

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

*Trichoderma* sp. **E SUBPRODUTOS AGRÍCOLAS NO CONTROLE DO  
MAL DO PANAMÁ**

**MARCELLY SANTANA MASCARENHAS**

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA  
AGOSTO – 2016**

*Trichoderma* sp. **E SUBPRODUTOS AGRÍCOLAS NO CONTROLE DO  
MAL DO PANAMÁ**

**MARCELLY SANTANA MASCARENHAS**

Bacharela em Ciências Biológicas,  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2014.

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

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Ana Cristina Fermino Soares

Co-Orientador: Prof. Dr. Thiago Alves Santos de Oliveira

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA  
AGOSTO – 2016**

## FICHA CATALOGRÁFICA

M395t

Mascarenhas, Marcellly Santana.

*Trichoderma* sp. e subprodutos agrícolas no controle do mal do Panamá / Marcellly Santana Mascarenhas. – Cruz das Almas, BA, 2016.  
74f.; il.

Orientadora: Ana Cristina Fermino Soares.

Coorientador : Thiago Alves Santos de Oliveira.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.

1.Banana – Doenças e pragas. 2.Banana – Mal-do-Panamá. 3.Controle biológico. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.

CDD: 634.772

**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**  
**MARCELLY SANTANA MASCARENHAS**



Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Cristina Fermino Soares  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia



Prof. Dr. José Alberto Pereira  
Instituto Politécnico de Bragança, Portugal



Dr. Saulo Alves Santos de Oliveira  
Embrapa Mandioca e Fruticultura

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

**A Deus por dar força e sabedoria, trazer paz, e acalmar mesmo nos momentos mais difíceis. À minha mãe que sempre esteve presente, me apoiando e estimulando cada passo.**

**Dedico**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela vida, por dar sabedoria, paciência e força nos momentos difíceis.

À toda minha família pelo carinho e compreensão, em especial minha mãe Sandra pelo amor incondicional, por sempre acreditar em mim e reconhecer todo o meu esforço, minha irmã Millena, pelo companheirismo, conversas e conselhos. Ao meu namorado Ricardo, por todo amor e companheirismo.

A Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola pela oportunidade de realização dos meus estudos de graduação e de pós-graduação.

A FAPESB pelo apoio financeiro as atividades de pesquisa por meio dos editais de infra-estrutura para apoio a Pós-graduação e pela bolsa de mestrado.

À minha orientadora Prof. Ana Cristina Fermino Soares e Co-orientadores Thiago Oliveira e Elizabeth Duarte por quem tenho enorme admiração e carinho, por todo o conhecimento, paciência e parceria.

A todos os amigos e colegas, que tornaram meus dias mais alegres, compartilharam momentos únicos e inesquecíveis, fizeram com que os risos sempre estivessem presentes, também pelas dificuldades passadas juntos, a Jó, Milas, Lua, Lilis, Gueu, Dede, e outros, não seria a mesma coisa sem vocês, obrigada por tudo.

À minha turma do mestrado de 2014.2, por quem tenho enorme carinho e afeto, sentirei saudades de vocês.

A todos do Laboratório de Microbiologia, por colaborarem com o meu crescimento, as técnicas que sempre deram suporte em especial Lene, as minhas Bixotinhas, Jú, Malus, Likita, Antônia, Carol.

A todos que estiveram comigo durante esse tempo, meu muito obrigada!

# SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

INTRODUÇÃO ..... 10

**CAPITULO 1 - *Trichoderma* sp. e subprodutos agrícolas no controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* ..... 13**

A cultura da banana ..... 14

O Mal do Panamá e o fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*..... 15

Controle biológico..... 17

*Trichoderma* spp..... 18

Subprodutos agrícolas..... 21

REFERÊNCIAS..... 23

**CAPITULO 2 - *Trichoderma* sp. e subprodutos agrícolas no controle do mal do Panamá ..... 33**

RESUMO ..... 34

ABSTRACT ..... 35

INTRODUÇÃO ..... 36

MATERIAIS E MÉTODOS ..... 38

RESULTADOS..... 49

DISCUSSÃO..... 63

CONCLUSÃO ..... 67

REFERÊNCIAS..... 68

CONSIDERAÇÕES FINAIS ..... 74

## RESUMO

MASCARENHAS, M. S. *Trichoderma* sp. e subprodutos agrícolas no controle do mal do Panamá. Cruz das Almas, 2016. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

A banana (*Musa* spp.) é uma das frutas mais consumidas no Brasil e no mundo. A bananicultura está estabelecida em todas as regiões do país. Dentre as doenças que ocorrem nesta cultura destaca-se o mal do Panamá, causado pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) que é altamente destrutivo e limita a produção mundial de banana. O patógeno pode sobreviver no solo por algumas décadas através de estruturas de resistência, os clamidósporos, que tornam mais difícil o seu controle. É necessário o desenvolvimento de métodos alternativos para o manejo da fusariose na bananeira, uma vez que não existe controle químico para esta doença e o controle genético exige um período de tempo relativamente longo para o desenvolvimento e implementação de variedades resistentes, além de poder apresentar diferentes níveis de resistência ao patógeno. O controle biológico de patógenos habitantes de solo com microrganismos antagonistas, associado a utilização de subprodutos agrícolas como fontes de matéria orgânica, pode viabilizar o plantio de bananeira, em especial das cultivares suscetíveis, como Maça e variedades do subgrupo Prata, as quais tem elevada demanda no mercado. As atividades de micoparasitismo, síntese de compostos antimicrobianos, colonização endofítica e crescimento saprofítico no solo de fungos do gênero *Trichoderma* são características que os tornam potenciais agentes de controle de doenças veiculadas pelo solo, como o mal do Panamá. A incorporação de subprodutos agrícolas como fonte de matéria orgânica ao solo promove a fertilidade e supressividade do solo decorrente de modificações na população microbiana da rizosfera. O presente trabalho teve como objetivo selecionar antagonistas do gênero *Trichoderma* de áreas de produção de banana e integrar a inoculação destes com a incorporação ao solo de subprodutos agrícolas para o controle de Foc.

**Palavras-chave:** *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, controle biológico de fitopatógenos, banana.

## ABSTRACT

MASCARENHAS, M. S. *Trichoderma* sp. and agricultural by-products for control of Panama disease. Cruz das Almas, 2016. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

Banana (*Musa* spp.) Is one of the most consumed fruits in Brazil and worldwide. Banana orchards are established in all regions of Brazil. Among the diseases that occur in this crop, Panama disease caused by the fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) has been pointed out as a highly destructive disease that limits banana's worldwide production. The pathogen can survive in the soil for a few decades with resistant structures, the chlamydospores, which makes its control more difficult. It is necessary to develop alternative methods for the management of banana fusarium wilt, since there is no chemical control for this disease and genetic control requires a relatively long period of time for the development and implementation of the resistant varieties, besides being able to present different levels of resistance to the pathogen. Biological control of soil-borne pathogens with antagonistic microorganisms, associated with the use of agricultural byproducts as sources of organic matter, can make banana planting possible, especially of susceptible cultivars such as Maçã and varieties of the Prata subgroup, with have a high market demand. Activities of mycoparasitism, synthesis of antimicrobial compounds, endophytic colonization, and saprophytic growth in soil of fungi from the genus *Trichoderma* are characteristic that turn them into potential agents for controlling soil-borne diseases such as Panama disease. The incorporation of agricultural byproducts as a source of organic matter in soil promotes soil fertility and disease suppressiveness due to changes in the rhizosphere microbial population. The present work aimed to select antagonists of the genus *Trichoderma* from banana production areas, and to integrate their inoculation with soil incorporation of agricultural by products to control Foc.

**Keywords:** *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, biological control of phytopathogen, banana.

# INTRODUÇÃO

O Brasil possui uma produção de banana de aproximadamente 7,2 milhões de toneladas, sendo esta a segunda fruta mais produzida no país. Os principais estados produtores de banana são: São Paulo, Bahia, Minas Gerais e Santa Catarina (FAO, 2015). Originárias da Ásia (PERRIER et al., 2011), as bananeiras são típicas de regiões tropicais, são cultivadas em mais de 130 países (FAO, 2011) e tem grande importância na alimentação por apresentar nutrientes essenciais (THANGAVELU; MUSTAFFA, 2012).

