1</sup>;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 6,0 g.L<sup>-1</sup>;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,2 g.L<sup>-1</sup>;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,05 g.L<sup>-1</sup>;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,001 g.L<sup>-1</sup>;  $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,01 g.L<sup>-1</sup>; Agar bacteriológico, 15,0 g.L<sup>-1</sup>; pH 7,0), suplementado com carboximetilcelulose (5 g.L<sup>-1</sup>), como única fonte de carbono. Os isolados foram repicados no meio, com quatro repetições por tratamento, e incubadas a 28°C por 4 dias. Após incubação, foram adicionados 10 mL de solução de Vermelho Congo a 0,5 % (p/v) em cada placa e, em temperatura ambiente, após 15 minutos foram realizadas lavagens sucessivas com solução de NaCl 1M. A observação de uma zona amarelo alaranjada ao redor das colônias bacterianas indicou a produção de celulase.

A capacidade de produção de quitinase foi determinada pelo método descrito por Renwick; Campbell; Coe (1991), onde os isolados foram repicados, por pontos na superfície do meio de sais minerais ( $\text{CaCO}_3$ , 0,02 g.L<sup>-1</sup>;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,01 g.L<sup>-1</sup>; KCl, 1,71 g.L<sup>-1</sup>;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,05 g.L<sup>-1</sup>;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 4,11 g.L<sup>-1</sup>; ágar 15 g.L<sup>-1</sup> e pH ajustado para 7,0), suplementado com quitina coloidal a 0,08% como única fonte de carbono. Foram realizadas quatro repetições para cada tratamento e incubados a 28 °C durante 10 dias. A capacidade de produção de quitinase foi caracterizada com a presença de um halo claro ao redor da colônia, contrastando com o aspecto turvo do meio.

### **Detecção da produção de sideróforos**

A caracterização de isolados de *Bacillus* spp. quanto à produção de sideróforos foi determinada pela detecção de pigmentos fluorescentes sob a incidência da luz negra, descrito conforme Lamichhane & Varvaro (2013), adaptado. Os isolados foram semeados em meio ágar PGS (peptona 10 g.L<sup>-1</sup>;



gelatina 20 g.L<sup>-1</sup>; sacarose 20 g.L<sup>-1</sup>; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1g.L<sup>-1</sup>; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 1 g.L<sup>-1</sup>; ágar 15 g.L<sup>-1</sup>; pH ajustado para 7.2), isento de ferro. Foram utilizadas quatro repetições para cada tratamento, e incubadas a 28°C por 72 horas. Transcorrido esse período, as culturas foram submetidas à detecção de fluorescência com visualização sob a luz negra. A presença de fluorescência nas colônias observadas indicou a produção de sideróforos.

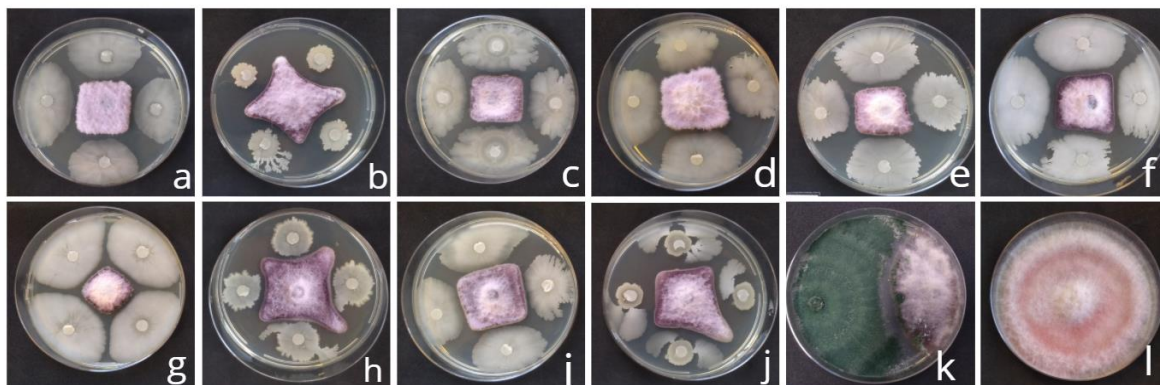
### **Análise estatística**

Os dados foram submetidos à análise de variância utilizando o teste F, e para determinação de diferenças significativas existentes entre os tratamentos, as médias foram comparadas e agrupadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Foi utilizado o programa estatístico SISVAR (Ferreira 2014).

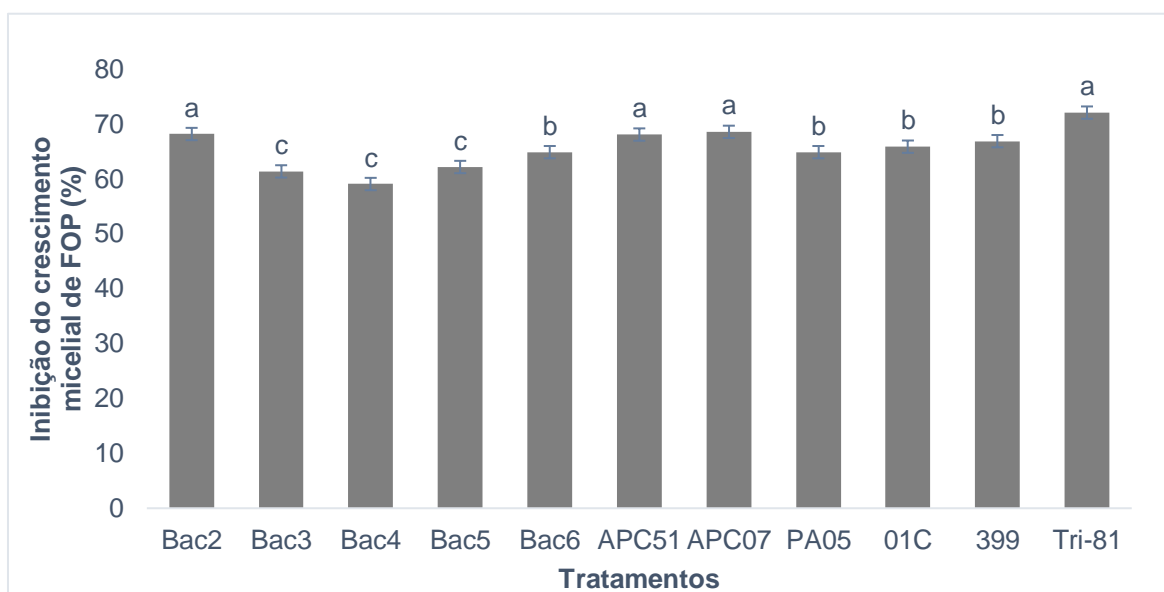
## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Avaliação de antagonismo em teste de pareamento direto**

No teste de cultivo pareado a presença de atividade antagônica por isolados de *Bacillus* spp. foi determinada por meio da inibição do crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* (Fop) *in vitro*. Todos os isolados de *Bacillus* spp. exibiram antagonismo estatisticamente significativo, com redução do crescimento de Fop após dez dias de incubação em condições controladas (Figura 1). Os maiores percentuais de inibição foram determinados pelos isolados APC07, APC51 e Bac2, com valores de 68,5%, 68% e 68,1%, respectivamente, diferindo estatisticamente dos demais isolados analisados. Os isolados bacterianos 399, 01C, PA05 e Bac6, apresentaram porcentagens de inibição micelial de 66,8%, 65,8%, 64,8% e 64,8%, com diferença estatística em relação aos isolados Bac5, Bac3 e Bac4, que exibiram inibições de 62,1%, 61,3% e 59%, respectivamente (Figura 2).



**Figura 1:** Atividade antagonista *in vitro* de isolados de *Bacillus* spp. e *Trichoderma asperellum* contra *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae* em testes de antagonismo direto, após 10 dias de crescimento em meio de cultura BDA. Isolados de *Bacillus* sp. Bac 2 (a); *Bacillus* sp. Bac 3 (b); *Bacillus* sp. Bac 4 (c); *Bacillus* sp. Bac 5 (d); *Bacillus* sp. Bac 6 (e); *Bacillus* sp. APC51 (f); *Bacillus* sp. APC07 (g); *Bacillus* sp. PA05 (h); *Bacillus* sp. 01C (i); *Bacillus* sp. 399 (j); *Trichoderma asperellum* Tri-81 (k); controle (l).



