



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA  
CAMPUS II-LAGOA SECA/PB  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E AMBIENTAIS-CCAA  
DEPARTAMENTO AGROECOLOGIA E AGROINDÚSTRIA  
CURSO DE AGROECOLOGIA**

**JOÃO VITOR DA SILVA PEREIRA**

**BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS PARA O CONTROLE DA PODRIDÃO SECA  
(*Fusarium* sp.) EM BATATEIRA**

**LAGOA SECA - PB  
2023**

JOÃO VITOR DA SILVA PEREIRA

**BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS PARA O CONTROLE DA PODRIDÃO SECA  
(*Fusarium* sp.) EM BATATEIRA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à  
Coordenação do Curso de Agroecologia da  
Universidade Estadual da Paraíba, como  
requisito parcial à obtenção do título de  
Bacharel em Agroecologia.

**Área de concentração:** Fitopatologia

**Orientadora:** Profa. Dra. Élide Barbosa Corrêa.

**Coorientadora:** Dra. Amanda de Melo Gonçalves Gaião

**LAGOA SECA  
2023**

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure

P436b Pereira, Joao Vitor da Silva.

Bioprospecção de bactérias para o controle da podridão seca (*Fusarium sp.*) em batateira [manuscrito] / Joao Vitor da Silva Pereira. - 2023.

28 p. : il. colorido.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Agroecologia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Agrárias e Ambientais, 2023.

"Orientação : Profa. Dra. Élide Barbosa Corrêa, Coordenação do Curso de Agroecologia - CCAA. "

"Coorientação: Dra. Amanda de Melo Gonçalves Gaião , Coordenação do Curso de Agroecologia - CCAA."

1. *Pseudomonas*. 2. Actinobactéria. 3. Controle biológico.  
4. *Solanum tuberosum*. I. Título

21. ed. CDD 577.55

JOÃO VITOR DA SILVA PEREIRA


BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS PARA O CONTROLE DA PODRIDÃO SECA  
(*Fusarium* sp.) EM BATATEIRA.

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado à Coordenação do Curso de  
Agroecologia da Universidade Estadual  
da Paraíba, como requisito parcial à  
obtenção do título de Bacharel em  
Agroecologia.

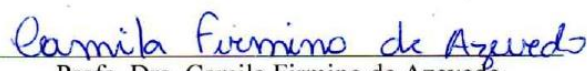
Área de concentração: Fitopatologia

Aprovada em: 14/06/2023.

**BANCA EXAMINADORA**

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Elida Barbosa Corrêa (Orientadora)  
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Amanda de Melo Gonçalves Gaião  
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Camila Firmino de Azevedo  
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Jéssica Karina da Silva Pachú  
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

## **AGRADECIMENTOS**

À minha mãe Cicleide Gomes da Silva, que sempre foi minha fonte de inspiração e me ensinou o valor da persistência e do esforço. Sem ela, eu não seria a pessoa que sou hoje e não teria chegado até aqui.

Gostaria de expressar minha sincera gratidão à minha orientadora e amiga, Élide Barbosa Corrêa, pelos seus ensinamentos, paciência e colaboração em minha pesquisa. Sem o seu apoio e orientação, este trabalho não seria possível. Obrigado por acreditar em mim e me encorajar a ir além.

À Universidade Estadual da Paraíba, por disponibilizar laboratórios de pesquisas e docentes tão capacitados. Sou feliz pela oportunidade de aprender com profissionais tão dedicados e experientes, e pelo suporte que recebi durante todo o curso.

Às minhas amigas de curso, por serem tão essenciais na minha trajetória acadêmica. Obrigado pelo apoio constante, pelas palavras de incentivo e por estarem sempre presentes quando preciso. A amizade e a colaboração de vocês fizeram toda a diferença na minha jornada.

Aos meus amigos, Augusto Rodrigues, Natalia Raquel e Camilla Brasileiro, por serem pilares inabaláveis durante toda a minha jornada na graduação. A presença de vocês e os incentivos durante os altos e baixos da minha busca acadêmica foram inestimáveis. Obrigado por sempre estarem lá quando precisei de um amigo. Tenho muita sorte de tê-los ao meu lado.

Não posso deixar de agradecer à técnica de laboratório Amanda, por sua atenção e dedicação na condução do experimento. Sua colaboração foi fundamental em todas as etapas do trabalho, desde a preparação das amostras até a análise dos resultados. Obrigado por compartilhar seu conhecimento e por trabalhar com tanto empenho ao nosso lado.

“Seus sonhos são a bússola que aponta para o seu destino. Siga-os e você encontrará seu caminho...”.

Beyoncé

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	15
<b>2.1</b>	<b>Micro-organismos utilizados</b> .....	15
<b>2.2</b>	<b>Isolamento e obtenção de <i>Pseudomonas</i> spp. e actinobactérias</b> .....	15
<b>2.3</b>	<b>Isolamento de <i>Fusarium</i> sp.</b> .....	15
<b>2.4</b>	<b>Teste de patogenicidade</b> .....	16
<b>2.5</b>	<b>Teste de antagonismo</b> .....	17
<b>2.5.1</b>	<b>Teste de antagonismo com actinobactéria</b> .....	17
<b>2.5.2</b>	<b>Teste de antagonismo com <i>Bacillus</i> spp</b> .....	18
<b>2.5.3</b>	<b>Teste de antagonismo com <i>Pseudomonas</i> spp</b> .....	18
<b>2.6</b>	<b>Análises estatísticas</b> .....	18
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	19
<b>3.1</b>	<b>Isolamento e obtenção de <i>Pseudomonas</i> spp. e actinobactérias</b> .....	19
<b>3.2</b>	<b>Isolamento de <i>Fusarium</i> sp.</b> .....	20
<b>3.3</b>	<b>Teste de patogenicidade</b> .....	20
<b>3.4</b>	<b>Interações in vitro</b> .....	22
<b>3.4.1</b>	<b>Teste de antagonismo com actinobactéria</b> .....	23
<b>3.4.2</b>	<b>Teste de antagonismo com <i>Bacillus</i> spp</b> .....	23
<b>3.4.3</b>	<b>Teste de antagonismo com <i>Pseudomonas</i> spp</b> .....	25
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	27
<b>5</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	28

## BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS PARA O CONTROLE DA PODRIDÃO SECA (*Fusarium* sp.) EM BATATEIRA.

João Vitor da Silva Pereira\*  
Élida Barbosa Corrêa\*\*

### RESUMO

A batata (*Solanum tuberosum* L.) é uma das culturas alimentares mais consumidas em todo o mundo, ficando em terceiro lugar no ranking global. É também a primeira commodity não grão. Embora a forma convencional de produção de batata ainda predomine no Brasil, a agricultura orgânica tem conquistado um espaço cada vez maior. No entanto, a batateira é muito suscetível a diversas doenças, que podem ser causadas por vários fitopatógenos e por distúrbios fisiológicos abióticos, o que dificulta o manejo orgânico. Dentre as doenças que incidem sobre a cultura da batata, a podridão seca causada por *Fusarium* spp. tem elevada importância. O controle biológico da podridão seca por meio da utilização de rizobactérias é uma medida promissora, podendo ser utilizada em sistemas de produção orgânicos e convencionais. Bactérias do gênero *Bacillus*, *Pseudomonas*. e actinobactérias são as principais utilizadas no controle de doenças de plantas. O objetivo do trabalho foi isolar bactérias associadas a solos de cultivo de batateira agroecológica do gênero *Pseudomonas*. e actinobactérias e avaliar a capacidade de antibiose de *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp. e actinobactérias a *Fusarium* sp., isolado de batata semente agroecológica com sintomas de podridão seca. Para isto foram realizadas técnicas de isolamentos de bactérias em meio seletivo para *Pseudomonas* spp. e para actinobactérias, testes de patogenicidade seguindo as etapas do postulado de Koch que consistiu na sequência de procedimentos utilizados para estabelecer a relação causal entre o micro-organismo e a doença e teste de antagonismo *in vitro* para avaliar a capacidade antagônica das bactérias quanto ao fitopatógeno. Cinco isolados de *Fusarium* spp. foram obtidos em batatas com sintomas de podridão seca. Foram isoladas 8 bactérias em meio seletivo para *Pseudomonas* e 6 actinobactérias. Não foi observado antagonismo entre *Pseudomonas* spp. e as actinobactérias a *Fusarium* sp. Dentre os 15 isolados de *Bacillus* spp. testados, o isolado CFB 046 inibiu o crescimento de *Fusarium* sp. Conclui-se que o isolado de CFB 046 é um potencial agente de controle biológico da podridão seca causada por *Fusarium* sp.