Contudo, diversas doenças afetam os plantios de bananeira e causam redução na produtividade. Dentre as doenças mais importantes e devastadoras está o mal do Panamá, causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) (E.F. Smith) W.C. Snyder e H.N. Hansen, patógeno habitante de solo (STOVER, 1962), sem estágio sexual conhecido (PLOETZ, 2006). Este fungo pode sobreviver saprofiticamente ou endofiticamente (HENNESSY et al., 2005), além de formar clamidósporos, que são estruturas de resistência e sobrevivência capazes de permanecer no solo por décadas (PLOETZ, 2006). O Foc possui mais dois tipos de esporos, os microconídios e os macroconídios (PLOETZ, 2000).

O patógeno é classificado em quatro raças, as quais são diferenciadas por variedades indicadoras (GROENEWALD et al., 2006). A raça 1 é indicadora das variedades Gros Michel, Prata e Maça e a raça 2 virulenta a Bluggoe (PLOETZ, 2006). A raça 3 de Foc afeta várias espécies de *Heliconia* e não é encontrada em espécies do gênero *Musa* (WAITE, 1963). A raça 4, presente no sudeste asiático, ataca variedades do subgrupo Cavendish e também as variedades suscetíveis as raças 1 e 2. A raça 4 é subdividida em raça 4 tropical, que pode atuar em condições tropicais e subtropicais, e a raça 4 subtropical que pode estar presente em condições de estresses abióticos nos subtrópicos (PLOETZ, 2006; DITA et al., 2010).

A infecção por Foc ocorre pelas raízes, onde ocorre a aderência e penetração das hifas, seguindo para o sistema vascular da planta hospedeira, atingindo e colonizando os feixes vasculares no rizoma da bananeira (LI et al., 2011). Os sintomas externos caracterizam-se pelo amarelecimento progressivo das folhas mais

velhas até as mais novas, seguido de murcha. Posteriormente ocorre a quebra do pecíolo junto ao pseudocaule, dando à planta um aspecto de guarda-chuva fechado (PLOETZ et al., 2015). Internamente os sintomas são apresentados através da descoloração vascular e de pontuações pardo-avermelhadas provocada pela presença do patógeno nos vasos (DITA et al., 2010). Plantas afetadas pelo mal do Panamá geralmente produzem cachos impróprios para comercialização (LI et al., 2013).

Medidas de controle como o uso de variedades resistentes e uso de microrganismos antagonistas, quando empregadas em conjunto podem apresentar boa eficiência (BARBOSA; GONZAGA 2012). Contudo o controle biológico apresenta vantagens em relação aos demais, os microrganismos antagônicos possuem a capacidade de se estabelecer, colonizar e se propagar pelo ambiente (MELLO et al. 2007). As variedades resistentes podem ser consideradas como uma forma de controle temporário (SUTTON, 2000), já que a estrutura genética de uma população pode variar, o patógeno pode se adaptar em resposta a alterações locais, surgindo isolados mais agressivos (MCDONALD; LINDE, 2002). Outro fator limitante é a aceitação do mercado consumidor para essas variedades modificadas geneticamente (VILJOEN, 2002).

Para minimizar ou mesmo deter a ação do patógeno, métodos alternativos podem ser utilizados visando um manejo eficiente e sustentável, com a redução dos danos ao meio ambiente e aos seres humanos. Entre estes, está a utilização de matéria orgânica, que incorporada ao solo pode atuar no controle de patógenos habitantes do solo e trazer uma série de benefícios para a planta. O uso de matéria orgânica pode auxiliar no aumento da fertilidade do solo, indução de resistência sistêmica das plantas, produção de substâncias antagônicas pelo hospedeiro, redução do potencial de inóculo de patógenos, aumento da atividade microbiana, podem desencadear também a supressividade (ELAD et al., 2010; SHAHAT et al., 2011).

Outra alternativa para controle é a utilização de microrganismos antagonistas, espécies do gênero *Trichoderma* vêm sendo bastante estudadas e utilizadas no controle biológico de diversos fungos fitopatogênicos (WOO et al., 2014) por apresentarem diversas formas de ação, tais como parasitismo, antibiose, competição, além de atuarem na promoção de crescimento e indução de resistência das plantas (HARMAN et al. 2004; LOUZADA et al., 2009). Dessa forma, a

combinação entre matérias orgânicas e fungos do gênero *Trichoderma* mostram-se como uma forma viável e promissora no controle de doenças de plantas (ZANGH et al., 2013)

Este trabalho tem o objetivo de selecionar antagonistas do gênero *Trichoderma* provenientes de áreas de produção de banana na Bahia e integrar a inoculação destes isolados com a incorporação ao solo de subprodutos agrícolas como fontes de matéria orgânica, para o controle do Mal do Panamá.

---

## **CAPITULO 1**

*Trichoderma* sp. e subprodutos agrícolas no controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*

---

## A cultura da banana

A bananeira (*Musa* spp.) é uma monocotiledônea herbácea, pertencente a classe Liliopsida, ordem Zingiberales, família Musaceae, subfamília Musoideae, gênero *Musa* e séries *Musa* (*Eumusa* e *Rhadochlamys*) e *Callimusa* (*Callimusa*, *Australimusa* e *Ingentemusa*), o gênero *Musa* contém cerca de 70 espécies (HÄKKINEN, 2013). Originou-se no Sudoeste da Ásia e chegou a América por meio das navegações portuguesas e espanholas no século XV onde encontrou condições favoráveis para o seu desenvolvimento, permanecendo até hoje no continente (MORTON; MACLEOD, 1990; PERRIER et al. 2011).

Tem como principal característica um caule suculento e subterrâneo (rizoma) por onde saem as raízes primárias e apresenta um pseudocaulo (“falso tronco”) composto pela sobreposição das bainhas das folhas e uma cora de folhas (CROUCH, 1999). Do centro da copa sai a inflorescência semelhante a uma espiga protegida por brácteas e em suas axilas nascem as flores. De cada grupo de flores formam-se as pencas que se agrupam em cachos que possuem número variável de frutos (BORGES; SOUZA, 2004). O fruto produzido por bananeiras é resultante de cruzamentos entre duas diferentes espécies diploides, *Musa acuminata* Colla (genoma A) e *Musa balbisiana* Colla (genoma B) (SIMMONDS; SHEPHERD, 1955), cujas combinações resultam em grupos diploides (AA e AB), triploides (AAA, AAB e ABB) e tetraploides (AAAA, AAAB AABB e ABBB) (OLIVEIRA et al., 1999).

A banana é um alimento rico em vitaminas (A, B e C) e minerais (Ca, K e Fe) com baixos teores de gordura (CROUCH, 1999). Atualmente é cultivada em mais de 130 países como cultura perene (THANGAVELU; MUSTAFFA, 2012). No ano de 2013 foram produzidas 144,56 milhões de toneladas de banana no mundo (FAO, 2013), o Brasil é responsável pela produção de cerca de sete milhões de toneladas, ocupando o quinto lugar na produção mundial da cultura (FAO, 2015). A Índia é o maior produtor, seguido de países como China, Filipinas e Equador (FAO, 2015). No Brasil, a região Nordeste e Sudeste apresentam as maiores produções com 40% e 30% respectivamente, sendo a Bahia o estado com a maior produção em área plantada do país (IBGE, 2015).

O cultivo da bananeira por pequenos e grandes produtores gera renda e emprego para famílias brasileiras. As cultivares de banana Prata, Pacovan, Prata

Anã, Maçã, Mysore, Terra e a D'Angola são as preferidas para o consumo interno, no mercado internacional as cultivares do subgrupo Cavendish são as mais apreciadas pelo consumidor (SILVA; BOLIANI; CORRÊA, 2006). Assim como ocorre em outras culturas, a bananeira é afetada por problemas fitossanitários. Microrganismos fitopatogênicos acometem as plantas e as principais doenças fúngicas da bananeira são a Sigatoka-amarela, Sigatoka-negra e mal do Panamá (PLOETZ, 2006).

### **O Mal do Panamá e o fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense***

O mal do Panamá, também conhecido como murcha de *Fusarium* na bananeira ou fusariose é causado pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc). É uma das doenças mais destrutivas da bananeira e está entre as seis doenças economicamente mais importantes de todos os tempos (PLOETZ, 2006). Esta doença levou a grandes perdas socioeconômicas na metade do século passado na América central, sendo também responsável pelo quase desaparecimento da banana 'Maçã' do mercado brasileiro. No Brasil, o mal do Panamá foi observado inicialmente em Piracicaba, São Paulo, em 1930 e, num período de aproximadamente quatro anos, a cultura foi dizimada com a destruição de em torno de um milhão de plantas de bananeira (CORDEIRO, 1995).