**Figura 2.** Inibição do crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* (Fop) *in vitro*, em teste de pareamento direto, por *Bacillus* spp. e *Trichoderma asperellum*. Médias seguidas por letras distintas na mesma coluna diferem entre si, pelo teste de Scott knott, a 5% de probabilidade. Coeficiente de variação (%) = 6,46.

A interação antagonista foi evidenciada pela inibição do crescimento micelial de Fop associada à formação de halos de inibição, os quais caracterizam a presença de secreção e acúmulo de metabólitos extracelulares com propriedades fungistáticas, pelas colônias bacterianas (Cawoy et al. 2015).

Isolados bacterianos da mesma espécie, embora morfologicamente semelhantes, podem apresentar comportamentos fisiológicos distintos ao longo da interação antagônica com outros microrganismos. Além da variabilidade genética, inerente a cada isolado, que condiciona a presença de características fisiológicas específicas, há também a interferência de condicionantes externos que influenciam no desenvolvimento, como a disponibilidade de nutrientes, ação do pH e da temperatura (Bomfim et al. 2010).

No presente estudo, a presença de micélio do patógeno com coloração mais escura, próximo à zona de inibição, caracteriza a provável presença de conteúdo citoplasmático na região periférica da célula, decorrente da ação de compostos antimicrobianos sobre as estruturas miceliais, ocasionando alterações morfológicas, como vacuolizações e deformações nas hifas (Montealegre et al. 2003).

A síntese de compostos difusíveis bacteriano, de baixo peso molecular, como antibióticos (peptídeos, policetídeos, lipopeptídeos, bacteriocinas), enzimas extracelulares e metabólitos altamente tóxicos, são responsáveis por exibir atividade supressiva sobre o crescimento fúngico de fitopatógenos (Benítez et al. 2004), ao produzir distúrbios morfológicos, inchaços e lise em sua parede celular (Li et al. 2020).

A presença de atividade antimicrobiana no gênero *Bacillus* é relatada principalmente em decorrência da síntese de antibióticos, com destaque para a classe dos lipopeptídeos cíclicos, que devido suas especificidades atuam de forma diferenciada no antagonismo (Zouari et al. 2016). Em ensaios de antagonismo direto, a expressão de genes que codificam a biossíntese e secreção de compostos bioativos é potencialmente estimulada e modulada em resposta à sinalização promovida por metabólitos secundários secretados por agentes patogênicos presente no meio de cultivo (Karimi et al. 2016, Gabardo et al. 2020, Sridharan et al. 2021). Lipopeptídeos pertencentes às famílias das fengicinas, iturinas e surfactinas foram detectados em maiores quantidades quando cepas bacterianas foram expostas à presença de patógenos, em testes de cultura dupla (Cossus et al. 2021).

A síntese de lipopeptídeos cíclicos de diferentes famílias, produzidos pelas mesmas cepas, possuem diferentes funcionalidades, desde a atuação sinérgica na potencialidade da supressão do patógeno, até o estabelecimento bacteriano nos

tecidos radiculares ao longo da interação planta-microrganismo, produzindo motilidade, biofilme e sinalizadores bioquímicos (O'Brien 2017, Karthika; Midhun; Jisha 2020, Zouari et al. 2016), que são fatores primordiais para a garantia de sucesso da ação de biocontrole.

Durante as interações ecológicas, o crescimento moderado de fungos como *Fusarium oxysporum* podem fornecer às cepas bacterianas antagonistas mais tempo para produzir metabólitos antifúngicos e, portanto, apresentar maior efeito inibitório (Arroyave-Toro; Mosquera; Villegas-Escobar 2017), condição que, em campo, pode favorecer o processo de colonização e estabelecimento rizosférico de cepas bacterianas que apresentam rápido crescimento, como o gênero *Bacillus*.

*Bacillus subtilis*, apresentou atividade antifúngica de amplo espectro, sobre o crescimento micelial de quatro espécies de *Fusarium*, *F. sambucinum*, *F. solani*, *F. oxysporum* e *F. graminearum*, causadores da murcha de *Fusarium* em culturas de *Solanum tuberosum* L., exibindo porcentagens de inibição de 85,3%, 72,8%, 54,7% e 73,6%, respectivamente (Ben Khedher; Mejdoub-Trabelsi; Tounsi 2021).

Quanto ao antagonismo da cepa *Trichoderma asperellum*, em condições controladas, este exibiu atividade inibitória sobre o crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae*, com inibição de 72% (Figura 2). Observou-se que *T. asperellum* estabeleceu contato físico com a área de crescimento de Fop, apresentando a emissão de prolongamentos miceliais e esporulação sobre a colônia patogênica (Figura1 k). O contato físico pode caracterizar a presença de competição entre os organismos, por recurso nutricional fornecido no meio de cultura, onde o antagonista é favorecido em função do seu crescimento acelerado (Cherkupally; Amballa; Bhoomi 2017).

De acordo com seu grau de antagonismo, *Trichoderma asperellum* foi classificado conforme a escala de notas de Bell (1982), como antagonista eficiente, por apresentar nota 2, em que o crescimento do agente antagonista, cresce sobre pelo menos 2/3 do meio, e apresenta estruturas sobrepostas ao micélio do patógeno (Figura1 k).

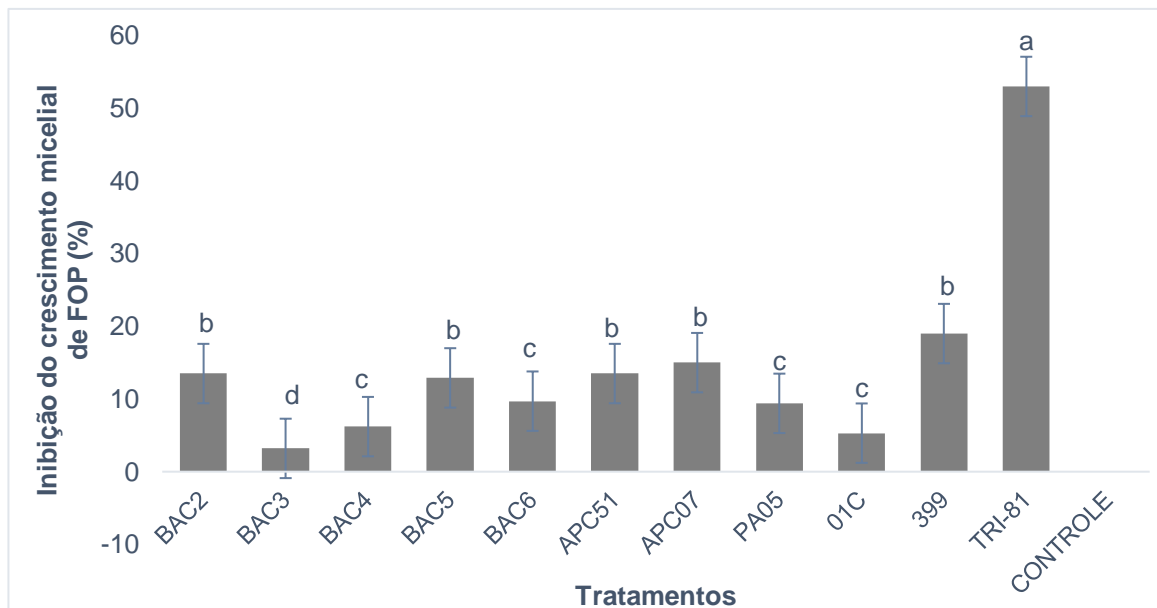
Em ensaios de co-cultivo, *Trichoderma asperellum* apresentou grande vantagem frente ao agente patogênico, devido sua capacidade de rápido crescimento e esporulação, o que lhe confere alto potencial competidor e micoparasitário (Tian et al. 2020).