**Palavras-chave:** *Pseudomonas*; *Bacillus*; actinobactéria; controle biológico; *Solanum tuberosum*.

---

\*Discente em Agroecologia na Universidade Estadual da Paraíba-Campus II.  
Vitorpereira.vp644@gmail.com

\*\*Docente da Universidade Estadual da Paraíba-Campus II. elida.uepb@gmail.com



## ABSTRACT

### **BACTERIAL BIOPROSPECTING FOR THE CONTROL OF DRY ROT (*Fusarium* sp.) IN POTATO PLANTS.**

Potato (*Solanum tuberosum* L.) is one of the most consumed food crops worldwide, ranking third globally. It is also the top non-grain commodity. Although conventional potato production still dominates in Brazil, organic agriculture has been gaining increasing importance. However, potato plants are highly susceptible to various diseases caused by multiple phytopathogens and abiotic physiological disorders, which makes organic management challenging. Among the diseases that affects potato cultivation, dry rot caused by *Fusarium* spp. holds significant importance. The biological control of dry rot through the use of rhizobacteria is a promising measure that can be used in both organic and conventional production systems. Bacteria from the genera *Bacillus*, *Pseudomonas*, and actinobacteria are the main ones utilized in plant disease control. The objective of this study was to isolate bacteria associated with agroecological potato cultivation soils from the *Pseudomonas* genera and actinobacteria and to evaluate the antibiosis capacity of *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., and actinobacteria against *Fusarium* sp., isolated from agroecological seed potatoes exhibiting symptoms of dry rot. For this purpose, bacterial isolation techniques were performed using selective media for *Pseudomonas* spp. and actinobacteria, followed by pathogenicity tests following the steps of Koch's postulates, which consist of a sequence of procedures used to establish the causal relationship between the microorganism and the disease. In vitro antagonism tests were also conducted to evaluate the antagonistic capacity of the bacteria against the phytopathogen. Five isolates of *Fusarium* spp. were obtained from potatoes showing symptoms of dry rot. Eight bacteria were isolated using selective media for *Pseudomonas*, and six actinobacteria were isolated. No antagonism was observed between *Pseudomonas* spp. and actinobacteria against *Fusarium* sp. Among the 15 tested isolates of *Bacillus* spp., isolate CFB 046 inhibited the growth of *Fusarium* sp. It can be concluded that the CFB 046 isolate is a potential biological control agent for dry rot caused by *Fusarium* sp.

**Keywords:** *Pseudomonas*; *Bacillus*; actinobacteria; biological control; *Solanum tuberosum*.

## 1 INTRODUÇÃO

A batata (*Solanum tuberosum* L.) é uma das culturas alimentares mais consumidas em todo o mundo, ficando em terceiro lugar no ranking global. É também a primeira commodity não grão, o que significa que é um produto agrícola amplamente comercializado. A batata é uma planta anual herbácea dicotiledônea, pertencente à família *Solanaceae* e ao gênero *Solanum*. Existem mais de 2.000 espécies de *Solanum*, mas apenas cerca de 150 produzem tubérculos, das quais cerca de 20 são cultivadas comercialmente (TOFOLI & DOMINGUES, 2022a).

Em 2022, a produção de batata no Brasil atingiu 3.899,100 toneladas, sendo que os principais estados produtores foram Minas Gerais (33,1%), São Paulo (20,1%) e Paraná (19,9%), de acordo com dados do IBGE (2022). Já na Paraíba, segundo o levantamento do IBGE (2020), a safra de batata foi estimada em 236 toneladas, apresentando um crescimento significativo de 30 vezes maior em relação à estimativa do ano anterior.

Embora a forma convencional de produção de batata ainda predomine no Brasil, a agricultura orgânica tem conquistado um espaço cada vez maior, pois é um sistema de produção de alimentos que busca aliar a preservação ambiental com a não utilização de agrotóxicos, transgênicos e adubos químicos (INGUAGGIATO et al., 2022).

Destaca-se na Paraíba a produção de batata no sistema agroecológico e orgânico. Conforme relatado por Azevedo et al. (2018), mais de 120 famílias no Agreste da Borborema têm se dedicado à produção de batata agroecológica, cultivando mais de 39,3 hectares nos anos de 2013 a 2018, com um volume acumulado de 700 toneladas de batata agroecológica e um rendimento médio de 2,8 toneladas por hectare.

No entanto, esta cultura é muito suscetível a diversas doenças, que podem ser causadas por fungos, chromistas, bactérias, vírus, nematoides e distúrbios fisiológicos abióticos (SUINAGA & PEREIRA, 2015). Muitas delas são devastadoras que quando não controladas, causam perda total da produção ou afetam a qualidade do produto, cuja aparência é muito valorizada pelos consumidores.

Dentre as doenças que incidem sobre a cultura da batata, a podridão seca por *Fusarium* spp. tem elevada importância e é causada por várias espécies de *Fusarium* que incluem *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium avenaceum* e *Fusarium culmorum* (KOTAN, 2009). Esses patógenos são comuns na maioria dos solos onde as batatas são cultivadas e sobrevivem como esporos resistentes no solo ou dentro de tecidos de plantas em decomposição. Pequenas lesões marrons aparecem nos locais dos ferimentos três a quatro semanas após a colheita e continuam a aumentar durante o armazenamento. O apodrecimento extenso faz com que o tecido encolha e colapse, deixando uma área escura e afundada na parte externa do tubérculo, mostrando cavidades internas (HOOKER, 2001).

Embora algumas infecções possam se desenvolver nos tubérculos antes da colheita, a maioria das infecções ocorre quando o fungo entra nos tubérculos através de ferimentos durante e após a colheita (DEAN, 1994). Esta doença é responsável pela redução da produtividade, comercialização e qualidade da semente. As perdas de rendimento da batata por *Fusarium* spp. no armazenamento variam de 20 a 35% e em casos graves, podem chegar a 70% (TOFOLI & DOMINGUES, 2022b).

Como não existem variedades de batatas resistentes a fusariose, a principal recomendação para o controle da doença é preventiva e cultural, sendo recomendado o uso de batata-semente sadia, plantio em solos livres do patógeno ou com baixo

potencial de inóculo, a rotação de culturas e o plantio raso (5-7cm) para facilitar a emergência, além da realização da amontoa quando o caule estiver mais rígido (AMORIM et al., 2016). Além das formas de controle preventivo e cultural, o controle químico é realizado para o manejo da doença, com a utilização de fungicidas (CHELLEMI et al., 2016).

Atualmente, com a demanda para aumentar a produtividade de alimentos para consumo humano e animal, tem sido ampliado o uso de agrotóxicos em sistemas convencionais de produção (ALVES FILHO, 2002). Entretanto, ao longo dos anos, muitos fitopatógenos têm desenvolvido resistência a diversos agrotóxicos (HAHN, 2014) e são inúmeros os casos de contaminação de alimentos com resíduos e de agrotóxicos e contaminação ambiental pelas moléculas químicas.

A preocupação crescente com o impacto dos resíduos de pesticidas sintéticos na saúde tem impulsionado a busca por ferramentas alternativas e ecologicamente sustentáveis para o controle de doenças de plantas (COSTA et al., 2009).