O patógeno se estabelece no tecido da planta hospedeira através do sistema radicular, principalmente através das raízes secundárias, por onde consegue atingir o xilema, onde esporula e ocorre o transporte dos conídios em um processo sistêmico, atingindo os tecidos parenquimáticos anexos (KIMATI et al., 2005). Em resposta a infecção cultivares resistentes formam géis, tiloses e gomas no lúmen do xilema, o que ocorre tardiamente em cultivares suscetíveis, o patógeno coloniza o hospedeiro antes mesmo que ele possa responder a infecção. O patógeno obstrui o fluxo de água na planta e o transporte de nutrientes, o que pode explicar a ocorrência da murcha na bananeira (PLOETZ, 2015).

As plantas atacadas pelo Foc apresentam nas partes mais externas do pseudocaule pontuações pardo-avermelhadas, enquanto que as partes mais internas mantem uma coloração clara (KIMATI et al., 2005). Os sintomas externos desta doença são amarelecimento progressivo das folhas mais velhas de bananeira

até as mais novas, devido a ação de fitotoxinas produzidos pelo patógeno, seguida de murcha das folhas, as quais secam e quebram junto ao pseudocaule e, como consequência, ficam inclinadas, o que dá à planta um aspecto de guarda-chuva fechado (PÉREZ-VICENTE; DITA, 2014). Próximo ao solo ocorrem rachaduras do feixe de bainhas, cuja dimensão depende da área afetada no rizoma (CORDEIRO, 1995).

A disseminação da doença pode ocorrer por meio da ação do homem, animais, vento, água da chuva, água utilizada para a irrigação, material de plantio, equipamentos e outros. Grande quantidade de inóculo é produzida a partir de estruturas como rizomas, raízes e pseudocaule de plantas doentes. Outro fator que pode contribuir para a incidência da doença é a condição nutricional nas áreas de cultivo. Em áreas pouco férteis e com baixa disponibilidade de matéria orgânica, a incidência da doença pode aumentar (KIMATI et al., 2005).

O *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* pertence ao Filo Ascomycota, Classe Ascomycetes, Subclasse Sordariomycetes e Ordem Hypocreales (FOURIE et al., 2009). É um fungo de solo, sem estágio sexuado conhecido, capaz de sobreviver no solo por até 30 anos mesmo na ausência do seu hospedeiro, devido à capacidade de produzir estruturas de resistência como os clamisdósporos, produzem também outros dois tipos de esporos assexuados, os micro e macroconídios (PLOETZ, 2006). O gênero é subdividido em *fomae speciales* (f. sp.) e raças, sendo conhecidas mais de 120 f. sp. de *F. oxysporum*, elas são semelhantes morfológicamente, mas são altamente especializadas na infecção do hospedeiro específico (MICHIELSE; REP, 2009).

As raças são definidas com base na capacidade de *Foc* causar doença a cultivares específicos, existem quatro raças de *Foc* (GROENEWALD et al., 2006). A raça 1 infecta as cultivares do grupo Gros Michel e Maçã, a raça 2 é indicadora da cultivar Bluggoe (STOVER; WAITE, 1960) e a raça 4, presente no sudeste asiático, causa doenças nos cultivares do subgrupo Cavendish (Nanica, Nanicão e Gran Naine) (SU et al. 1986). A raça 4 possui dois biótipos, raça tropical 4 que pode atuar em condições tropicais e subtropicais e raça subtropical 4, que pode estar presente sob estresses abióticos nos subtrópicos, ambas afetam também as variedades suscetíveis às raças 1 e 2 (BUDDENHAGEN, 2009). No Brasil há prevalência da

raça 1 de Foc (GOES; MORETTO, 2001). A raça 3 não ocorre em bananeiras e afeta apenas plantas do gênero *Heliconia* (STOVER; WAITE, 1960).

Várias estratégias para o controle do mal do Panamá vêm sendo estudadas: controle químico, controle biológico e uso de genótipos resistentes. O uso de genótipos resistentes apresenta-se como um dos métodos de controle mais eficazes e desejados (JONES, 2000). No entanto, sabe-se que é um método complexo, de custo elevado e que exige anos de avaliação em campo para confirmação dos resultados, além da necessidade de levantamento da diversidade genética do patógeno para um melhor manejo da doença (JAVED et al., 2004) (SILVA et al., 1998; OSEBELE et al., 2006). Os fungicidas químicos não são eficazes. Diante disso, diversos estudos tem abordado métodos alternativos ao químico e genético para controle da doença buscando a redução dos danos e um manejo integrado.

### **Controle biológico**

O controle biológico é utilizado há mais de 120 anos (CARVALHO, 1999) e os fungos foram os primeiros microrganismos a serem utilizados devido à produção de metabólitos secundários (AZEVEDO et al., 2007; PINTO, 2002). O fungo endofítico *Acremonium* sp. foi utilizado em 1967 no Havaí para controle de uma erva daninha, sendo o primeiro exemplo de sucesso no controle biológico de plantas (TRUJILLO, 2005). No Brasil *Metarhizium anisopliae* controlou insetos na cana de açúcar pioneiro aos trabalhos com controle biológico (ATHAYDE et al., 2001). Para o fungo *Moniliophthora perniciosa* agente etiológico da vassoura de bruxa, o *Trichoderma stromaticum* atua como antagonista a este fitopatógeno mostrando-se uma forma eficiente de controle (NETO et al., 2003).

Para Bettiol (1991) define-se como controle biológico o domínio de um microrganismo por meio de outro microrganismo. Em uma definição mais ampla o controle biológico é “a redução da densidade de inóculo ou das atividades determinantes da doença provocada por um patógeno, realizada por ou através de um ou mais organismos que não o homem” (COOK e BAKER, 1983).

Os microrganismos que mais se destacam com elevado potencial para o biocontrole de fitopatógenos são: *Trichoderma* spp., *Glicocadium virens*, *Talaromyces flavus*, *Pythium oligandrum*, *Sporidesmium sclerotivorum*, e

*Ampelomyces quisqualis*, sendo os fungos do gênero *Trichoderma* os mais importantes, pois são eficazes contra diversos fitopatógenos, tais como *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium* spp., *Phytophthora* spp. (MELO, 1998). O sucesso dos antagonistas se deve a alta capacidade reprodutiva, habilidade de sobrevivência em diferentes condições, uso adequado dos nutrientes, promoção de crescimento e indução da resistência de plantas (SIKORA; POCASANGRE, 2008), ciclo de vida curto, habilidade de sobreviver na ausência do hospedeiro por um período e a formação de estruturas de resistência (KENDRICK, 1995).

O Controle biológico é uma alternativa ao uso de insumos químicos e outros meios de controle utilizados em culturas. Os microrganismos antagonistas utilizados no controle biológico tem capacidade de se estabelecer, colonizar e se propagar pelo ambiente, sendo eficientes no controle de patógenos (MELLO et al. 2007). O controle normalmente é feito através do uso de microrganismos que não são prejudiciais à saúde humana. Agentes de controle biológico como alguns fungos do gênero *Trichoderma* vem sendo utilizados como uma alternativa ao uso de pesticidas (BETTIOL; GHINI, 2003; PERAZZOLLI et al., 2008).

Para a fusariose na cultura da banana, o controle químico não é eficiente (NEL et al., 2007) e medidas de controle como o uso de variedades resistentes mostram-se como uma alternativa temporária, já que o patógeno possui capacidade de adaptação a diferentes condições e apresentam grande variabilidade genética, tornando difícil a manutenção da resistência do hospedeiro e possibilitando o surgimento de isolados mais agressivos (SUTTON, 2000).

O controle biológico e cultural vem sendo avaliado com a incorporação ao solo de diferentes fontes de matéria orgânica, e a introdução de microrganismos previamente selecionados como sendo antagonistas ao patógeno e capazes de colonizar e sobreviver no solo e na planta (ZHANG et al., 2013).

*Trichoderma* spp.

Fungos do gênero *Trichoderma* caracterizam-se por apresentar microrganismos de vida livre, são encontrados em diversos ambientes, principalmente em solos de locais com clima tropical e temperado (HARMAN et al.,

2004), pertencem ao filo Ascomycota, subfilo Pezizomycotina, classe Sordariomycetes, subclasse Hypocreomycetidae, ordem Hypocreales, família Hypocreales mitospóricos (ou Família Hypocreacea). Sua reprodução ocorre de forma assexuada e algumas espécies colonizam madeira e apresentam fase sexual teleomorfa (gênero *Hypocrea*) (HARMAN et al., 2004; BROTMAN et al., 2010). São muito utilizados no controle biológico por apresentarem rápido crescimento em diversos substratos, por serem facilmente cultivados e muitas das espécies não causam danos as plantas (PAPAVIZAS et al., 1982), são descritas 254 espécies de *Trichoderma* (BISSET et. al., 2015).