Gajera et al. (2016) relataram que *Trichoderma koningii* e *Trichoderma viride* foram responsáveis por exibir alta capacidade de inibição do crescimento micelial de *Ralstonia solani*, agente causador da podridão radicular em algodoeiros. As cepas de *Trichoderma* apresentaram elevada expressão de genes funcionais para quitinase e metabólitos secundários, com propriedades químicas citotóxica e antifúngica, ao serem submetidos à presença de polímeros da parede celular do fitopatógeno.

Durante a ação micoparasitária de *Trichoderma* ocorre a indução de vias de transdução de sinal, responsáveis pela síntese de compostos enzimáticos que atuam diretamente sobre a estrutura celular dos fungos patogênicos (Guo et al. 2020). A interação envolve a detecção do fungo hospedeiro, fixação, enrolamento e formação de estruturas semelhantes a apressórios, seguida da secreção de enzimas hidrolíticas e peptaibóis associados à patogênese, que resultam na lise e dissolução da parede celular das hifas dos patógenos (Gajera et al. 2016, Guigón-López et al. 2014).

### **Produção de Compostos Orgânicos Voláteis (COVs) e atividade antifúngica**

Foi avaliada a atividade antifúngica dos isolados de *Bacillus* spp. (Bac2, Bac3, Bac4, Bac5, Bac6, APC51, APC07, PA05, 01C e 399) e de *T. asperellum* sobre o desenvolvimento de *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae*, sob a influência da produção de compostos orgânicos voláteis emitidos pelos antagonistas. Em relação aos efeitos dos COVs emitidos por *Bacillus* spp. e *T. asperellum*, não foi observado efeito supressivo significativo sobre o crescimento micelial de *Fusarium oxysporum passiflorae*, em relação ao controle (Figura 3). Os isolados de *Bacillus* spp., Bac2, Bac3, Bac4, Bac5, Bac6, APC51, APC07, PA05, 01C e 399, exibiram os valores de 13,5%, 3,2%, 6,2%, 12,9%, 9,7%, 13,5%, 15,0 %, 9,4%, 5,3% e 19% respectivamente (Figura 3).



**Figura 3:** Efeito inibitório de Compostos Orgânicos Voláteis (COVs) produzidos por *Bacillus* spp. e *Trichoderma asperellum* sobre o crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae*, após 12 dias de incubação a 27°C. Médias seguidas por letras distintas na mesma coluna diferem entre si, pelo teste de Scott-knott, a 5% de probabilidade. Coeficiente de variação (%) = 16,36.

Presume-se, que a ausência de uma atividade antagônica expressiva por isolados de *Bacillus* spp., reportada no presente estudo, pode estar associada às condições de estudo, como as especificidades dos isolados, a disponibilidade de nutrientes, temperatura, pH, condições de crescimento e características físico-químicas do meio de cultura onde o antagonista é cultivado. Tais condições são determinantes para a ocorrência de variações expressivas, na produção e emissão dos compostos voláteis, as quais refletem em suas interações, desde o estímulo até a efetividade do composto na ação antagônica (Wheatley 2002).

No entanto, a exposição aos compostos voláteis produzidos por *Bacillus* spp. induziu a ocorrência de alterações morfológicas nas colônias de Fop, pois o micélio aéreo apresentou-se menos denso, esparso e com variações pigmentares, quando comparadas ao controle. A pigmentação micelial é característica da síntese de melanina e de compostos com estrutura química semelhante à melanina (Preto et al. 2017), que são metabólitos secundários de composição fenólica ou indólica (Toledo et al. 2017), armazenados na parede celular fúngica, a qual confere proteção contra radiação, oxidação, temperaturas extremas, metais pesados, ação enzimática e a microrganismos; além de proporcionar rigidez estrutural às paredes

celulares, com armazenamento de H<sub>2</sub>O e íons, evitando a dessecação e o estresse osmótico (Liu et al. 2008, Preto et al. 2017, Siletti; Zeiner; Talbot 2019). Interferências na formação da melanina por atividades de COVs podem comprometer esse mecanismo de proteção fúngica (Bruce et al. 2003).

Cepas de *Bacillus* spp. podem sintetizar diversas classes de Compostos Orgânicos Voláteis, específicas para cada espécie, entre elas: cetonas, pirazinas, terpenóides, álcoois e sulfetos (Guevara-Avenidaño et al. 2020). A emissão e composição dos metabólitos voláteis são fortemente influenciadas pelas concentrações bacterianas sob condições controladas, principalmente durante a fase de crescimento microbiano (Bruce et al. 2003, Fincheira et al. 2017, Misztal et al. 2018).

Em ensaios, a emissão de COVs bacterianos em baixas concentrações mostrou-se insuficiente para promover ações antagônicas expressivas, como inibir o crescimento micelial patogênico, a esporulação e germinação. No entanto, essas concentrações podem induzir indiretamente o mecanismo de defesa da planta, o que confere resultados significativos na supressão da doença, condicionando a eficiência dos efeitos diretos à presença dos compostos em altas concentrações (Sharifi & Ryu 2016).

O perfil bioquímico dos compostos voláteis permite que suas moléculas se difundam rapidamente a longa distância entre as partículas do solo, e promovam funções ecológicas, tanto como eliciadores na indução de resistência sistêmica, quanto promotores de crescimento (Syed-AB-Rahman et al. 2019).

A emissão de Compostos Orgânicos Voláteis produzidos por *Trichoderma asperellum* exibiu efeito antagônico significativo sobre o crescimento de Fop, com a média de inibição micelial de 53% (figura 3). A síntese de metabólitos voláteis por *Trichoderma* spp., como álcoois, ésteres, cetonas e aldeídos, são responsáveis por inibir, expressivamente, o crescimento micelial de fungos patogênicos, mediante a interação com receptores específicos localizados na membrana celular (Abd alla El-Bialy et al. 2019).

Características químicas como baixo peso molecular, alta volatilidade e baixa polaridade, possibilitam a ação direta sobre a esporulação e a germinação, além de provocar distorções morfológicas nas estruturas miceliais e conidiais (Silva et al. 2021), como vacuolização e espessamento da parede celular (Chaurasia et al. 2005). Suas propriedades físico-químicas e a magnitude da sua emissão, podem

sofrer alterações em consonância ao desenvolvimento e o ciclo de vida do fungo (Lee et al. 2016).

Os compostos voláteis emitidos por *Trichoderma* spp. podem desempenhar importantes funções dentro das interações entre planta e microrganismo, seja por meio da modulação de sinais hormonais nas diferentes vias metabólicas (Eslahi et al. 2021), ou por regulação de genes relacionados ao mecanismo de defesa durante a colonização da planta hospedeira (Vinale et al. 2008). Durante o estabelecimento das relações simbióticas ao longo da superfície radicular *Trichoderma* sp. produz compostos bioativos que desempenham o papel de eliciadores na indução da resistência sistêmica (Guo et al. 2020).

Micélios de *Sclerotinia sclerotiorum* expostos à ação de COVs produzidos por *Trichoderma* sp. apresentaram heterogeneidade quanto à produção de proteínas, quando comparadas ao controle. A diversidade na expressão de proteínas diferenciais está relacionada diretamente ao mecanismo de defesa do patógeno em resposta à ação antagônica, como a inativação dos metabólitos antimicrobianos (Silva et al. 2020).