Devido à importância da cultura da batata para o Brasil e dos danos causados pela fusariose é necessário o desenvolvimento de práticas de controle ambientalmente adequadas e eficientes. O controle biológico usando microrganismos antagonistas não patogênicos de ocorrência natural tem sido considerado uma alternativa ambientalmente segura e sustentável ao uso de fungicidas químicos sintéticos, especialmente para o manejo de doenças causadas por patógenos habitantes do solo. Dentre os principais microrganismos utilizados na agricultura como agentes de controle biológico e promotores de crescimento destacam-se às bactérias do gênero *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp. e actinobactérias (VIERA-ARROYO, 2020; ZIN & BADALUDDIN, 2020).

Bactérias do gênero *Bacillus* têm ocorrência cosmopolita e são encontradas em vários locais como no solo, na superfície de plantas, na rizosfera, em grãos armazenados, em insetos mortos, dentre outros. *Bacillus* spp. são bactérias em formato de bastonete, Gram-positivas e aeróbicas, podendo facultativamente crescer em anaerobiose (MONNERAT et al., 2020), capazes de produzir biofilmes e endósporos (esporos tolerantes ao frio, calor, extremos de pH) (GUERREIRO, 2008). O gênero *Bacillus* pertence à família *Bacillaceae* e suas espécies mais representativas são, *Bacillus*, *thuringiensis*, *Bacillus*, *cereus*, *Bacillus*, *pumilus*, *Bacillus*, *licheniformis* e *Bacillus*, *Amyloliquefaciens* e *Bacillus*, *subtilis* (ALVAREZ & SÁNCHEZ, 2016).

*Pseudomonas* é um gênero de Gammaproteobacteria bastante diverso, contendo mais de 60 espécies que apresentam estilos de vida variados em diferentes ambientes, tais como solo, água, superfícies de plantas e animais. Essas bactérias são amplamente encontradas na natureza e possuem habilidade de utilizar uma grande variedade de compostos orgânicos como fontes de energia (CHANWAY, 1993a).

Actinobactérias são bactérias Gram-positivas filamentosas. A maioria desse grupo é saprofítica e encontra-se amplamente distribuída no solo (GENILLOUD et al., 2011). São conhecidas pela sua capacidade de produzir uma grande variedade de enzimas extracelulares e antibióticos, e colonizar plantas (BARAKATE et al., 2002). Possuem aspectos morfológicos e de ciclo celular diferenciados dos demais organismos Gram-positivos. Podem ser aeróbios, microaerófilos ou anaeróbios (LACAZ et al., 2002). Mais recentemente, são classificadas dentro do Filo e da classe Actinobacteria, a qual compreende seis ordens, 39 famílias, 139 gêneros e centenas de espécies. Na agricultura o uso destas bactérias confere muitas vantagens às plantas hospedeiras, tais como a produção de fito-hormônios e sideróforos, a fixação de nitrogênio e a proteção contra agentes patogênicos de plantas por meio da produção de antibióticos ou enzimas extracelulares (BAILEY et al., 2006).

*Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp. e actinobactérias têm a potencialidade de colonizar as raízes das plantas, promoverem o crescimento e reduzirem os danos causados por patógenos. (MONNERAT et al., 2020b); (CHANWAY, 1993b) e (GENILLOUD et al., 2011b).

O objetivo do presente trabalho foi isolar bactérias associadas a solos de cultivo de batateira agroecológica e avaliar a capacidade de antibiose de *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp. e actinobactérias a *Fusarium* sp., isolado de batata semente agroecológica com sintomas de podridão seca.

## 2 METODOLOGIA

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual da Paraíba – Campus II, Localizado em Lagoa Seca no Sítio Imbaúba, s/n, Zona Rural, PB.

### 2.1 Micro-organismos utilizados

Para o desenvolvimento do trabalho foram isoladas bactérias em meio seletivo para *Pseudomonas* spp. e para actinobactérias a partir de três amostras de solos coletadas de agroecossistemas diferentes, onde é realizado o cultivo da batateira, sendo uma da área experimental mandala, localizada no campus II da UEPB, uma da propriedade do agricultor, localizada no município de Lagoa Seca-PB e outra da Agricultura Familiar e Agroecologia (AS-PTA), localizada no município de Esperança-PB.

Os isolados de *Bacillus* spp. utilizados no experimento foram fornecidos pela coleção de microrganismo do Laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual da Paraíba.

*Fusarium* sp. foi isolado a partir de batata agroecológica armazenada em câmara fria com sintomas de podridão seca.

### 2.2 Isolamento e obtenção de *Pseudomonas* spp. e actinobactérias

Para a obtenção das bactérias foi pesado 1g de cada amostra de solo individualmente, transferido para tubos de Falcon contendo 9 mL de água destilada autoclavada. As amostras foram agitadas com auxílio de Vortex por 1 min. As suspensões foram agitadas novamente em Vortex por 1 min e foram realizadas as diluições das amostras até  $10^{-3}$ , utilizando tubos Falcon. 100 $\mu$ L da solução diluída ( $10^{-3}$ ) foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura King B (seletivo para *Pseudomonas* spp.) e para o meio Extrato de Solo Ágar (seletivo para actinobactérias) utilizando alça de Drigalski. Duas repetições foram utilizadas para cada amostra. As placas foram acondicionadas invertidas em incubadora D.B.O (Demanda Bioquímica de Oxigênio) a 25°C por 48 h.

As colônias com crescimento característico do gênero *Pseudomonas* spp. e de actinobactérias foram contabilizadas e purificadas em placas contendo específico para cada grupo bacteriano.

### 2.3 Isolamento de *Fusarium* sp.

Os isolados de *Fusarium* sp. foram obtidos por meio de isolamento indireto de amostras de tubérculo de batatas com sintomas de podridão seca cultivadas em

agroecossistemas no brejo paraibano das variedades Asterix, Ágata e Electra (Figura 01).

**Figura 01-** Cultivares de batata com sintomas da podridão seca causada por *Fusarium* sp., utilizadas para obtenção dos isolados.



**Fonte:** Autoria própria, 2023.

O isolamento e cultivo foram realizados na capela de fluxo laminar esterilizada, feito os fragmentos de tubérculos de batata (0,5 cm) com sintomas de podridão seca, desinfestados superficialmente com álcool a 70% por um minuto, depois os fragmentos foram transferidos para solução de hipoclorito de sódio a 1% por um minuto e por último lavados com água destilada estéril. Os fragmentos foram colocados em placas de Petri contendo batata-dextrose-ágar (BDA) e incubados a  $25\pm 2$  °C por oito dias. Após o crescimento da cultura fúngica, foram identificados os isolados com características específicas de *Fusarium* sp. a partir de seus descritores morfológicos (BARNETT e HUNTER, 1998). O microscópio Axiolab 5 da Zeiss foi utilizado para a visualização dos esporos. As culturas puras de *Fusarium* sp. foram armazenadas a 5 °C em tubos até a utilização nos experimentos.

## 2.4 Teste de patogenicidade

Para a confirmação do agente causal foram seguidas as etapas do postulado de Koch que consiste na sequência de procedimentos utilizados para estabelecer a relação causal, entre o micro-organismo e a doença. Para tanto, o postulado é dividido em quatro etapas, sendo elas a associação entre patógeno-hospedeiro, isolamento/cultivo, inoculação do organismo em plantas sadias e reisolamento (CASTILLO, 2007).

Para a inoculação dos organismos em batata sadia, seguimos o método adaptado de Valluru et al. (2006). Para tanto, 15 tubérculos sadios foram desinfestados superficialmente com hipoclorito de sódio a 2% por 10 min e depois lavados três vezes com água destilada autoclavada. Após a desinfestação, os tubérculos foram secados em condições assépticas. O ferimento mecânico foi realizado através de almofada de alfinetes, contendo 8 mm de profundidade, após o ferimento foi adicionado um disco de micélio do patógeno de 5 mm. As batatas foram acondicionadas em bandejas forradas com guardanapos e um copo descartável de 50 ml com pedaços de algodão dentro e umedecido com água destilada, para controlar a umidade dentro das bandejas, todas foram fechadas com saco plástico e levadas à incubadora a  $25\pm 2$  °C e mantida por sete dias, como mostra na figura 03.