Espécies do gênero *Trichoderma* são muito utilizadas no controle de microrganismos fitopatogênicos e na promoção do crescimento de plantas. Isso devido aos seus diferentes mecanismos de ação, como competição, antibiose, parasitismo, micoparasitismo de estruturas de resistência como clamidósporos, escleródios e outros esporos de fitopatógenos, além da ação como indutor de resistência em plantas contra doenças (MELO, 1998).

A competição é a disputa entre dois ou mais microrganismos, por nutrientes, espaço físico, água, luz, oxigênio, fatores de crescimento, microelementos, entre outros (MELO, 1996). A antibiose ocorre quando o antagonista inibe a ação do fitopatógeno através da liberação de metabólitos voláteis ou não voláteis, tendo um efeito negativo sobre o patógeno (STADNIK; BETTIOL, 2000). São conhecidas enzimas e mais de 40 substâncias com efeito antibiótico produzidos por *Trichoderma* (HARMAN, 2000).

Dentre os metabólitos produzidos estão o harzianolide, a 6-n pentil-2H-piran-2-ona e seu análogo 6-n pentenil-2H-piran-2-ona, ácido harziânico, alameticinas, tricolinas, massoilactona, harzianopiridona, glisopreninas, ácido heptelídico (BENÍTEZ et al. 2004), gliotoxina e gliovirina (HOWELL, 2003), entre outros. Esses podem promover a inibição do crescimento do micélio, desorganização de células, lise de hifas (AHMED, 2003). A antibiose e a competição por alimento são os mecanismos mais utilizados por antagonistas (ROBBS, 1992).

O parasitismo é outro mecanismo que pode ser utilizado pelo gênero *Trichoderma*, nessa relação o parasita obtém todo ou parte do alimento do

hospedeiro, nutrindo-se de suas estruturas vegetativas e/ou reprodutivas. Depois que ocorre o reconhecimento e interação física entre os microrganismos uma série de eventos são desencadeados, resultando em produção de enzimas capazes de degradar a parede celular do hospedeiro e algumas proteínas (DRUZHININA et al., 2011), sendo de grande importância para o controle de patógenos e para a promoção do crescimento de plantas (CARVALHO, 2015).

O micoparasitismo envolve mudanças morfológicas, tais como enrolamento e formação de estruturas chamadas apressórios, que se desenvolvem sobre a superfície da hifa alvo e são utilizadas por *Trichoderma* para penetrar o hospedeiro. Enzimas como quitinases, lipases, proteases, glucanases e alguns antibióticos são produzidos, principalmente nessa região de encontro entre os dois microrganismos, resultando na degradação da parede celular e parasitismo do fungo alvo (HARMAN et al. 2004; MELO, 1996). Antagonistas permitem controlar a densidade de microrganismos patogênicos no solo, além de solubilizar alguns nutrientes essenciais para as plantas (ALTOMARE et al., 1999).

*Trichoderma* também está relacionado a indução de resistência em plantas, o microrganismo antagonista promove alterações no metabolismo da planta hospedeira, modificando-a a ponto de torna-la resistente a determinados fitopatógenos (BETTIOL, 1991). Essas plantas possuem um aumento na sua atividade enzimática, enzimas como quitinases, glucanases e peroxidases, conseguem perceber a presença do patógeno e sinalizações bioquímicas aumentando a resistência das plantas (ROMEIRO, 2007).

São muitos os estudos demonstrando os efeitos benéficos de espécies de *Trichoderma* no controle de patógenos do solo e na promoção de crescimento de plantas. Carvalho et al. (2011) avaliaram o controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* *in vitro* e em sementes e a promoção do crescimento inicial do feijoeiro comum por *Trichoderma harzianum* e selecionaram seis isolados de *Trichoderma harzianum* antagonistas ao *Fusarium*. Esses isolados apresentaram produção de metabólitos voláteis e o isolado CEN239 destacou-se na promoção de crescimento das mudas de feijoeiro.

Silva et al. (2011) observaram que *Trichoderma* spp., e o fungicida Trichodermil promoveram o crescimento das plantas e induziram a resistência a antracnose em pepineiro. Saravanan et al. (2003) demonstraram que combinações de subprodutos de nim, com *P. fluorescens*, *T. harzianum* e *T. viride* proporcionaram a máxima inibição de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense*. Em trabalho realizado por Raman et al. (2016) *T. asperellum* em interação com Foc em plantas suscetíveis de bananeira potencializou as defesas das plantas para a fusariose.

Thangavelu et al. (2004) verificou que *Trichoderma harzianum* multiplicado em folhas secas de bananeira e incorporados ao solo ao redor das plantas proporcionaram uma redução de 49,9% na incidência do mal do Panamá, em relação ao tratamento controle, testes *in vitro* utilizando o mesmo antagonista também mostrou-se eficaz na inibição micelial e crescimento de Foc. Mais estudos são necessários para que produtos à base de *Trichoderma* sejam desenvolvidos e utilizados no controle de doenças em culturas de importância econômica, a exemplo da bananeira.

### **Subprodutos agrícolas**

Desde as primeiras práticas agrícolas pelos seres humanos, os adubos orgânicos são utilizados no intuito de manter ou aumentar a fertilidade do solo, assegurando a produtividade agrícola, através da manutenção ou reposição parcial dos nutrientes retirados do solo (AVNIMELECH, 1986). A combinação entre matéria orgânica e antagonistas no solo é uma prática promissora para o controle de fitopatógenos (ZHANG et al., 2013).

Os resíduos orgânicos se originam de diversas práticas agrícolas e industriais que utilizam vegetais e animais como matéria prima e esses resíduos podem ser utilizados na agricultura como fontes de matéria orgânica e nutrientes para as plantas e ainda ter um papel no controle de doenças de plantas, causando efeito supressivo sobre fitopatógenos de solo (WAKSMAN; STARKEY, 1931; HOITINK; FAHY, 1986).

Medidas como manutenção de níveis elevados de matéria orgânica no solo e manutenção do equilíbrio da adubação, com um pH próximo ao neutro, são eficazes no controle do mal do Panamá, retardando o aparecimento da doença, sendo a

disponibilidade de nutrientes um fator essencial sobre a incidência da fusariose em bananeira (MAIA; SILVA, 2011).

A incorporação de alguns resíduos vegetais ao solo como fontes de matéria orgânica podem proporcionar um aumento na atividade microbiana e, conseqüentemente a população de antagonistas se tornar maior e mais diversificada. Esta prática garante o fornecimento de micro e macronutrientes, os resíduos também são responsáveis pela retenção de água pelas plantas e podem estimular a liberação de substâncias capazes de eliminar ou reduzir estruturas de sobrevivência e resistência, e até mesmo o próprio patógeno. Os resíduos podem induzir a ativação de resistência sistêmica das plantas (BETTIOL et al., 2009).

Em trabalho realizando a incorporação de bagaço do coco babaçu e casca de mandioca ao solo, efeitos positivos no controle da fusariose no maracujazeiro foram apresentados e altas concentrações de fósforo foram encontradas nesses resíduos (FERREIRA et al., 2015). Wong et al. (2011) observou que a utilização de mandioca seguida de solarização, proporcionaram maior controle do *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (WONG et al., 2011). O resíduo da mandioca possui altas concentrações de ácido cianídrico, sendo tóxicos aos microrganismos mesmo em baixas concentrações (LORENZI; DIAS, 1993).

Muitos resíduos orgânicos são de fácil acesso para grandes e pequenos produtores rurais e apresentam eficiência no controle de fitopatógenos, possuem também baixos custos, tornando-se atrativos para uso no desenvolvimento de estratégias de manejo integrado de fitopatógenos, em especial dos patógenos de solo, a exemplo do *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*, que são de difícil controle.

## REFERÊNCIAS

AHMAD, F.M., KHALEQUZZAMAN, K.M., ISLAM, N.M., ANAM, M.K., ISLAM, M.T. Effect of fungicides against *Bipolaris oryzae* of rice under *in vitro* condition. **Journal Plant Pathology**, Pakistan, v.1, n.1, p.4-7, 2002.