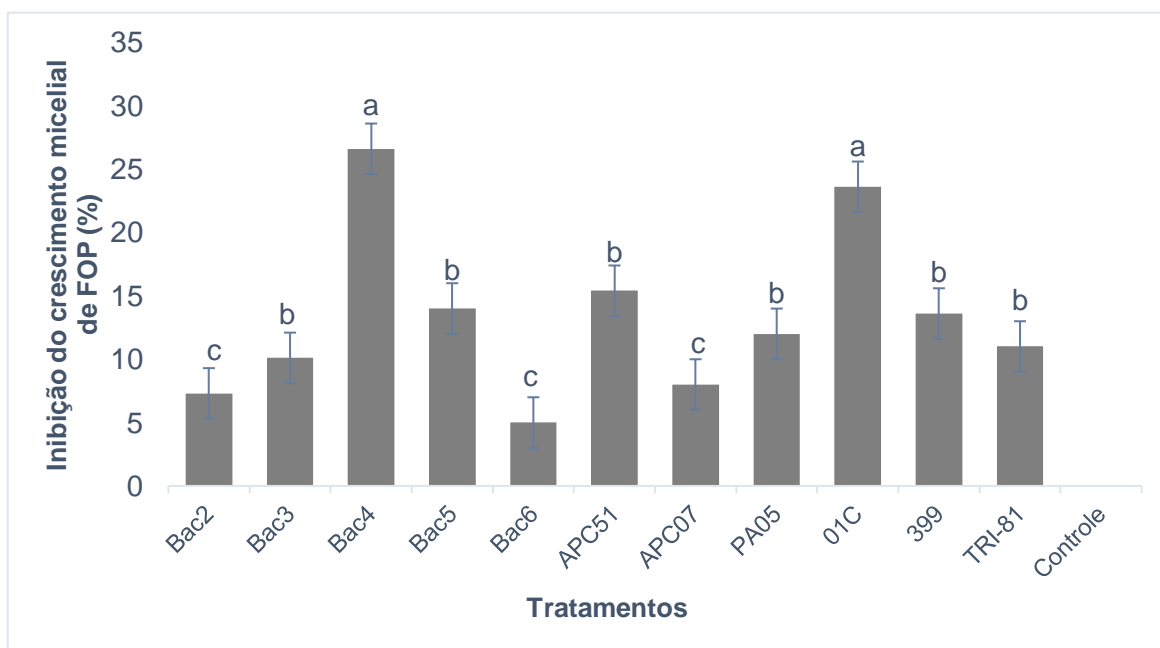
Em ensaios antagônicos, foi observado que *Trichoderma* spp. inibiu significativamente a produção de micotoxinas produzidas por *Fusarium* spp., com redução de 23% da produção de tricotecenos tipo A e 33% de fumosinina B e ácido fusárico (Tian et al. 2020). Decorrente da sua habilidade competitiva, *Trichoderma* possui a capacidade de converter metabólitos de alta toxicidade, como micotoxinas, em moléculas de baixa toxicidade, como os tricotecenos tipo A glicosilado (Tian et al. 2020).

Lazazzara e colaboradores (2021), reportou que COVs ( $\alpha$ - farneseno, cadineno, 1,3-octadieno, 2-pentilfurano e 6-pentil-2H-piran-2-ona), emitidos por cepas de *Trichoderma asperellum* T34, *T. harzianum* T39 e *T. atroviride* SC1 foram responsáveis pela redução da severidade do míldio em discos de folhas de videira, causado por *Plasmopara viticola*, por meio da ativação de mecanismos de defesa da planta, como a formação de calos nos sítios de infecção e o aumento na modulação de genes relacionados à proteção.



## Produção de compostos orgânicos não-voláteis e efeito sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae*

Os isolados de *Bacillus* spp. Bac4 e 01C apresentaram os valores mais expressivos em relação a porcentagem de inibição da atividade patogênica de Fop, quando comparadas ao controle, correspondentes a 26,6% e 23,6%, respectivamente, diferindo estatisticamente do controle e dos demais tratamentos. Já os isolados APC51, Bac5, 399, PA05, Bac3, APC07, Bac2 e Bac6 não exibiram efeito antifúngico eficiente, e não produziram resultados significativos sobre a inibição do crescimento de Fop, com valores compreendidos, respectivamente, entre 15,4%, 14%, 13,6%, 12%, 10,1%, 8%, 7,3% e 5,0%. O sobrenadante de *Trichoderma asperellum* também não apresentou inibição satisfatória do crescimento de Fop, exibindo a porcentagem de 11% (Figura 4).



**Figura 4:** Avaliação da inibição do crescimento de *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* por isolados de *Bacillus* spp. e *Trichoderma asperellum*, por meio da produção de compostos orgânicos não voláteis, após 12 dias de incubação. Médias seguidas por letras distintas na mesma coluna diferem entre si, pelo teste de Scott-knott, a 5% de probabilidade. Coeficiente de variação (%) = 12,4.

Sridharan et al. (2021), reportou que ensaios em condições controladas, utilizando o sobrenadante livre de células de *Trichoderma longibrachiatum* foram responsáveis por suprimir 25% do crescimento micelial do patógeno *Macrophomina*

*phaseolina* (Tassi) Goid. As especificidades dos metabólitos sintetizados por *Trichoderma* spp. tendem a varia de acordo com cada espécie.

Em divergência aos resultados encontrados no presente estudo, Erazo et al. (2021) ao avaliar a ação de metabólitos secundários difusíveis presente em culturas filtradas de *Trichoderma harzianum*, reportou que os compostos exibiram efeito inibitório significativo de 78,2%, sobre a atividade patogênica de *Fusarium solani*. Foi relatado que o sobrenadante das cepas 151B1 e YBC de *Bacillus subtilis*, apresentaram resultados significativos, quando comparadas ao tratamento controle, quanto à inibição de germinação de conídios e crescimento micelial de *Fusarium solani*, provocando deformidades anatômicas, com conglobação do tubo germinativo (Chen; Lee; Huang 2021).

O sobrenadante proveniente do cultivo de agentes antagonistas em meio líquido, tem sua composição influenciada pela fase de crescimento celular fúngico ou bacteriano. Culturas com crescimento em fase de declínio, tendem a apresentar redução na secreção de metabólitos, porque algumas classes de peptídeos são sintetizadas, apenas, durante a fase de crescimento ativo e em decorrência da exaustão dos nutrientes presentes no meio, onde as macromoléculas são reaproveitadas para o metabolismo microbiano. A composição do meio, também provoca interferências na biossíntese dos metabolitos secretados pela via de sistemas secretórios (Romeiro 2007).

### **Produção de enzimas líticas e sideróforos por isolados bacterianos**

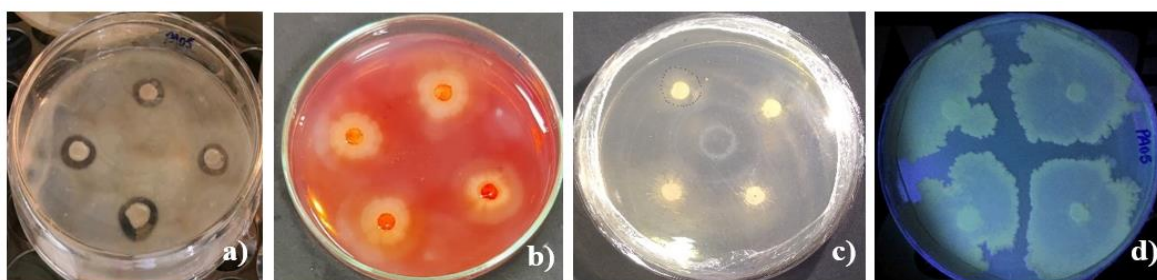
Os ensaios qualitativos para determinação de atividades enzimáticas com perfil antimicrobiano, evidenciaram que os isolados bacterianos apresentam produção extracelular de enzimas hidrolíticas, com maior destaque para as atividades proteolíticas e celulolíticas (Tabela 2), características que evidenciam a capacidade antagônica de atuar diretamente sobre o crescimento fúngico, por meio da hidrólise dos polímeros que compõe a parede celular do patógeno (Kamaruzzaman et al. 2021).

**Tabela 2.** Avaliação qualitativa da produção de enzimas líticas extracelulares e sideróforos, produzidos por isolados de *Bacillus* spp.

Isolados	Celulase	Protease	Quitinase	sideróforos
Bac2	+	+	-	-
Bac3	+	+	-	+
Bac4	+	+	-	+
Bac5	+	+	-	+
Bac6	+	+	+	+
APC51	+	+	+	+
APC07	+	+	+	+
PA05	+	+	-	+
01C	+	+	-	-
399	+	+	+	+

\*(-) sem produção; (+) com produção.