A avaliação consistiu da medição dos diâmetros externos e internos através de um paquímetro como mostra a figura 02.

**Figura 02** - Medição do diâmetro externo (A) e do diâmetro interno (B) das lesões de podridão seca causada por *Fusarium* sp. em batata (*Solanum tuberosum*).

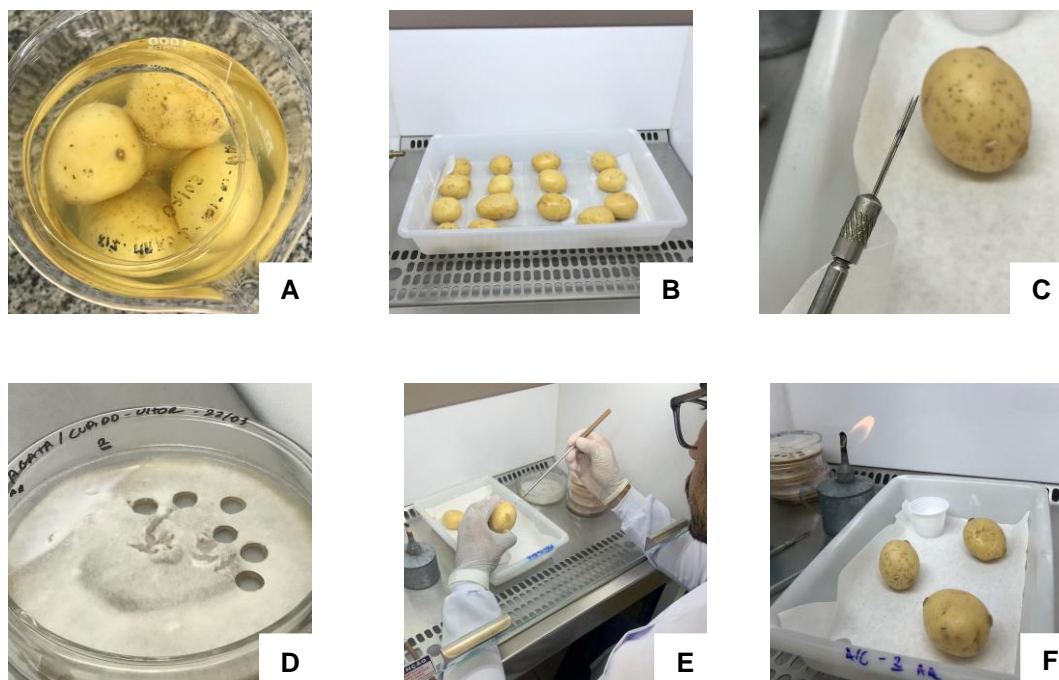


**Fonte:** Autoria própria, 2023.

Foi utilizado delineamento inteiramente casualizado (DIC) e com três repetições. Cinco isolados de *Fusarium* sp. foram inoculados em tubérculos de batatas saudias, para observar qual dos isolados teria maior patogenicidade.

Para o reisolamento foram utilizados fragmentos dos tubérculos o qual foi inoculado o fungo que apresentou maior agressividade.

**Figura 03**- Processo de inoculação do patógeno no hospedeiro. (A) Desinfestação dos tubérculos; (B) Processo de secagem; (C) Ferimento mecânico no tubérculo; (D) Placa de Petri contendo cultura de *Fusarium* sp. utilizado na inoculação; (E) Inoculação do patógeno no hospedeiro e (F) Tubérculos inoculados.



**Fonte:** Autoria própria, 2023.

## 2.5 Testes de antagonismo

O objetivo dos testes de antagonismos foi observar a capacidade antagônica das bactérias quanto ao fitopatógeno *Fusarium* sp., causador da podridão seca em condições *in vitro*. O isolado de *Fusarium* sp. utilizado foi o que apresentou maior agressividade no teste de patogenicidade.

Para as interações *in vitro* foram utilizados quinze isolados de *Bacillus* spp. (CFB 031, CFB 032, CFB 033, CFB 034, CFB 035, CFB 036, CFB 037, CFB 038, CFB 039, CFB 041, CFB 042, CFB 043, CFB 045, CFB 046, CFB 047.); Oito isolados de *Pseudomonas* spp. (CFB I, CFB II, CFB III, CFB IV, CFB V, CFB VI, CFB VII, CFB VIII) e seis isolados de actinobactérias (CFA I, CFA II, CFA III, CFA VI, CFA VII, CFA VIII).

### 2.5.1 Teste de antagonismo com actinobactérias

Seis isolados de actinobactérias foram testados. As bactérias foram dispostas de forma linear no meio de cultura BDA (Batata-Dextrose-Ágar), realizando-se uma estria de 1 cm de comprimento na extremidade da placa com auxílio de uma alça de platina, dois dias antes da aplicação dos disco de micélios (0,5 cm de diâmetro), tempo esse destinado para a estabilização da bactéria no meio. Após a repicagem de *Fusarium* sp., as placas foram mantidas em B.O.D. (25°C) por quinze dias com medição do crescimento micelial do fitopatógeno, obtidas tanto no eixo vertical quanto horizontal, a partir do quarto dia e por onze dias. O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições. A testemunha consistiu de placa de Petri contendo somente *Fusarium* sp.

### 2.5.2 Teste de antagonismo com *Bacillus* spp.

Quinze isolados de *Bacillus* spp. foram testados. As bactérias foram dispostas de forma linear no meio de cultura BDA, realizando-se uma estria com comprimento de 1 cm, na extremidade da placa com auxílio de uma alça de platina, dois dias antes da aplicação dos disco de micélios (0,5 cm de diâmetro), tempo esse destinado para a estabilização da bactéria. Após a repicagem de *Fusarium* sp., as placas foram mantidas em B.O.D. (25°C) por quinze dias com medição do crescimento micelial do fitopatógeno obtidas tanto no eixo vertical quanto horizontal, a partir do quarto dia e por onze dias. O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições. A testemunha consistiu de placa de Petri contendo somente *Fusarium* sp.

### 2.5.3 Teste de antagonismo com *Pseudomonas* spp.

Oito isolados de *Pseudomonas* spp. foram testados. As bactérias foram dispostas no meio de cultura BDA em forma linear, por meio de estria no comprimento de 1 cm, na extremidade da placa com auxílio de uma alça de platina, dois dias antes da aplicação dos disco de micélios (0,5 cm de diâmetro), tempo esse destinado para a estabilização da bactéria. Após a repicagem de *Fusarium* sp., as placas foram mantidas em B.O.D. (25°C) por quinze dias com medição do crescimento micelial do fitopatógeno obtidas tanto no eixo vertical quanto horizontal, a partir do quarto dia e por onze dias. O experimento foi instalado em delineamento

inteiramente casualizado, com três repetições. A testemunha consistiu de placa de Petri contendo somente *Fusarium* sp.