AZEVEDO, J. L; ARAÚJO, W. L. Endophytic fungi of tropical plants: Diversity and biotechnological aspects. In: GANGULI, B.N., DESHMUKH, S.K. Fungi multifaceted microbes. **Anamaya Publishers**, New Delhi, Índia, p.189-207, 2007.

ATHAYDE, A. C. L; FERREIRA, U. L; LIMA, E. A. L. A. Fungos entomopatogênicos: uma alternativa para o controle do carrapato bovino - *Boophilus microplus*. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v.21, p.12-15, 2001.

ALTOMARE, C.; NORVWELL, W. A.; BJORKMAN, T.; HARMAN, G. E. Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, n.7, p.2926-2933, 1999.

AVNIMELECH, Y. Organic residues in modern agriculture. In: CHERT, Y.; AVNIMELECH, Y. (Eds.), *The Role of Organic Matter in Modern Agriculture*. **Martinus Nijhoff**, Dordrecht, p.1-10, 1986..

BARBOSA, F. R. & GONZAGA, A. C. O. Informações técnicas para o cultivo do feijoeiro-comum na Região Central-Brasileira: 2012-2014. **Documentos**, 272, Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, p.247, 2012.

BENÍTEZ, T., RINCÓN, A.M., LIMÓN, M.C. & CODÓN, A.C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**, v.7, p.249-260, 2004.

BETTIOL, W. (Ed.), *Controle biológico de doenças de plantas*. **Embrapa Meio Ambiente**, Jaguariúna, p.33-35,1991.

BETTIOL, W.; GHINI, R. Proteção de plantas em sistemas agrícolas alternativos. In: CAMPANHOLA, C.; BETTIOL, W. Métodos Alternativos de Controle Fitossanitário. **Embrapa Meio Ambiente**, Jaguariúna, p.79-95, 2003.

BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas (editores). **Embrapa Meio Ambiente**, Jaguariúna, p.07-14., 2009.

BISSETT, J.; GAMS, W.; JAKLITSCH, W.; SAMUELS, G. J. Accepted *Trichoderma* names in the year 2015. **IMA Fungus**, v.6, n.2, p.263–295, 2015.

BORGES, A. L.; SOUZA, L. da S. (Ed.). *O cultivo da bananeira*. **Embrapa Mandioca e Fruticultura**, Cruz das Almas, p. 132-145, 2004.

BROTMAN, Y.; GUPTA, K.; VITERBO, A. Quick guide – *Trichoderma*. **Magazine Current Biology**, v.9, n.20, p.1-2, 2010.

BUDDENHAGEN I.W. Understanding strain diversity in *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* and history of introduction of tropical race 4 to better manage banana production. **Acta Horticulturae**, v.828, p.193-204, 2009.

CARVALHO, R. S; NASCIMENTO, A. S; MATRANGOLO, W. J. R. Controle de moscas-das-frutas. **A lavoura**, v.102, p.628, 1999.

CARVALHO. D. D. C.; MELLO, S. C. M.; LOBO JÚNIOR, M.; SILVA, M. C. Controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* *in vitro* e em sementes, e promoção de crescimento inicial do feijoeiro comum por *Trichoderma harzianum*. **Tropical Plant Pathology**, v.36, n.1, p.28-34, 2011.

CARVALHO, D. D. C, GERALDINE, A. M, LOBO JUNIOR, M; MELLO, S. C. M. Biological control of white mold by *Trichoderma harzianum* in common bean under field conditions. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.50, p.1220-1224, 2015.

CORDEIRO, Z.J.M, KIMATI, H. Doenças da bananeira. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. (Ed.) Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas. **Agronômica Ceres**. 3<sup>o</sup> ed, v.2, p.112-136,1995.

COOK, R. J.; BAKER, K. F. The nature and practice of biological control of plant pathogens. **American Phytopathological Society**, St. Paul, Minnesota, p.539, 1983.

CROUCH, J. H., CROUCH, H.K., TENKOUANO, A., ORTIZ, R. Based diversity analysis of 2x and 4x full-sib *Musa* hybrids. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.2, p.99-108, 1999.

DITA, M. A.; WAALWIJK, C; BUDDENHAGEN, I. W.; SOUZA JR, M. T.; KEMAG, H. J. A molecular diagnostic for tropical race 4 of the banana *Fusarium* wilt pathogen. **Plant Pathology**, v.59, p.348-357, 2010.

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., KUBICEK, C. P. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. **Nature Reviews**, v.9, p.749-759, 2011.

ELAD Y., DAVID D.R., HAREL Y.M., BORENSHTEIN M., KALIFA H.B., SILBER A., GRABER E.R. Induction of systemic resistance in plants by biochar, a soil-applied carbon sequestering agent. **Phytopathology**, v.100, p.913-921, 2010.

FAO, FOOD AND AGRICULTUR ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Faostat. Disponível em: <http://www.fao.org>. Acesso em 28 maio 2016.

FERREIRA, R. B; RODRIGUES. A. A. C; MORAES, F. H. R; SILVA, E. K. C; NASCIMENTO, I. O. Resíduos orgânicos no controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* em maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). **Acta Biológica Colombiana**, v.20, n.3, p.111-120, 2015.

FOURIE, G. et al. Evolutionary relationships among the *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* vegetative compatibility groups. **Applied and Environmental Microbiology**, v.75, n.14, p.4770-4781, 2009.

GOES, A.; MORETTO, K.C.K. Mal-do-Panamá. In: RUGGIERO, C. (Ed.). **Bananicultura**. Jaboticabal: FUNEP, p.419-435, 2001.

GROENEWALD, S; BERG, N. V. D; MARASAS, W. F. O; VILJOEN, A. The application of high-throughput, AFLPs in assessing genetic diversity in *Fusarium oxysporum* f.sp. *ubense*. **Mycological Research**, v.110, p.297-305, 2006.

HARMAN, G.E. Myths and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. **Plant Disease**, v.84, n.4, p.376–393, 2000.

HARMAN, G.E.; HOWELL, C.R.; VITERBO, A.; CHET, I.; LORITO, M. *Trichoderma* species - opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature**, v.2, p.43–56, 2004.

HÄKKINEN, M. Reappraisal of sectional taxonomy in *Musa* (Musaceae). **Taxon**, v.62, p.809–813, 2013.

HENNESSY, C., WALDUCK, G., DALY, A., PADOVAN, A., 2005. Weed hosts of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* tropical race 4 in northern Australia. **Plant Pathology**, Australia, v.34, n.1, p.115-117.

HOITINK, H. A. J.; FAHY, P. C. Basis for the control of soilborne plant pathogens with compost. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto. 24, 93-114,1986.

HOWELL, C. R. Mechanisms Employed by *Trichoderma* Species in the Biological Control of Plant Diseases: The History and Evolution of Current Concepts. **Plant Disease**, v.87, p.4-10, 2003.

IBGE/CEPAGRO. Levantamento sistemático da produção agrícola. MARÇO/2015. Disponível em: [http://ftp.ibge.gov.br/Producao\\_Agricola/Levantamento\\_Sistemati](http://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistemati)

co\_da\_Producao\_Agricola\_[mensal]/Fasciculo/lspa\_201503.pdf. Acesso em 10 de março de 2016.

JAVED, M.A., CHI, M., OTHMAN, R.Y. Study of resistance of *Musa acuminata* to *Fusarium oxysporum* using RAPD markers. **Biologia Plantarum**, v.48, p.93–99., 2004.

JONES, D. R. History of banana breeding. In: Diseases of Banana, Abaca and Enset. **CAB International**, Wallingford, 2000.

KENDRICK, W. B. Taxonomy of fungi imperfect. **Academic Press**, Toronto, 1995.

KIMATI, H.; AMORIN, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. Manual de fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas. **Agronômica Ceres**, São Paulo, SP, v.2, n.4, p.113-135, 2005.

LI, C; CHEN, S; ZUO, C; SUN, Q; YE, Q; YI, G; HUANG, B., 2011. The use of GFP-transformed isolates to study infection of banana with *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4. **European Journal of Plant Pathology**, v.131, n.2, p.327-340.

LI, C., ZUO, C., DENG, G., KUANG, R., YANG, Q., HU, C., SHENG, O., ZHANG, S., MA, L., WEI, Y., YANG, J., LIU, S., BISWAS, M. K., VILJOEN, A., YIL, G. Contamination of Bananas with Beauvericin and Fusaric Acid Produced by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. **PLOS ONE**, v.8, n.7, p.70-226, 2013.

LORENZI, J.O.; DIAS, C.A.C. Cultura da mandioca. 2ª reimpressão. **Boletim Técnico CATI**, Campinas, v.211, p.41, 1993.