Todos os isolados bacterianos exibiram atividade proteolítica, observável com a formação de halos transparentes ao entorno das colônias, em meio de cultura suplementado a 1% de leite desnatado, após 24 horas de incubação (Figura 5a). As proteases são sintetizadas por meio do metabolismo secundário, onde desempenham funções celulares como morfogênese, parasitismo e competição por nutrientes, gerando fontes de carbono essenciais ao desenvolvimento microbiano (Sawant et al. 2020). No mecanismo de antibiose, sua secreção promove a degradação de componentes estruturais presentes na parede celular fúngica. A secreção de enzimas proteolíticas, em condições ambientais, pode atuar como eliciadores na ativação do mecanismo de defesa da planta (Yasmin et al. 2020).



**Figura 5:** Produção de enzimas extracelulares e sideróforos. Protease-positiva, *Bacillus* sp. PA05 (a); Celulase positiva, *Bacillus* sp. Bac 2 (b); Quitinase positiva, *Bacillus* sp. 399 (c); Sideróforos positivo, *Bacillus* sp. PA05 (d).

Quanto à atividade celulolítica, todos os isolados bacterianos analisados apresentaram a capacidade de hidrolisar celulose. A formação de halos alaranjado

ao entorno das colônias (Figura 5b), após a adição do corante vermelho Congo, evidenciou a secreção da enzima celulase (Chen et al. 2021), onde a carboximetilcelulose foi utilizada como única fonte de carbono (Li et al. 2018).

A celulase promove a clivagem das ligações  $\beta$ -1, 4-glicosídicas da celulose, e em meio à interação planta-microrganismo, são responsáveis por degradar a biomassa celulósica presente nas paredes celulares das plantas, os quais são reconhecidos como Padrões Moleculares Associados a Micróbios (MAMPs), responsáveis por ativar respostas de defesa na planta (Saravanakumar et al. 2016). A síntese de celulase desempenha um importante papel na quebra de polissacarídeos complexos em açúcares simples (Tang; Haruna; Majid 2018).

A presença de atividade quitinolítica (Figura 5c) foi observada apenas nos isolados APC51, APC07, Bac6 e 399 (Tabela 2). Bactérias podem apresentar atividade quitinolítica reduzida, devido à alta capacidade de utilizar a  $\beta$ -1,3-glucanase como fonte de carbono, associadas à produção de sideróforos e antibióticos (Hariprasad et al. 2014).

A quitinase atua na regulação de processos fisiológicos, como crescimento fúngico, autólise, interação entre hifas e hidrólise de substratos (Ting & Chai 2015). A quitina é um importante polissacarídeo, insolúvel e de alto peso molecular (Karthik; Binod; Pandey 2015), presente na composição estrutural da parede celular dos micélios, caules e esporos fúngicos. Seus resíduos de  $\beta$ -1,4-N-acetilglucosamina encontram-se incorporados intrinsecamente à matriz, proporcionando integridade e resistência à célula (Bowman & Free 2006, Monteiro et al. 2010, Patel & Free 2019).

Bactérias quitinolíticas são reportadas por apresentarem elevado potencial no controle de patógenos de plantas. A síntese de quitinase é responsável por catalisar a clivagem da ligação  $\beta$ -1,4 entre duas unidades de N-acetil- $\beta$ -D-glucosamina (GlcNAc), provocando plasmólise nas hifas (El-Tarabily et al. 2000). Além disso, a quitina liberada é aproveitada pelos microrganismos como fonte nutricional de carbono e nitrogênio (Cohen- Kupiec & Chet 1998) e, também, pode ser reconhecida como eliciadores na produção de metabólitos secundários envolvidos no desenvolvimento da planta (Eslahi et al. 2021).

Microrganismos produtores de complexos enzimáticos, responsáveis por degradar a parede celular de agentes fitopatogênicos, são elucidados como potenciais agentes de biocontrole (Nagpure; Choudhary; Gupta 2014), ao promover

a supressão do patógeno durante a colonização da planta hospedeira (Yasmin et al. 2020). *Trichoderma asperellum* apresentou características benéficas relacionadas à sanidade e promoção de crescimento de plantas.

O presente estudo revelou que apenas os isolados *Bacillus* spp. 01C e Bac2 não produziram sideróforos. Os isolados de *Bacillus* spp. Bac3, Bac4, BAC5, Bac6, APC51, APC07, PA05 e 399 exibiram a produção de pigmento extracelular difusível, que emitem coloração verde-amarelo fluorescente, sob a incidência da luz negra, ao serem cultivados em meio de cultura PGS (Figura 7d), confirmando a síntese de sideróforos por isolados bacterianos em condições limitante de ferro.

O ferro é um elemento importante para o metabolismo celular, presente nas reações de fotossíntese, fixação de nitrogênio, fosforilação oxidativa, no ciclo do ácido tricarbóxico, na cadeia transportadora de elétrons, na síntese de DNA e RNA e na formação de biofilmes bacterianos (Khasheii; Mahmoodi; Mohammadzadeh 2021). Em resposta à deficiência de ferro no ambiente, as cepas bacterianas utilizam estratégias para aquisição de íons férrico, como a biossíntese de moléculas quelantes de ferro, os sideróforos (Lamichhane & Varvaro 2013).

Os sideróforos são compostos orgânicos de baixo peso molecular, menor que 10 KDa, produzidos por bactérias, fungos e algumas plantas. Sua alta afinidade por ferro férrico insolúvel ( $Fe^{3+}$ ) o reduz a ferro ferroso ( $Fe^{2+}$ ). Após solubilização, os íons férricos são mobilizados para as células bacterianas por meio do transporte ativo (Khasheii; Mahmoodi; Mohammadzadeh 2021). Além da assimilação do ferro, os sideróforos também possui a capacidade de formar complexos altamente eficiente com outros elementos essenciais no ambiente (Mo, Mn, Co e Ni), de forma a torna-los disponíveis para as células microbianas (Ahmed & Holmström 2014).

Em condições limitantes de ferro, as bactérias tem a produção de sideróforos regulada positivamente (Gu et al. 2020), o que contribui na supressão da atividade patogênica. Ao secretar sideróforos e absorver o ferro, as bactérias impossibilitam o acesso dos patógenos ao pool de ferro presente na rizosfera, tornando-o indisponível para as atividades celulares, o que afeta o metabolismo e o crescimento, principalmente se estes não possuírem receptores específicos para sideróforos (Deketelaere et al. 2017, Dowara et al. 2021).

A elevada produção de sideróforos confere vantagens ao agente antagonista frente a aquisição de íons férrico. A competição por recurso nutricional foi relatada como um mecanismo promissor durante as interações antagônicas com o agente

fitopatogênico (Angel et al. 2016). Além de favorecer a nutrição bacteriana, também fornece um micronutriente que em condições oxidativas, se encontra insolúvel (Khasheii; Mahmoodi; Mohammadzadeh 2021). *Bacillus velezensis* NKG-2 produtor de compostos orgânicos voláteis e sideróforos, mostrou-se altamente eficiente no controle da severidade de *Fusarium oxysporum* em plantas de tomate, além de beneficiar nutricionalmente a planta, ao promover o crescimento das mudas (Myo et al. 2019).

A produção de enzimas e sideróforos são reportados como importantes estratégias utilizadas em atividades antagonicas no controle de uma ampla gama de fitopatógenos, por espécies de *Bacillus* (Shrestha et al. 2015).

## CONCLUSÃO

Os testes de antagonismo direto, evidenciaram que os isolados de *Bacillus* spp. e *T. asperellum* possuem potencial antagonista antifúngico sobre o crescimento de *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae*, comportando-se como possíveis agentes de controle biológico. *Trichoderma asperellum* exibiu características de competição e micoparasitismo à espécie de Fop, além de efeitos supressivos significativo associados à produção de metabólitos voláteis.

A ação de compostos voláteis e filtrados isentos de células microbianas não se mostraram eficiente na inibição do crescimento micelial de Fop *in vitro*, o que reforça que a produção destes metabólitos, possivelmente, pode estar associada às atividades de mecanismo de defesa e promoção de crescimento *in vivo*. A presença da biossíntese de enzimas extracelulares por isolados de *Bacillus* spp. caracteriza atividade antimicrobiana, de atuação direta, sobre a estrutura celular do agente patogênico.