## 2.6 Análises estatísticas

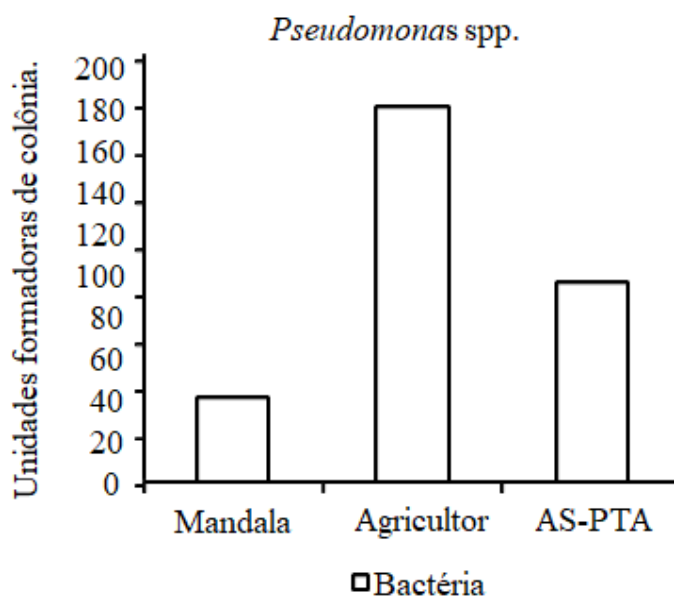
Os resultados obtidos foram submetidos à análises de variância pelo teste F. Quando foi verificado um efeito significativo a 1% e 5% de probabilidade foi aplicado o teste de Tukey e de Scott Knott utilizando o programa estatístico Sisvar.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 3.1 Isolamento e obtenção de *Pseudomonas* spp. e actinobactérias

Foram contabilizadas as unidades formadoras de colônia de bactéria dentro da placa de Petri de cada amostra de solo contendo meio de cultura seletivo para o gênero *Pseudomonas* spp., onde a amostra de solo da mandala desenvolveu 41 unidades formadoras de colônia (UFC), a amostra de solo do agricultor desenvolveu 181 UFC e a amostra de solo da AS-PTA desenvolveu 96 UFC. Observa-se que no solo do agricultor possui uma maior diversidade de bactérias comparada com as demais, como mostra na figura 04. Após o isolamento foram selecionadas oito colônias com crescimento característico do gênero *Pseudomonas* spp. em todas as amostras.

**Figura 04:** Média de quantidade de unidades formadoras de colônia (UFC) por amostras simples de solos pertencente à agroecossistema agroecológico, com uma diluição a  $10^{-3}$  em meio de cultura King B. Onde “Mandala” e “Agricultor” e são amostras de solo pertencente região de Lagoa Seca - PB e AS-PTA é amostra de solo pertencente à região de Esperança - PB.



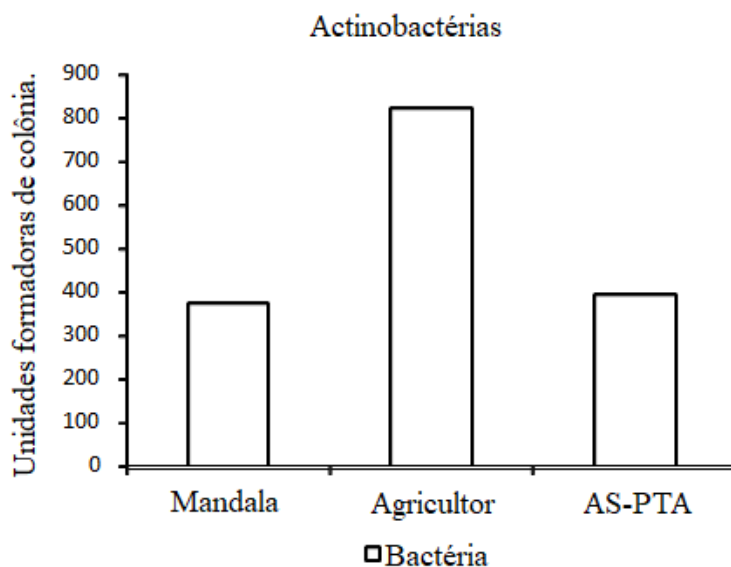
Fonte: Autoria própria, 2023.

Também contabilizada UFC de bactéria dentro da placa de Petri de cada amostra de solo, contendo meio de cultura seletivo para o gênero actinobactérias como mostra onde a amostra de solo da mandala desenvolveu 373 UFCs, a amostra de solo do agricultor desenvolveu 821 UFCs e a amostra de solo da AS-PTA 394 UFCs.



Observa-se que o solo do agricultor possuiu uma maior diversidade de bactérias comparada com as demais, como mostra na figura 05. Após o isolamento, realizou-se a seleção de seis colônias com crescimento característico de actinobactérias em todas as amostras.

**Figura 05:** Média de quantidade de unidade formadoras de colônia (UFC) por amostras simples de solos pertencente à agroecossistema agroecológico, com uma diluição a  $10^{-3}$  em meio de cultura Extrato de Solo Ágar. Onde L. Seca I e II são amostras de solo pertencente a região de Lagoa Seca - PB e Esperança é amostra de solo pertencente a região de Esperança - PB.



Fonte: Autoria própria, 2023.

### 3.2 Isolamento de *Fusarium* sp.

Cinco isolados de *Fusarium* sp. foram obtido de batatas agroecológicas com sintomas de podridão seca, armazenadas na câmara fria do banco de sementes de Lagoa Seca/PB.

As imagens relativas ao processo de purificação de *Fusarium* sp. estão ilustradas na figura 06, com a adição de fragmentos de tecido doente em meio de cultura BDA, seguido de repicagem para meio de cultura para a obtenção de colônia pura.

**Figura 06-** Processo purificação do *Fusarium* sp.



Fonte: Aatoria própria, 2023.

### 3.3 Teste de patogenicidade

Cinco isolados de *Fusarium* sp. foram submetidos ao teste de patogenicidade, buscando visar qual isolado teria maior agressividade. Podemos observar visivelmente que o patógeno mais agressivo externamente, causando podridão seca severa nas cultivares, foi o isolado obtido da cultivar Electra (Fus. 4), como mostra a figura 07.

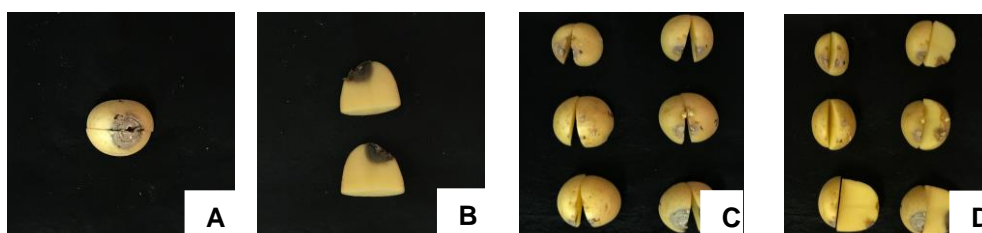
**Figura 07-** Sintomatologia da podridão seca do tubérculo da batata após sete dias de inoculação. Onde Fus.1, Fus.2 e Fus.3 são isolados de *Fusarium* spp. obtidos da cultivar Ágata; Fus.4 isolado de *Fusarium* sp. obtidos da cultivar Electra e Fus.5 isolado de *Fusarium* sp. obtidos da cultivar Asterix.



Fonte: Aatoria própria, 2023.

Já na figura 08, podemos observar que a severidade interna da podridão seca nos tubérculos com o isolado da variedade Electra (Fus. 4), com maior desenvolvimento da lesão, comparando com os demais isolados.