LOUZADA, G.A.S; CARVALHO, D. D. C; MELLO, S.C.M., LOBO JÚNIOR, M.; MARTINS, I., BRAÚNA L.M. Potencial antagônico de *Trichoderma* spp. originários de diferentes ecossistemas contra *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium solani*. **Biota Neotropical**, v.9, n.3, p.145–149, 2009.

MAIA, A. M.; SILVA, C. M. Efeito da adubação no controle do mal-do-panamá (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*) na cultura da banana. **Revista Campo Digital**, v.6, n.1, p.7- 13, 2011.

MCDONALD, B. A., LINDE, C. The population genetics of plant pathogens and breeding strategies for durable resistance. **Euphytica**, v.124, p.163–80, 2002.

MELO, I. S. *Trichoderma* e *Gliocladium* como bioprotetores de plantas. **Revista Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.4, p.261-295, 1996.

MELO, I. S. de; AZEVEDO, J. L. (Eds.). Ecologia Microbiana, **Embrapa Meio Ambiente**, Jaguariúna, p.327-343, 1998.

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.

MICHIELSE, C. B; REP, M. Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. **Molecular Plant Pathology**, p.10, 2009.

MORTON, I. D.; MACLEOD, A. J. Food. **Elsevier Science Publishers**, Amsterdam, 1990.

NEL, B., STEINBERG, C., LABUSCHAGNE, N., VILJOEN, A., 2007. Evaluation of fungicides and sterilants for potential application in the management of Fusarial wilt of banana. **Crop Protection**. 26, 697–705.

OLIVEIRA, S. O. de; ALVES, E. J.; SHEPHERD, K.; DANTAS, J. L. L. Cultivares. In: ALVES, E. J. (Org.) A cultura da banana: aspectos técnicos, socioeconômicos e agroindustriais. Embrapa, Cruz das Almas: **Embrapa-CNPMP**. 85-105, 1999.

OSEBELE, H. O.; TENKOUANO, A.; PILLAY, M. Ploidy variation of *Musa* hybrids form crosses. **African Journal of Biotechnology**, v.5, p.1048-1053, 2006.

PAPAVIZAS G. C., LEWIS J. A.; ABD-EL MOITY T. H. Evaluation of new biotypes of *Trichoderma harzianum* for tolerance to benomyl and enhanced biocontrol capabilities. **Phytopathology**, v.72, p.126-132, 1982.

PERAZZOLLI, M.; DAGOSTIN, S.; FERRARI, A.; ELAD, Y.; PERTOT, I. Induction of systemic resistance against *Plasmopara viticola* in grapevine by *Trichoderma harzianum* T39 and benzothiadizole. **Biological Control**, v.47, p.228-234, 2008.

PÉREZ-VICENTE, L., DITA, M. A. (Eds.), Technical Manual Prevention and diagnostic of Fusarium Wilt (Panama disease) of banana caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Tropical Race 4 (TR4). **FAO - Food and Agriculture of the United Nations**, p.6-30, 2014.

PERRIER, X., DE LANGHE, E., DONOHUE, M., LENTFER, C., VRYDAGHS, L., BAKRY, F., CARREEL, F., HIPPOLYTE, I., HORRY, J.-P., JENNY, C., LEBOT, V., RISTERUCCI, A.M., TOMEKPE, K., DOUTRELEPONT, H., BALL, T., MANWARING, J., DE MARET, P., DENHAM, T. Multidisciplinary perspectives on banana (*Musa* spp.) domestication. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.108, p.11311-11318., 2011.

PINTO, A. C; SILVA, D. H. S; BOLZANI, U. L; LOPES, N. P; EPIFÂNIO, R. A. Produtos naturais: Atualidade, desafio e perspectivas. **Química Nova**, v.24, p.45., 2002.

PLOETZ, R.C., PEGG, K.G. Fusarium wilt. In: JONES, D.R. (Ed.), Diseases of Banana, Abaca and Enset. **CABI Publishing**, Wallingford, UK, p.143-159, 2000.

PLOETZ, R.C. Fusarium wilt of banana is caused by several pathogens referred to as *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. **Phytopathology**, v.96, p.653-656, 2006.

PLOETZ, R.C., EVANS, E.A. Banana diseases and the future of the industry. **Horticultural Reviews**. (in press), 2015.

RAMAN, T.; GOPALAKRISHNAN, V.; PERUMAL, G. D. Identification of differentially expressed genes from *Fusarium oxysporum* f. sp *ubense* and *Trichoderma asperellum* (prr2) interaction in the susceptible banana cultivar Grand Naine. **Turkish Journal of Botany**, Índia, v.40, p.480-487, 2016.

ROBBS, F. C. Controle Biológico de doenças em plantas. In: NETO, A. M. A.; BARAN, C. L. **Manual de Controle Biológico**, Rio de Janeiro: Lidador, p.46-51, 1992.

ROMEIRO, R. S. Controle biológico de doenças de plantas: procedimentos. In: Biocontrole de doenças de plantas: Uso e perspectivas. **Embrapa Meio Ambiente**, Jaguariúna, p.172, 2007.

SARAVANAN, T., MUTHUSAMY, M., MARIMUTHU, T. Development of integrated approach to manage the fusarium wilt of banana. **Crop Protection**, v.22, p.1117-1123., 2003.

SHAHAT, A., BRAHIM, A. Y., HENDAWY, S. F., OMER, E. A., HAMMOUDA, F. M., ABDEL-RAHMAN, F. H., SALEH, M. A. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of essential oils from organically cultivated fennel cultivars. **Molecules**, v.16, n.2, p.1366- 1377, 2011.

SIKORA, R. A., POCASANGRE, L., FELDE, A. Z., NIERE, B., VU, T. T., DABABAT, A. Mutualistic endophytic fungi and in-plant suppressiveness to plant parasitic nematodes. **Biological Control**, v.46, n.1, p.15-23, 2008.

SILVA, S. D. E.; MATOS, A. P.; ALVES, E. J. Genetic improvement of banana tree. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.33, p.693-703, 1998.

SILVA, S. de O., BOLIANI, A. C., CORRÊA, L. S. Avaliação de cultivares de bananeira (*Musa* spp.) na Região de Selvíria-MS. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.28, n.1, p.101-103, 2006.

SILVA, V.N. da; GUZZO, S. P.; LUCON, C. M. M.; HARAKAVA, R. Promoção de crescimento e indução de resistência a antracnose por *Trichoderma* spp. em pepineiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.46, n.12, p.1609-1618, 2011.

SIMMONDS, N. W.; SHEPHERD, K. Taxonomy and origins of cultivated bananas. **Journal of the Linnean Society Botany**, London, v.55, p.302-312, 1955.

STOVER, R.H.; WAITE, B.H. Studies on fusarium wilt of bananas. VI Variability and the cultivar concept in *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. **Canadian Journal of Botany**, v.38, p.985-994, 1960.

STOVER R.H. Fusarium wilt (Panama disease) of bananas and other *Musa* species. **Phytopathological Papers**, n.4, p.117, 1962.

SU, H. J., HWANG, S. C., KO, W. H. Fusarium wilt of Cavendish bananas in Taiwan. **Plant Disease**, Taiwan, v.70, p.814-818, 1986.

SUTTON, J. Strategies for biological control of necrotrophic pathogens in perennial crops. **Fitopatologia Brasileira**, v.25, p.235-238, 2000.

THANGAVELU, R.; MUSTAFFA, M. Current advances in the Fusarium wilt disease management in banana with emphasis on biological control. **Plant Pathology**, p.273-298, 2012.

TRUJILLO, E. E. History and success of plant pathogens for biological control of introduced weeds in Hawaii. **Biological Control**, v.33, p.113-112, 2005.

VILJOEN, A. The status of Fusarium wilt (Panama disease) of banana in South Africa: review article. **South African Journal of Science**, v.98, n.7 e 8, p.341-344, 2002.

WAITE, B. H. Wilt of *Heliconia* spp. caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 3. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiás, v.40, p.299-305, 1963.

WAKSMAN S.A., STARKEY R.L. The soil and the microbe. **Soil Science**, v.32, p.406, 1931.

WONG, L. C; AMBRÓSIO, M. M. Q; SOUZA, N. L. Sobrevivência de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Raça 2 submetido a técnica da solarização associada à incorporação de folhas de mandioca. **Summa Phytopathologica**, v.37, n.2, p.129-133, 2011.