A seleção de microrganismos, com potencialidades antimicrobianas, caracteriza possíveis alternativas para implementar o manejo integrado de doenças de plantas.

## REFERÊNCIAS

ABD ALLA EL-BIALY, H.; SHAHINA, A.A.M.; EL-FOULYA, M.Z.; AWADB, M.A.; KHALIFAB, E.Z.; FAHMYA, S.M. Volatiles and functional peptides compositions of *Trichoderma variants* induced by a new strategy of irradiation. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 20, 2019.

AHMED, E.; HOLMSTRÖM, S. J. M. Siderophores in environmental research: Roles and applications. **Microbial Biotechnology**, v. 7, n. 3, p. 196–208, 2014.

ANGEL, L. P. L.; YUSOF, M.T.; ISMAIL, I.S.; PING, B.T.Y.; AZIN, I.N.A.M.; KAMARUDIN, N.H.; SUNDRAM, S. An *in vitro* study of the antifungal activity of *Trichoderma virens* 7b and a profile of its non-polar antifungal components released against *Ganoderma boninense*. **Journal of Microbiology**, v. 54, n. 11, p. 732–744, 2016.

ARROYAVE-TORO, J. J.; MOSQUERA, S.; VILLEGAS-ESCOBAR, V. Biocontrol activity of *Bacillus subtilis* EA-CB0015 cells and lipopeptides against postharvest fungal pathogens. **Biological Control**, v. 114, n. 7, p. 195–200, 2017.

BELL, D. K. *In vitro* Antagonism of *Trichoderma* species Against Six Fungal Plant. **Pathogens Phytopathology**, v. 72, n. 4, p. 379-382, 1982.

BEN KHEDHER, S.; MEJDOUB-TRABELSI, B.; TOUNSI, S. Biological potential of *Bacillus subtilis* V26 for the control of *Fusarium* wilt and tuber dry rot on potato caused by *Fusarium* species and the promotion of plant growth. **Biological Control**, v. 152, 2021.

BENÍTEZ, T.; RINCON, A.M.; LIMON, M.C.; CODON, A.C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 249–260, 2004.

BOMFIM, M.P.; SÃO JOSÉ, A.R.; REBOUÇAS, T.N.H.; ALMEIDA, S.S.; SOUZA, I.V.B.; DIAS, N.O. Avaliação antagônica *in vitro* e *in vivo* de *Trichoderma* spp. a *Rhizopus stolonifer* em maracujazeiro amarelo. **Summa Phytopathologica**, v.36, n.1, p.61-67, 2010.

BOWMAN, S. M.; FREE, S. J. The structure and synthesis of the fungal cell wall. **BioEssays**, v. 28, n. 8, p. 799–808, 2006.

BRECCIA, J. D.; CASTRO, G.R.; BAIGOR, M.D.; SINERIZ, F. Screening of xylanolytic bacteria using a colour plate method. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 78, n. 5, p. 469–472, 1995.

BRUCE, A.; STEWART, D.; VERRALL, S.; WHEATLEY, R.E. Effect of volatiles from bacteria and yeast on the growth and pigmentation of sapstain fungi. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 51, n. 2, p. 101–108, 2003.

CAWOY, H.; DEBOIS, D.; FRANZIL, L.; DE PAUW, E.; THONART, P.; ONGENA,

M. Lipopeptides as main ingredients for inhibition of fungal phytopathogens by *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens*. **Microbial Biotechnology**, v. 8, n. 2, p. 281–295, 2015.

CHAURASIA, B.; PANDEYA, A.; PALNI, L. M.S.; TRIVEDI, P.; KUMAR, B.; COLVIN, N. Diffusible and volatile compounds produced by an antagonistic *Bacillus subtilis* strain cause structural deformations in pathogenic fungi *in vitro*. **Microbiological Research**, v. 160, n. 1, p. 75–81, 2005.

CHEN, O.; YI, L.; DENG, L.; RUANA, C.; ZENG, K. Screening antagonistic yeasts against citrus green mold and the possible biocontrol mechanisms of *Pichia galeiformis* (BAF03). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 100, n. 10, p. 3812–3821, 2020.

CHEN, Y.H.; LEE, P.C.; HUANG, T.P. Biological control of collar rot on passion fruits via induction of apoptosis in the collar rot pathogen by *Bacillus subtilis*. **Phytopathology**, v. 111, n. 4, p. 627–638, 2021.

CHERKUPALLY, R.; AMBALLA, H.; BHOO MI, N. R. *In vitro* screening for enzymatic activity of *Trichoderma* species for biocontrol potential. **Annals of Plant Sciences**, v.6, n. 11, p. 1784, 2017.

COSSUS, L.; ROUX-DALVAI, F.; KELLY, I.; NGUYEN, T.T.A.; ANTOUN, H.; DROIT, A.; TWEDDELL, R.J. Interactions with plant pathogens influence lipopeptides production and antimicrobial activity of *Bacillus subtilis* strain PTB185. **Biological Control**, v. 154, 2021.

CRUZ, S. M. C.; RODRIGUES, A. A. C.; SILVA, E. K. C.; OLIVEIRA, L. J. M. G. Supressividade por incorporação de resíduo de leguminosas no controle da fusariose do tomateiro. **Summa Phytopathologica**, v. 39, n. 3, p. 180–185, 2013.

DEKETELAERE, S.; TYVAERT, L.; FRANÇA, S.C.; HOFTE, M. Desirable traits of a good biocontrol agent against *Verticillium* wilt. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p.1–23, 2017.

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.

DICK, C.M.; HUTCHINSON, S.A. Biological activity of volatile fungal metabolites. **Nature**, v.211, n.51, p.868, 1966.

DOWARAH, B.; AGARWAL, H.; KRISHNATREYA, D.B.; SHARMA, P.L.; KALITA, N.; AGARWALA, N. Evaluation of seed associated endophytic bacteria from tolerant cv. Firingi Jolokia for their biocontrol potential against bacterial wilt disease. **Microbiological Research**, v. 248, 2021.

EL-BENDARY, M. A.; HAMED, H. A.; MOHARAM, M. E. Potential of *Bacillus* isolates as bio-control agents against some fungal phytopathogens. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 5, p. 173–178, 2016.



EL-TARABILY, K. A.; SOLIMANA, M.H.; NASSARA, A.H.; AL-HASSANIA, H.A.; SIVASITHAMPARAM, K.; MCKENNAD, F.; HARDY, G.E.ST.J. Biological control of *Sclerotinia* minor using a chitinolytic bacterium and actinomycetes. **Plant Pathology**, v. 49, n. 5, p. 573–583, 2000.

ERAZO, J.G.; PALACIOS, S.A.; PASTOR, N.; GIORDANO, F.D.; ROVERA, M.; REYNOSO, M.M.; VENISSE, J.S.; TORRES, A.M. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma harzianum* ITEM 3636 against peanut brown root rot caused by *Fusarium solani* RC 386. **Biological Control**, v. 164, 2021.

ESLAHI, N.; KOWSARI, M.; ZAMANI, M.R.; MOTALLEBI, M. Correlation Study Between Biochemical and Molecular Pathways of *Trichoderma harzianum* Recombinant Strains on Plant Growth and Health. **Journal of Plant Growth Regulation**, 2021.

FERNANDEZ-SAN MILLAN, A.; LARRAYA, L.; FARRAN, I.; ANCIN, M.; VERAMENDI, J. Successful biocontrol of major postharvest and soil-borne plant pathogenic fungi by antagonistic yeasts. **Biological Control**, v. 160, 2021.

FINCHEIRA, P.; PARRA, L.; MUTIS, A.; PARADA, M.; QUIROZ, A. Volatiles emitted by *Bacillus* sp. BCT9 act as growth modulating agents on *Lactuca sativa* seedlings. **Microbiological Research**, v. 203, p. 47–56, 2017.