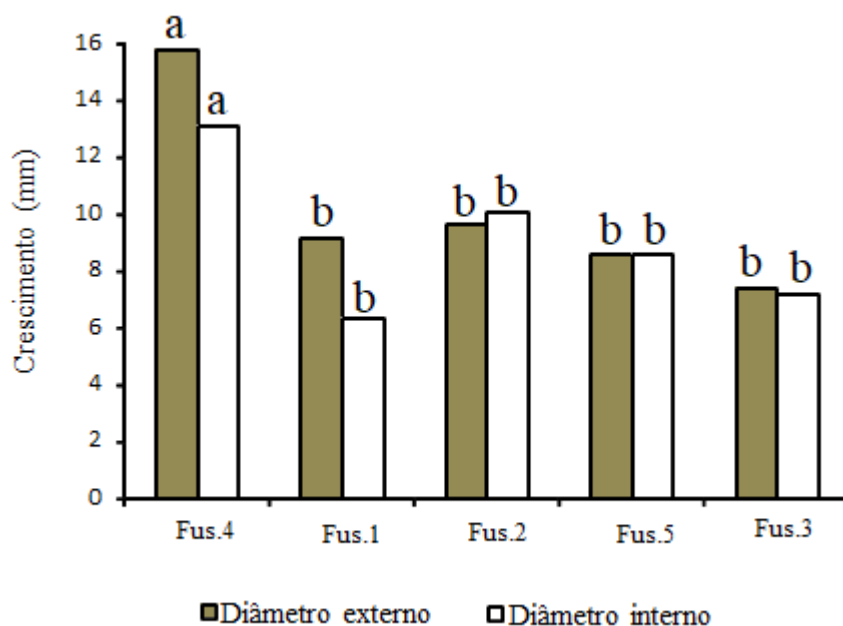
**Figura 08-** Análise dos sintomas da podridão seca em tubérculos de batata. (A), (B), (C) e (D) são Tubérculos inoculados após sete dias em corte longitudinal, mostrando o desenvolvimento do patógeno na parte externa e interna do hospedeiro;



Fonte: Aatoria própria, 2023.

Todos os isolados de *Fusarium* sp. testados foram patogênicos quando inoculados em tubérculos de batata. Para determinar se houve diferença estatística entre os isolados quanto a severidade da podridão dos tubérculos, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5%. Dentre os cinco isolados testados, o isolado Fus. 4 foi o mais agressivo, com maior desenvolvimento da lesão quando comparado aos demais isolados (Figura 9).

**Figura 09-** Diâmetro externo e interno das lesões de podridão seca causada por *Fusarium* spp. Onde Fus.1, Fus.2 e Fus.3 são isolados de *Fusarium* sp. obtidos da cultivar Ágata; Fus.4 isolado de *Fusarium* sp. obtidos da cultivar Electra; Fus.5 isolado de *Fusarium* sp. obtidos da cultivar Asterix. Médias seguidas pela mesma letra não diferem do teste de Tukey a 5%.



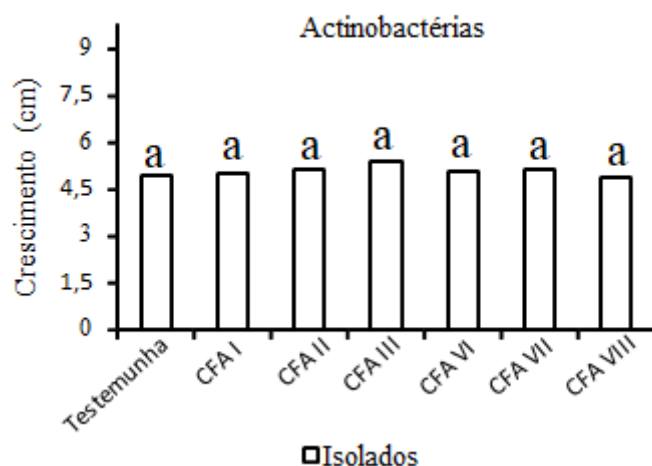
Fonte: Autoria própria, 2023.

### 3.4 Teste de antagonismo com actinobactéria

Não houve diferença quanto ao crescimento micelial de *Fusarium* sp. quando desenvolvido no meio de cultura com as actinobactérias ou na ausência (testemunha) (Figura 10). De acordo com os resultados verificou-se a ausência do antagonismo entre as actinobactérias e o patógeno, pois as actinobactérias não sintetizaram compostos inibidores do crescimento de *Fusarium* sp. (Figura 11).

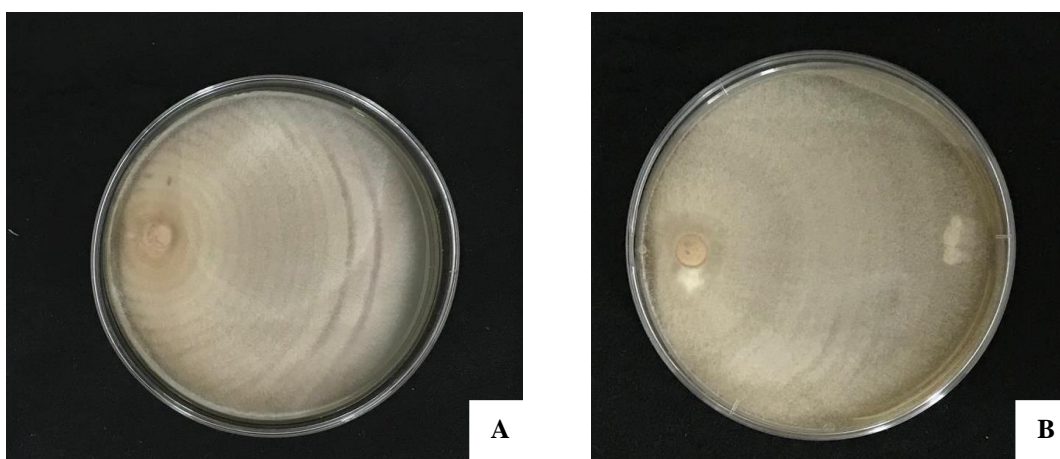
Segundo estudos realizado por Ribeiro et al. (2022) as actinobactérias possuem necessidades nutricionais diferentes em relação à produção de compostos antibióticos, quando não fornecido nutrientes a qual elas necessitam, pode causar alterações em seus crescimentos. Isso implica diretamente em seu poder antagônico contra fungos fitopatogênicos.

**Figura 10:** Diâmetro médio (cm) do micélio de *Fusarium* sp. após 15 dias de pareamento com actinobactérias (CFA). Médias seguidas pela mesma letra não diferem do teste de Scott-Knott a 5%.



Fonte: Autoria própria, 2023.

**Figura 11:** Crescimento de *Fusarium* sp. em meio de cultura BDA contendo actinobactérias ou não (testemunha). (A) Testemunha e (B) Pareamento com actinobactéria (CFA).



Fonte: Autoria própria, 2023.

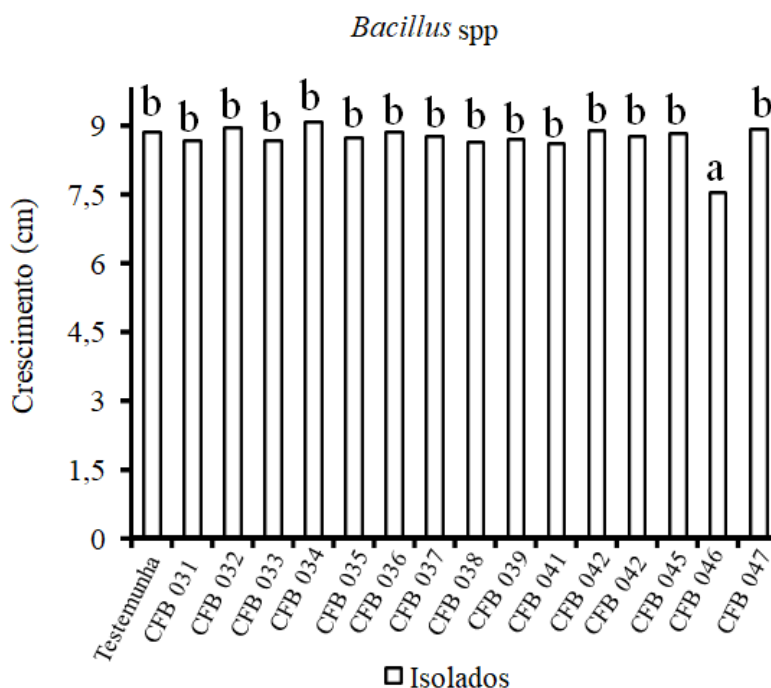
### 3.5 Teste de antagonismo com *Bacillus* spp.

Dentre os 15 isolados de *Bacillus* testados, o isolado CFB 046 inibiu o crescimento do micélio de *Fusarium* sp. (Figura 12), demonstrando antibiose ao fitopatógeno.