WOO, S.L., RUOCCO, M., VINALE, F., NIGRO, M., MARRA, R., LOMBARDI, N., PASCALE, A., LANZUISE, S., MANGANIELLO, G., LORITO, M. *Trichoderma*-based products and their widespread use in agriculture. **Open Mycology Journal**, v.8, p.71–126, 2014.

ZHANG, F.; ZHU, Z.; YANG, X.; RAN, W.; SHEN, Q. *Trichoderma harzianum* T-E5 significantly affects cucumber root exudates and fungal community in the cucumber rhizosphere. **Applied Soil Ecology**, v.72, p.41-48., 2013.

---

## **CAPITULO 2**

*Trichoderma* sp. e subprodutos agrícolas no controle do mal do  
**Panamá**

---

Artigo a ser submetido à revista Crop Protection

## RESUMO

MASCARENHAS, M. S. *Trichoderma* sp. e subprodutos agrícolas no controle do mal do Panamá. Cruz das Almas, 2016. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

O mal do Panamá é uma das principais doenças na cultura da banana a nível mundial, resultando em grandes perdas de produção e de área plantada. A incorporação de subprodutos agrícolas como fonte de matéria orgânica ao solo e de microrganismos com ação antagonista ao *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* são apontadas como estratégias para o manejo desta doença. Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de dois subprodutos agrícolas (raspa das cascas de mandioca e tegumento da amêndoa do cacau) e diferentes isolados de *Trichoderma* sp. incorporados ao solo e sua influência na sobrevivência de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc), no controle do mal do Panamá e no desenvolvimento da bananeira. Os experimentos foram conduzidos em laboratório para a seleção *in vitro* dos melhores isolados de *Trichoderma* sp. e em casa de vegetação para os testes com mudas de bananeira, em delineamento inteiramente casualizado, esquema fatorial 6 x 3 x 10 + 1, sendo seis isolados de *Trichoderma* sp., duas fontes de matéria orgânica e sem matéria orgânica, 10 repetições e o tratamento controle somente com Foc, sem nenhuma inoculação nem adição de matéria orgânica. Também foi realizado um segundo experimento em casa de vegetação, com delineamento em esquema fatorial 2 x 3 x 10, com duas condições de inoculação (com e sem Foc), duas fontes de matéria orgânica e 10 repetições por tratamento. Os isolados TSC 85, TSC 87, TSC 101 e TSC 103 de *Trichoderma asperellum* apresentaram potencial para o controle *in vitro* de Foc. *T. asperellum* (isolado TCS 87) de forma isolada ou combinada com o subproduto de película da amêndoa do cacau foi eficiente no controle do mal do Panamá em mudas de bananeira. *T. asperellum* (isolados TCS 85, TCS 87, TCS 101 e TCS 103) e *T. harzianum* (TCS 29) foram efetivos no controle da doença e na promoção de crescimento das plantas, quando combinados com o subproduto do cacau.

**Palavras-chave:** Bananeira, controle biológico, fusariose

## ABSTRACT

MASCARENHAS, M. S. *Trichoderma* sp. and agricultural by-products in the control of Panama's disease. Cruz das Almas, 2016. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

Panama's disease is one of the major diseases in banana plantations worldwide; resulting in large losses in yields and planted areas. The incorporation of agricultural byproducts as sources of soil organic matter, and of microorganisms with antagonistic action to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* are indicated as strategies for the management of this disease. The aim of this work was to evaluate the effect of two agricultural byproducts (cassava peels and cocoa seed tegument residue) and different isolates of *Trichoderma* sp. incorporated into the soil and its influence on survival of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc), control of Panama disease, and development of banana plants. The experiments were conducted in laboratory conditions for in vitro selection of the best *Trichoderma* sp. isolates, and in greenhouse for the testes with banana plants, in a completely randomized design, factorial scheme 6 x 3 x 10 + 1, six isolates of *Trichoderma* sp., Two sources of organic matter and without organic matter, 10 replications and the control treatment with Foc, without any inoculation nor the addition of organic matter. In addition, a second experiment was carried out in the greenhouse, in a factorial scheme 2 x 3 x 10, with two inoculation conditions (with and without Foc), two sources of organic matter and 10 replicates per treatment. The isolates TSC 85, TSC 87, TSC 101 and TSC 103 of *Trichoderma asperellum* presented potential for *in vitro* control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *T. asperellum* (isolated TCS 87) independently or in combination with the by-product of cocoa seed tegument was effective in controlling Panama disease in banana plants. *T. asperellum* (TCS 85, TCS 87, TCS 101 and TCS 103) and *T. harzianum* (TCS 29) were effective in controlling the disease and in promoting plant growth when combined with the cocoa byproduct.

**Keywords:** Banana plants, biological control, fusariosis

## INTRODUÇÃO

A banana (*Musa* sp.) é a fruta mais cultivada em todo o mundo e também lidera a produção no Brasil, chegando a 7,2 milhões de toneladas em 2015 (FAO, 2015). Esta cultura apresenta diversos problemas fitossanitários, resultando em significativas perdas econômicas em todo o mundo. O mal do Panamá, também conhecido como fusariose da bananeira ou murcha de *Fusarium* em bananeira está entre os principais problemas fitossanitários (PLOETZ, 2006).

O mal do Panamá é causado pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) Snyder & Hansen, patógeno habitante do solo capaz de sobreviver saprofiticamente na matéria orgânica, restos de cultura e também na forma de estruturas de resistência, os clamidósporos, que podem permanecer viáveis no ambiente por muitos anos (PLOETZ, 2006).

As hifas do patógeno se aderem às raízes e dão início ao processo de penetração, que pode ocorrer diretamente pelas células epidérmicas ou por ferimentos naturais presentes nas plantas (LI et al., 2011). Após esse processo, o patógeno movimentando-se pelos vasos do xilema, colonizando o rizoma da planta hospedeira, que torna-se marrom-avermelhado, ocorrendo o bloqueio dos vasos que impede o transporte de água e nutrientes. Externamente ocorre o amarelecimento progressiva das folhas, desde as mais velhas até as folhas mais novas seguido de murcha e quebra do pecíolo junto ao pseudocaule (PLEOTZ, 2015).

São conhecidas três raças do patógeno em espécies do gênero *Musa*, raça 1, raça 2 e raça 4. As variedades Gross Michel, Prata e Maçã são indicadoras da raça 1, a Bluggoe da raça 2 (PLOETZ, 2006) e as variedades do subgrupo Cavendish são indicadoras da raça 4, a qual possui dois biótipos: raça tropical 4 e raça subtropical 4 que também afeta as variedades suscetíveis às raças 1 e 2 (THANGAVELU; MUSTAFFA, 2010). No Brasil há prevalência da raça 1 de Foc (DIAS; ABREU; RESENDE, 2014).

O controle químico não é eficiente para esta doença (NEL et al., 2007) em que as estruturas de resistência do fungo podem permanecer viáveis no solo por décadas (PLOETZ, 2006) e alternativas vem sendo estudadas para o controle do mal do Panamá. O controle biológico e cultural vem sendo avaliados com a incorporação ao solo de diferentes fontes de matéria orgânica, e a introdução de microrganismos previamente selecionados como sendo antagonistas ao patógeno e capazes de colonizar e sobreviver no solo e na planta (ZHANG et al., 2013)

A matéria orgânica pode contribuir com a disponibilidade de nutrientes para as plantas, o estímulo à atividade microbiana do solo e inibir a ação de fitopatógenos, por meio da liberação de substâncias com efeito antagônico causando a redução do potencial inicial de inóculo, de infecção e de disseminação do patógeno, podem também promover a supressividade do solo e resistência das plantas as doenças (ELAD et al., 2010; SHAHAT et al., 2011).

Muitas espécies de bactérias, fungos filamentosos e leveduras são estudadas no biocontrole de doenças, mas o gênero *Trichoderma* é reconhecidamente o hiperparasita mais estudado e utilizado como agente de biocontrole (WOO, 2014). Fungos do gênero *Trichoderma* possuem o potencial para o controle de fitopatógenos por apresentarem um amplo espectro de ação, podem atuar na solubilização de nutrientes para as plantas, indução de resistência, promoção de crescimento, competição, antibiose, micoparasitismo, entre outros (HARMAN, 2000).