GABARDO, G.; PRIA, M.D.; PRESTES, A.M.C.; SILVA, H.L. *Trichoderma asperellum* e *Bacillus subtilis* como antagonistas no crescimento de fungos fitopatogênicos *in vitro*. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 8, p. 55870–55885, 2020.

GAJERA, H. P.; HIRPARA, D.G.; KATAKPARA, Z.A.; PATEL, S.V.; GOLAKIYA, B.A.; Molecular evolution and phylogenetic analysis of biocontrol genes acquired from SCoT polymorphism of mycoparasitic *Trichoderma koningii* inhibiting phytopathogen *Rhizoctonia solani* Kuhn. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 45, p.383–392, 2016.

GU, S.; WEI, Z.; SHAO, Z.; FIRMAN, V.; CAO, K.; YANG, T.; KRAMER, J.; WAN, X.; LI, M.; MEI, X.; XU, Y.; SHEN, Q.; KÜMMERLI, R.; JOUSSET, A. Competition for iron drives phytopathogen control by natural rhizosphere microbiomes. **Nature Microbiology**, v. 5, n. 8, p. 1002–1010, 2020.

GUO, R.; WANG, Z.; ZHOU, C.; LIU, Z.; ZHANG, P.; FAN, H. Transcriptomic analysis reveals biocontrol mechanisms of *Trichoderma harzianum* ACCC30371 under eight culture conditions. **Journal of Forestry Research**, v. 31, n. 5, p. 1863–1873, 2020.

GUEVARA-AVENDAÑO, E.; BRAVO-CASTILLO, K.R.; MONRIBOT-VILLANUEVA, J.L.; KIEL- MARTÍNEZ, A.L.; RAMÍREZ-VÁZQUEZ, M.; GUERRERO-ANALCO, J.A.; REVERCHON, F. Diffusible and volatile organic compounds produced by avocado rhizobacteria exhibit antifungal effects against *Fusarium kuroshium*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 51, n. 3, p. 861–873, 2020.

GUIGÓN-LÓPEZ, C.; GUERRERO-PRIETO, V.; LANZUISE, S.; LORITO, M. Enzyme activity of extracellular protein induced in *Trichoderma asperellum* and *T. longibrachiatum* by substrates based on *Agaricus bisporus* and *Phymatotrichopsis omnivora*. **Fungal Biology**, v. 118, n. 2, p. 211–221, 2014.

HARIPRASAD, P.; CHANDRASHEKAR, S.; SINGH, S.B.; NIRANJANA, S.R. Mechanisms of plant growth promotion and disease suppression by *Pseudomonas aeruginosa* strain 2apa. **Journal of Basic Microbiology**, v. 54, n. 8, p. 792–801, 2014.

HUANG, T. P.; TZENG<sup>1</sup>, D.D.; WONG, A.C.L.; CHEN, C.; LU, K.; LEE, Y.; HUANG, W.; HWANG, B. DNA polymorphisms and biocontrol of *Bacillus* antagonistic to citrus bacterial canker with indication of the interference of phyllosphere biofilms. **PLoS ONE**, v. 7, n. 7, 2012.

KAMARUZZAMAN, M.; SAMIUL, I.; MAHMUD, S.; POLASH, S.A.; SULTANA, R.; HASAN, A.; WANG, C.; JIANG, C. *In vitro* and *in silico* approach of fungal growth inhibition by *Trichoderma asperellum* HbGT6-07 derived volatile organic compounds. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 14, n. 9, 2021.

KARIMI, E.; SAFAIE, N.; SHAMS-BAKSHA, M.; MAHMOUDI, B. *Bacillus amyloliquefaciens* SB14 from rhizosphere alleviates Rhizoctonia damping-off disease on sugar beet. **Microbiological Research**, v. 192, p. 221–230, 2016.

KARTHIK, N.; BINOD, P.; PANDEY, A. Purification and characterisation of an acidic and antifungal chitinase produced by a *Streptomyces* sp. **Bioresource Technology**, v. 188, p. 195–201, 2015.

KARTHIKA, S.; MIDHUN, S. J.; JISHA, M. S. A potential antifungal and growth-promoting bacterium *Bacillus* sp. KTMA4 from tomato rhizosphere. **Microbial Pathogenesis**, v. 142, 2020.

KAZANAS, N. Proteolytic Activity of Microorganisms Isolated from Freshwater Fish. **Applied Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 128–132, 1968.

KHASHEI, B.; MAHMOUDI, P.; MOHAMMADZADEH, A. Siderophores: Importance in bacterial pathogenesis and applications in medicine and industry. **Microbiological Research**, v. 250, p. 126790, 2021.

KESWANI, C.; SING, H.B.; HERMOSA, R.; GARCÍA-ESTRADA, C.; CARADUS, J.; HE, Y.; MEZAACHE-AICHOURE, S.; GLARE, T.R.; BORRIS, R.; VINALE, F.; SANSINENEA, E. Antimicrobial secondary metabolites from agriculturally important fungi as next biocontrol agents. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 23–24, p. 9287–9303, 2019.

LAMICHHANE, J. R.; VARVARO, L. A new medium for the detection of fluorescent pigment production by *pseudomonas*. **Plant Pathology**, v. 62, n. 3, p. 624–632, 2013.

LAZAZZARA, V.; VICELLI, B.; BUESCH, C.; PARICH, A.; PERTOT, I.; SCHUHMACHER, R.; PERAZZOLLI, M. *Trichoderma* spp. volatile organic compounds protect grapevine plants by activating defense-related processes against downy mildew. **Physiologia Plantarum**, v. 172, n. 4, p. 1950–1965, 2021.

LEE, S.; YAP, M.; BEHRINGER, G.; HUNG, R.; BENNETT, J.W. Volatile organic compounds emitted by *Trichoderma* species mediate plant growth. **Fungal Biology and Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 1–14, 2016.

LI, Y. T.; HWANG, A.G.; HUANG, C.M.; HUANG, C.H. Effects of *Trichoderma asperellum* on nutrient uptake and Fusarium wilt of tomato. **Crop Protection**, v. 110, p. 275–282, 2018.

LI, Y.; FENGA, X.; WANG, X.; ZHENG, L.; LIU, H. Inhibitory effects of *Bacillus licheniformis* BL06 on *Phytophthora capsici* in pepper by multiple modes of action. **Biological Control**, v. 144, 2020.

MELLO, S.C.M.; ÁVILA, Z.R.; BRAÚNA, L.M.; PÁDUA, R.R.; GOMES, D. Cepas de *Trichoderma* para el control biológico de *Sclerotium rolfsii* Sacc. **Fitosanidad**, v. 11, n.1, p.3-9, 2007.

MENTEN, J.O.M.; MINUSSI, C.C.; CASTRO, C.; KIMATI, H. Efeito de alguns fungicidas no crescimento micelial de *Macrophomina Phaseolina* (Tass.) Goid. “in vitro”. **Fitopatologia Brasileira**, v. 1, n. 2, p. 57-66, 1976.

MISHRA, R.K.; BOHRA, A.; KAMAAL, N.; KUMAR, K.; GANDHI, K.; SUJAYANAND, G.K.; SAABALE, P.R.; SATHEESH, N.S.J.; SARMA, B.K.; KUMAR, D.; MISHRA M.; SRIVASTAVA, D.K.; SINGH, N.P. Utilization of biopesticides as sustainable solutions for management of pests in legume crops: Achievements and prospects. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 28, n. 1, p. 1–11, 2018.

MISZTAL, P. K.; LYMPEROPOULOU, D.S.; ADAMS, R.I.; SCOTT, R.A.; LINDOW, S.E.; BRUNS, T.; TAYLOR, J.W.; UEHLING, J.; BONITO, G.; VILGALYS, R.; GOLDSTEIN, A.H. Emission Factors of Microbial Volatile Organic Compounds from Environmental Bacteria and Fungi. **Environmental Science and Technology**, v. 52, n. 15, p. 8272–8282, 2018.

MONTEALEGRE, J. R.; REYES, R.; PEREZ, L.M.; HERRERA, R.; SILVA, P.; BESOAIN, X. Selection of bioantagonistic bacteria to be used in biological control of *Rhizoctonia solani* in tomato. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 2, p. 38–50, 2003.