Bactérias do gênero *Bacillus* podem inibir o crescimento micelial de fungos pela produção de uma grande gama de metabólitos antifúngicos, entre os quais se encontram lipopeptídeos das famílias da surfactina, iturina e fengicina (LANNA FILHO et al., 2010).

De acordo com Kupper et al. (2003), os micro-organismos que atuam por meio de antibiose demonstram um amplo espectro de ação. Ao inibir fungos patogênicos, sua capacidade de produzir substâncias tóxicas é mais eficaz do que qualquer outro mecanismo de ação. Quando a bactéria isolada entra em contato com o patógeno, pode ocorrer a produção de antibióticos ou a competição por recursos e espaço.

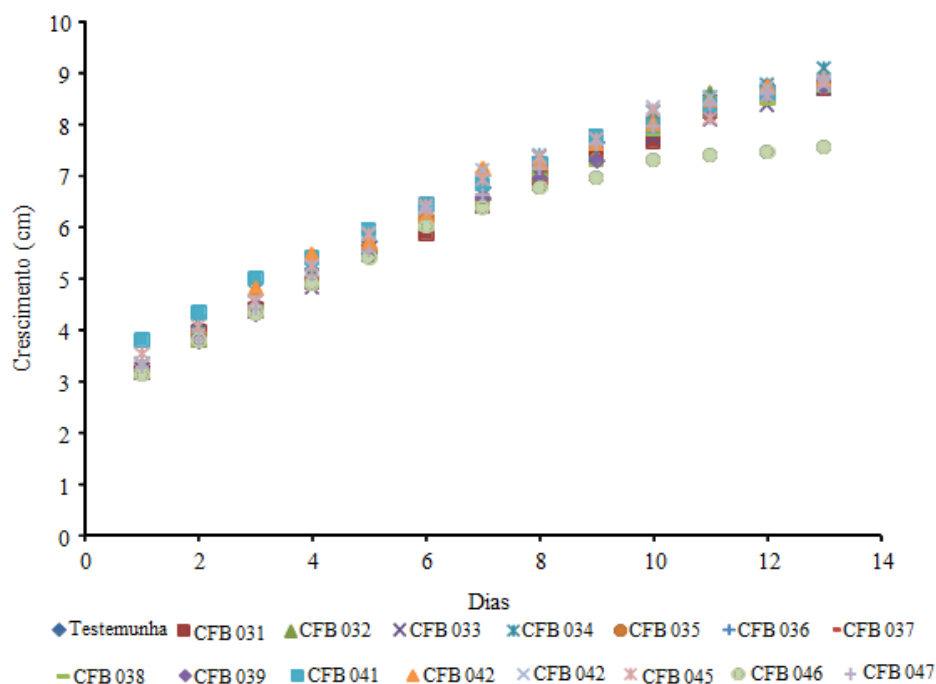
**Figura 12:** Diâmetro médio (cm) do micélio de *Fusarium* sp. após 15 dias de pareamento com *Bacillus* spp (CFB). Médias seguidas pela mesma letra não diferem do teste de Scott-Knott a 5%.



Fonte: Autoria própria, 2023.

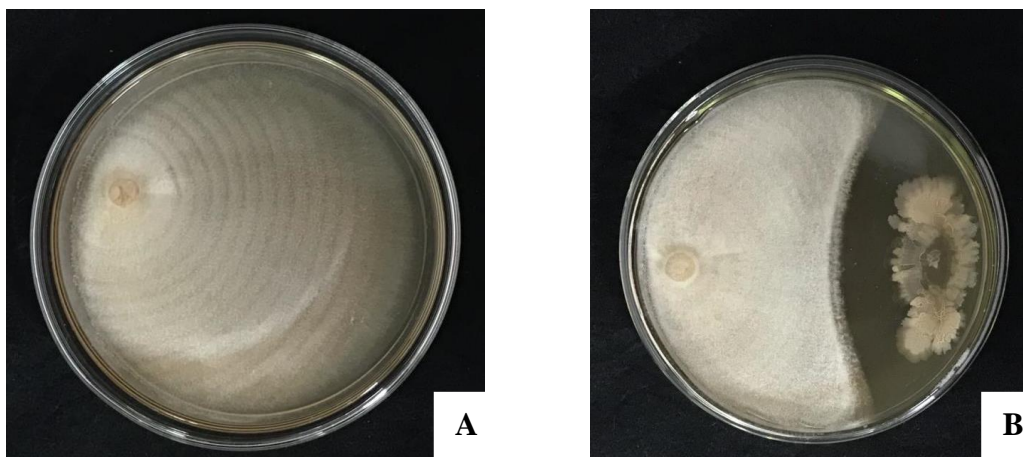
Na figura 13, observa-se a evolução do patógeno durante o teste *in vitro*, onde há um crescimento contínuo nos isolados, porém a partir do décimo dia verifica-se menor crescimento de *Fusarium* sp. quanto pareado com o isolado CFB 046. As equações utilizadas para o enquadramento do gráfico foram quadrática  $y=ax^2+bx=c$  5% e linear  $y= ax+b$ , a 1%.

**Figura 13:** Crescimento do *Fusarium* sp. em meio de cultura BDA em teste de antagonismo com *Bacillus* spp.(CFB 031, CFB 032, CFB 033, CFB 034, CFB 035, CFB 036, CFB 037, CFB 038, CFB 039, CFB 041, CFB 042, CFB 043, CFB 045, CFB 046, CFB 047.).



Fonte: Autoria própria, 2023.

**Figura 14:** Crescimento de *Fusarium* sp. em meio de cultura BDA contendo *Bacillus* spp ou não (testemunha). (A) Testemunha e (B) Pareamento com *Bacillus* spp (CFB 046).

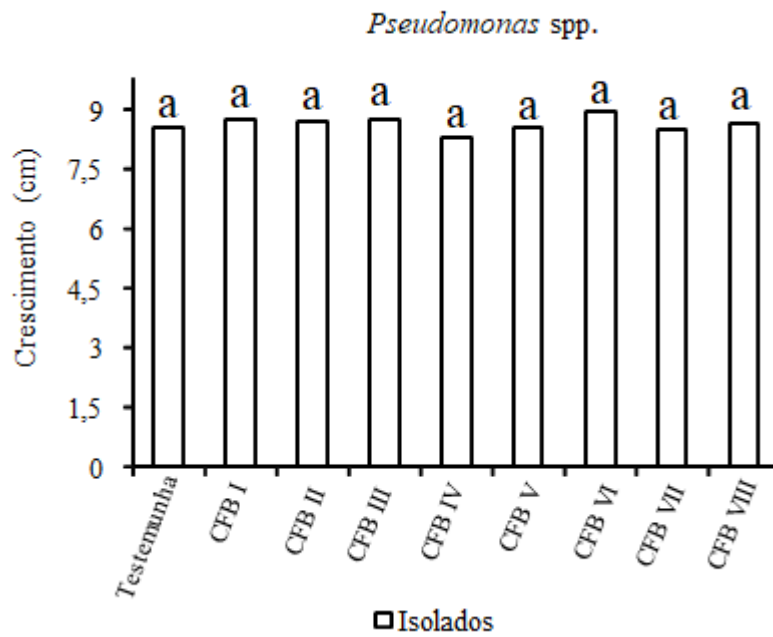


Fonte: Autoria própria, 2023.