MONTEIRO, V. N.; SILVA, R.N.; STEINDORFF, A.S.; COSTA, F.T.; NORONHA, E.F.; RICART, C.A.O.; SOUSA, M.V.; VAINSTEIN, M.H.; ULHOA, C.J. New insights in *Trichoderma harzianum* antagonism of fungal plant pathogens by secreted protein analysis. **Current microbiology**, v. 61, n. 4, p. 298–305, 2010.

MONZANI, R. M.; DUARTE, H.S.S.; DE MIO, L.L.M. Yellow passion fruit in overhead trellis system do not differ in diseases intensity and is more productive compared to vertical trellis system relação ao sistema em espaldeira. **Revista**

**Brasileira de Fruticultura**, p. 1–10, 2015.

MUKHOPADHYAY, R.; KUMAR, D. *Trichoderma*: a beneficial antifungal agent and insights into its mechanism of biocontrol potential. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 30, n.1, 2020.

NAGPURE, A.; CHOUDHARY, B.; GUPTA, R. K. Mycolytic enzymes produced by *Streptomyces violaceusniger* and their role in antagonism towards wood-rotting fungi. **Journal of Basic Microbiology**, v. 54, n. 5, p. 397–407, 2014.

NIU, B.; WANG, W.; YUAN, Z.; SEDEROFF, R.; SEDEROFF, H.; CHIANG, V.L.; BORRIS, R. Microbial Interactions Within Multiple-Strain Biological Control Agents Impact Soil-Borne Plant Disease. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 1–16, 2020.

O'BRIEN, P. A. Biological control of plant diseases. **Australasian Plant Pathology**, v. 46, n. 4, p. 293–304, 2017.

PATEL, P. K.; FREE, S. J. The Genetics and Biochemistry of Cell Wall Structure and Synthesis in *Neurospora crassa*, a Model Filamentous Fungus. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1–18, 2019.

PIRES, R. A. **Agressividade de *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* em plântulas e sua esporulação em diferentes substratos**. 2020. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, Bahia, 2020. 76f.; il.

PRETO, G.; MARTINS, F.; PEREIRA, J.A.; BAPTISTA, P. Fungal community in olive fruits of cultivars with different susceptibilities to anthracnose and selection of isolates to be used as biocontrol agents. **Biological Control**, v. 110, p. 1–9, 2017.

ROMEIRO, R. S. **Controle biológico de Doenças de Plantas: Procedimentos**, Viçosa: Ed. UFV, 172 p.; il., 2007.

ROJAS, E. C.; JENSENA, B.; JØRGENSEN, H.J.L.; LATZ, M.A.C.; ESTEBAN, P.; DING, Y.; COLLINGE, D.B. Selection of fungal endophytes with biocontrol potential against *Fusarium* head blight in wheat. **Biological Control**, v. 144, 2020.

SAWANT, I. S.; WADKAR, P.N.; GHULE, S.B.; SALUNKHE, V.P.; CHAVAN, V.; SAWANT, S.D. Induction of systemic resistance in grapevines against powdery mildew by *Trichoderma asperelloides* strains. **Australasian Plant Pathology**, v. 49, n. 2, p. 107–117, 2020.

SHARIFI, R.; RYU, C.M. Are bacterial volatile compounds poisonous odors to a fungal pathogen *Botrytis cinerea*, alarm signals to arabidopsis seedlings for eliciting induced resistance, or both? **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1–10, 2016.

SHRESTHA, A.; SULTANA, R.; CHAE, J.; KIM, K.; LEE, K. *Bacillus thuringiensis* C25 which is rich in cell wall degrading enzymes efficiently controls lettuce drop caused by *Sclerotinia minor*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 142, n. 3, p. 577–589, 2015.

SILETTI, C. E.; ZEINER, C.A.; TALBOT, J. M. Distributions of fungal melanin across species and soils. **Researchgate**, n. 509, p. 1–21, 2019.

SILVA, L.R.; VALADARES-INGLIS, M.C.; MORAES, M.C.B.; MAGALHAES, D.M.; SIFUENTES, D.N.; MARTINS, I.; MELO, S.C.M. Morphological and protein alterations in *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary after exposure to volatile organic compounds of *Trichoderma* spp. **Biological Control**, v. 147, 2020.

SILVA, L.R.; VALADARES-INGLIS, M.C.; PEIXOTO, G.H.S.; LUCCAS, B.E.G.; MUNIZ, P.H.P.C.; MAGALHAES, D.M.; MORAES, M.C.B.; MELLO, S.C.M. Volatile organic compounds emitted by *Trichoderma azevedoi* promote the growth of lettuce plants and delay the symptoms of white mold. **Biological Control**, v. 152, 2021.

SRIDHARAN, A.P.; THANGAPPAN, S.; KARTHIKEYAN, G.; NAKKEERAN, S.; UTHANDI, S. Metabolites of *Trichoderma longibrachiatum* EF5 inhibits soil borne pathogen, *Macrophomina phaseolina* by triggering amino sugar metabolism. **Microbial Pathogenesis**, v. 150, 2021.

STENBERG, J.A.; SUNDH, I.; BECHER, P.G.; BJÖRKMAN, C.; DUBEY, M.; EGAN, P. A.; FRIBERG, H.; GIL, J.F.; JENSEN, D.F.; JONSSON, M.; KARLSSON, M.; KHALIL, S.; NINKOVIC, V.; REHERMANN, G.; VETUKURI, R.R.; VIKETOFT, M. When is it biological control? A framework of definitions, mechanisms, and classifications. **Journal of Pest Science**, 2021.

SYED-AB-RAHMAN, S.F.; CARVALHAIS, L.C.; CHUA, E.T.; CHUNG, F.Y.; MOYLE, P.M.; ELTANAHY, E.G.; SCHENK, P.M. Soil bacterial diffusible and volatile organic compounds inhibit *Phytophthora capsici* and promote plant growth. **Science of the Total Environment**, v. 692, p. 267–280, 2019.

TANG, A.; HARUNA, A. O.; MAJID, N. M. A. Potential PGPR properties of cellulolytic, nitrogen-fixing, and phosphate-solubilizing bacteria of a rehabilitated tropical forest soil. **bioRxiv**, p. 1–22, 2018.

TIAN, Z.; CHEN, C.; CHEN, K.; LIU, P.; FAN, Q.; ZHAO, J. Biocontrol and the mechanisms of *Bacillus* sp. w176 against postharvest green mold in citrus. **Postharvest Biology and Technology**, v. 159, 2020.

TING, A. S. Y.; CHAI, J. Y. Chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase activities of *Trichoderma harzianum* in response towards pathogenic and non-pathogenic isolates: Early indications of compatibility in consortium. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 1, p. 109–113, 2015.

TOLEDO, A. V.; FRANCO, M.E.E.; LOPEZ, S.M.Y.; TRONCOZO, M.I.; SAPARRAT, M.C.N.; BALATTI, P.A. Melanins in fungi: Types, localization and putative biological roles. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 99, p. 2–6, 2017.

VINALE, F.; SIVASITHAMPARAM, K.; GHISALBERTI, E.L.; MARRA, R.; WOO, S.L.; LORITO, M. *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, n. 1, p. 1–10, 2008.

WHEATLEY, R.E. The consequences of volatile organic compound mediated bacterial and fungal interactions. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 81, n. 1–4, p. 357–364, 2002.

YASMIN, H.; NAZ, R.; NOSHEEN, A.; HASSAN, M.N.; ILYAS, N.; SAJJAD, M.; ANJUM, S.; GAO, X.; GENG, Z. Identification of new biocontrol agent against charcoal rot disease caused by *Macrophomina phaseolina* in Soybean (*Glycine max* L.). **Sustainability (Switzerland)**, v. 12, n. 17, 2020.

ZOUARI, I.; JLAIEL, L.; TOUNSI, S.; TRIGUI, M. Biocontrol activity of the endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* strain CEIZ-11 against *Pythium aphanidermatum* and purification of its bioactive compounds. **Biological Control**, v. 100, p. 54–62, 2016.