### 3.6 Teste de antagonismo com *Pseudomonas* spp.

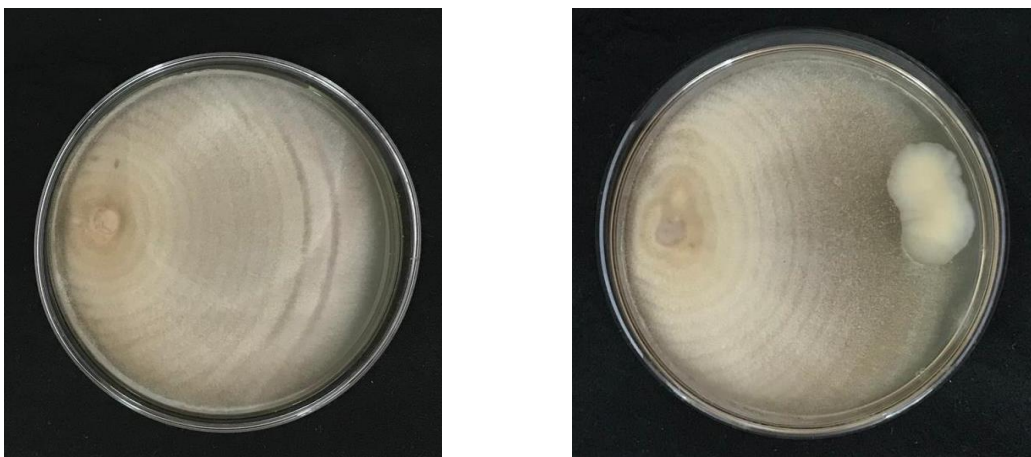
Após o pareamento de *Pseudomonas* spp. com *Fusarium* sp. não houve a redução do crescimento micelial do patógeno (Figura 15 e 16), verificando-se ausência da síntese de antibiose ao fitopatógeno.

**Figura 15:** Diâmetro médio (cm) do micélio de *Fusarium* sp. após 15 dias de pareamento com *Pseudomonas* spp (CFB). Médias seguidas pela mesma letra não diferem do teste de Scott-Knott a 5%.



Fonte: Autoria própria, 2023.

**Figura 16:** Crescimento de *Fusarium* sp. em meio de cultura BDA contendo *Pseudomonas* spp ou não (testemunha). (A) Testemunha e (B) Pareamento com *Pseudomonas* spp (CFB).



Fonte: Autoria própria, 2023.

#### 4 CONCLUSÃO

Isolados de *Fusarium* spp. estão associados aos sintomas de podridão seca em batata agroecológica cultivada no brejo Paraibano e armazenada na câmara fria do banco de sementes de Lagoa Seca/PB.

*Pseudomonas* spp. e as actinobacterias isoladas de solos de cultivo de batata agroecológica não são antagônicas a *Fusarium* sp.

O isolado CFB 046 de *Bacillus* sp. é um potencial agente de controle biológico da podridão seca causada por *Fusarium* sp.



## 5 REFERÊNCIAS

ALVES FILHO, J. P. **Uso de agrotóxico no Brasil: controle social e interesses corporativos**. São Paulo: Annablume, 2002. 188p.

AZEVEDO, W. S. L.; SILVA, E. D. da; SILVA, D. F. da; CORRÊA, É. B. Produção de batata (*Solanum tuberosum*) em sistemas familiares agroecológicos no Agreste da Borborema, Paraíba. Caderno de Agroecologia – ISSN 2236-7934 – Anais do VI CLAA, X CBA e V SEMDF – Vol. 13, N° 1, Jul. 2018.

BAILEY, B. A.; BAE, H.; STREM, M. D.; ROBERTS, D. P.; THOMAS, S. E.; BARNETT, H.L.; HUNTER, Barry. B. Illustrated Genera Of IMPERFECT FUNGI.55121-2097. Forth Edition. Minnesota, 1998.

CHANWAY, C.P.; HOLL, F.B. Ecotypic specificity of spruce emergence-stimulating *Pseudomonas putida*. Forest Science, Bethesda, v. 39, p. 520-527, 1993.

COSTA, R. V. da; CASELA. C. R.; COTA, L. V. Doenças. In: CRUZ, J. C. (Ed.). **Cultivo do milho**. 5. ed. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2009. (Embrapa Milho e Sorgo. Sistema de produção, 1).

CROZIER, J. SAMUELS, G. J.; CHOI, I. Y.; HOLMES, K. A. Fungal and plant gene expression during the colonization of cacao seedlings by endophytic isolates of four *Trichoderma* species. **Planta**, v.224, p.1449-1464, 2006.

ENSAIO DE ANTAGONISMO MICROSCÓPICO *IN VITRO* DE ACTINOBACTÉRIAS CONTRA FUNGOS FITOPATOGÊNICOS. In: Encontro Latinoamericano de Microbiologia Aplicada, VI. (Anais). Porto Alegre, 23 a 25 de novembro de 2022.

FUENTES CASTILLO, C.Los postulados de Koch: revisión histórica y perspectiva actual. **Revista Complutense de Ciencias Veterinarias**,v. 1, n. 2, p. 262–266, 2007.

HAHN, M. The rising threat of fungicide resistance in plant pathogenic fungi: Botrytis as a case study. **Journal of Chemical Biology**. v. 7, n. 4. p. 133-142. Oct. 2014.

Hooker, W.J., 2001. **Compendium of Potato Diseases**. American Phytopathological Society, St. Paul, MN.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. Paraíba, 2020 Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/home/lspa/pernambuco>. Acesso em: 12 mai. 2023.

IBGE; Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção Agropecuária. Acesso em:<https://www.ibge.gov.br/busca.html?searchword=senso+agropecuario+2022>. Acesso em: 12 mai. 2023.

INGUAGGIATO, F. F.; FRANCISCO, J.C.; HIRATA, A. R.; ROCHA, L. C. D. PEDINI, S.; TEIXEIRA, S. H. de O. A produção orgânica em minas gerais: onde estão

os agricultores orgânicos? 14º JORNADA CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA E 11 º SIMPÓSIO DE PÓS-GRADUAÇÃO DO IFSULDEMINAS, v. 14, n. 1, 2022.

Kotan Recep; Sahin Fikrettin; Demirci Erkol; Eken Cafer; **Biological control of the potato dry rot caused by Fusarium species using PGPR.** Biological Control, Volume 50, Issue 2, 2009, 194-198.

KUPPER, K. C.; GIMENES-FERNANDES, N.; GOES, A. de. Controle biológico de Colletotrichum acutatum, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. **Fitopatologia brasileira**, v. 28, n. 3, p. 251-257, 2003.

LANNA FILHO, R.; FERRO, H. M.; DE PINHO, R. S. C. Controle biológico mediado por Bacillus subtilis. **Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 4, n. 2, p. 12-20, 2010.

PARRA, J. R. Postali. Biological Control in Brazil: an overview. **Science Agricola**. Piracicaba. v.71, n.5 p.420-429. set. - out. 2014.

SUINAGA, F. A.; PEREIRA, A. S. Introdução e importância econômica. In: SILVA, G.O.; LOPES, C.A. (Eds.). Sistema de produção da batata. 2. ed. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2015. (Embrapa Hortaliças. Sistema de Produção, 8). Disponível em:[https://www.spo.cnptia.embrapa.br/conteudo?p\\_p\\_id=conteudoportlet\\_WAR\\_sistema\\_de\\_producao\\_lf6\\_1galceportlet&p\\_p\\_lifecycle=0&p\\_p\\_state=normal&p\\_p\\_mode=view&p\\_p\\_col\\_id=column-2&p\\_p\\_col\\_count=1&p\\_r\\_p\\_-76293187\\_sistemaProducaoId=8803&p\\_r\\_p\\_-996514994\\_topicoId=1301](https://www.spo.cnptia.embrapa.br/conteudo?p_p_id=conteudoportlet_WAR_sistema_de_producao_lf6_1galceportlet&p_p_lifecycle=0&p_p_state=normal&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-2&p_p_col_count=1&p_r_p_-76293187_sistemaProducaoId=8803&p_r_p_-996514994_topicoId=1301). Acesso em: 12 mai. 2023.

TÖFOLI, J. G.; DOMINGUES, R. J. SINTOMATOLOGIA, ETIOLOGIA E MANEJO DE DOENÇAS CAUSADAS POR FUNGOS E CHROMISTAS NA CULTURA DA BATATA. **O Biológico**, v. 84, 2022.