Levando-se em consideração os subprodutos do processamento da mandioca e do cacau no estado da Bahia, a exemplo da epiderme e córtex de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) das casas de farinha e a película da amêndoa de cacau (*Theobroma cacao* L.) das indústrias de cacau, e o potencial destes na fertilidade do solo e no crescimento e sobrevivência de microrganismos benéficos as plantas, este trabalho teve como objetivo, avaliar o efeito da incorporação destes subprodutos agrícolas no solo e a inoculação com fungos do gênero *Trichoderma* sp. como alternativa para o manejo da fusariose na bananeira.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Culturas

Foram avaliados 24 isolados de *Trichoderma* sp. provenientes de raízes de bananeira e solos de áreas de produção de banana do município de Bom Jesus da Lapa, Bahia, Brasil (13° 15' 18" S e 43° 25' 05" W). Como patógeno foi utilizado o *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* (isolado 0801), raça 1, proveniente da coleção do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, Bahia.

### Efeito antagônico de *Trichoderma* sp. sobre o desenvolvimento micelial de Foc

Testes utilizando o método de cultura pareada descrito por Dennis e Webster (1971) foram feitos em placas de Petri contendo meio de cultura batata dextrose ágar (BDA) com os isolados de *Trichoderma* sp. e o isolado de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* (Foc). Após sete dias de crescimento das colônias a temperatura de  $25 \pm 1$  °C, discos de 0,5 cm retirados das bordas da colônia de Foc foram transferidos para meio BDA em placas de Petri, sendo colocado um disco por placa, a 1 cm da borda da placa. Após incubação do Foc por 48h, o mesmo procedimento foi realizado com a cultura dos isolados de *Trichoderma* spp. no lado oposto ao disco de Foc, à mesma distância da borda da placa. Os tratamentos foram compostos pelo isolado de Foc x 24 isolados de *Trichoderma* spp. e cada ensaio de pareamento foi feito com cinco repetições, incluindo o controle formado pelo disco da cultura do patógeno na placa com meio BDA. Após incubação dos ensaios por cinco dias a temperatura de  $25 \pm 1$  °C foram medidos os diâmetros das colônias de Foc. Fez-se a avaliação do crescimento micelial dos isolados de *Trichoderma* spp. com a escala descrita por Bell et al., (1982). De acordo com essa escala o isolado de *Trichoderma* com nota menor ou igual a 3,0 é considerado como antagônico ao Foc (Tabela 1).

**Tabela 1.** Escala de notas para avaliação do crescimento micelial de *Trichoderma* spp. e sua ação antagônica a patógenos (BELL et al., 1982).

<b>Notas</b>	<b>Característica do crescimento micelial de <i>Trichoderma</i> spp.</b>
1	Crescimento de <i>Trichoderma</i> spp. sobre o patógeno, ocupando toda superfície do meio;
2	Crescimento de <i>Trichoderma</i> spp. sobre toda a placa, mas não se sobrepõe ao disco do patógeno;
3	Crescimento de <i>Trichoderma</i> spp. ocupando mais de 3/4 da superfície do meio;
4	Crescimento de <i>Trichoderma</i> spp. ocupando 2/3 da superfície do meio;
5	Crescimento de <i>Trichoderma</i> spp. ocupando aproximadamente metade da superfície do meio;
6	Crescimento do patógeno ocupando 2/3 da superfície do meio;
7	Ausência de crescimento de <i>Trichoderma</i> spp. patógeno ocupando toda a superfície do meio.

### **Compostos voláteis e não-voláteis sobre o crescimento micelial de Foc**

Foi verificada a produção de compostos voláteis pela metodologia proposta por Dick e Hutchinson (1966). Em meio BDA, colocou-se um disco de micélio do isolado de *Trichoderma*. A tampa dessa placa de Petri foi substituída pela base de outra placa com meio BDA com um disco de micélio da cultura de Foc. As duas bases da placa foram seladas com parafilme e o ensaio incubado em BOD a  $25 \pm 1$  °C, por sete dias. O tratamento controle foi constituído pelas duas bases da placa com meio BDA sem o disco de micélio do antagonista, contendo apenas o disco de micélio de Foc em uma das bases da placa com BDA. O experimento foi em delineamento inteiramente casualizado com 24 isolados de *Trichoderma* x Foc, com cinco repetições. A avaliação da produção de compostos voláteis foi feita pelas medições dos diâmetros médios das colônias de Foc. Foi calculada a área abaixo da curva do crescimento micelial (AACCM) utilizando-se a equação:

$$AACCM = \frac{\sum yi + (yi + 1)}{2d_{ti}}$$

Na qual:  $y_i$  e  $y_{i+1}$  são os valores de crescimento da colônia observados em duas avaliações consecutivas e  $d_{ti}$  é o intervalo entre as avaliações.

Foi realizado também o cálculo da porcentagem de inibição do crescimento micelial (ICM) através da equação descrita por Abbott (1925):

$$ICM(\%) = [(T - t)/T] \times 100$$

Na qual, T é a testemunha e t o tratamento.

Avaliou-se também a presença de compostos não voláteis a partir da incorporação de filtrados das 24 culturas de *Trichoderma* ao meio conforme descrito por Mello et al. (2007). Cinco discos (5 mm) contendo micélio de *Trichoderma* spp. foram transferidos para frascos de Erlenmeyer com capacidade para 500 mL contendo 250 mL de meio BD (batata-dextrose) e estes foram incubados por cinco dias sob agitação orbital (Lab line Instruments, Inc., modelo 60160) a 250 rpm e  $25 \pm 1$  °C em ausência de luz. Posteriormente, as culturas foram filtradas sob vácuo e funil com filtro Millipore com porosidade de 0,47µm e, para cada isolado de *Trichoderma*, 5 mL do filtrado foram adicionados a 15 mL de meio BDA, na temperatura próxima a solidificação, após esterilização em autoclave. Discos de 5 mm com o crescimento micelial do patógeno foram transferidos para o centro das placas de Petri com o meio de cultura (meios BDA com os filtrados das culturas de *Trichoderma*), colocando-se um disco por placa de Petri. Como controle foram adicionados 5 mL de água destilada esterilizada ao BDA fundente. O ensaio foi incubado em incubadora tipo BOD a  $25 \pm 1$  °C e fotoperíodo de 12 h, até a colônia do patógeno no tratamento controle atingir as bordas da placa, período em que foram realizadas as medições dos diâmetros das colônias do patógeno. Os valores obtidos dessas medições foram convertidos em porcentagem de inibição do crescimento micelial (ICM) de Foc e a AACCM também foi calculada.

### **Obtenção e preparo de subprodutos agrícolas**

A epiderme e córtex da mandioca (subproduto do descascamento da mandioca) e a película da amêndoa de cacau foram obtidas de pequenos produtores rurais da cidade de Cruz das Almas e Ilhéus, Bahia, respectivamente. Estes subprodutos foram secos em estufa de ventilação forçada a 45°C e moídos em moinho tipo Wiley.

### **Avaliação *in vitro* do controle de *Trichoderma* spp. sobre Foc, em substratos.**

Foram avaliados dois substratos: a) areia + subproduto da mandioca (SM) e b) areia + película de amêndoa cacau (PAC) na ação antagonista, *in vitro*, de 10 isolados de *Trichoderma* spp. sobre o patógeno. O experimento foi montado em tubos de ensaio de 25 cm de altura e 3 cm de diâmetro, com aberturas em ambas as extremidades, com a adição de 140 g de substrato por tubo, correspondendo ao volume de 134,30 cm<sup>3</sup>. Os tubos foram fechados nas extremidades com algodão e esterilizados em autoclave por 30 min a 121°C. Dois dias após a esterilização foi adicionado um disco de micélio do patógeno (Foc) em uma das extremidades dos tubos os quais foram incubados em BOD a 25 ± 1°C por cinco dias para crescimento do Foc que é mais lento que o crescimento do *Trichoderma*. Posteriormente foi adicionado um disco de micélio do isolado de *Trichoderma* na outra extremidade de cada tubo e estes foram incubados em incubadora tipo BOD a 25 ± 1°C. O crescimento micelial do patógeno e do antagonista ao longo do substrato (cm<sup>3</sup>) disposto nos tubos foi avaliado por três dias e a porcentagem de inibição do crescimento do fungo (IC) foi calculada com a seguinte equação:

$$IC (\%) = \frac{(VCT - VCTC) * 100}{VTS}$$

Sendo:

VCT = volume de crescimento de *Trichoderma*

VCTC = Volume de crescimento de Foc no tratamento controle (areia + Foc)

VTS = Volume total do solo no tubo de vidro

### **Caracterização morfológica dos isolados de *Trichoderma* spp. com ação antagonista sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*.**

Os isolados de *Trichoderma* spp. selecionados para o controle do mal do Panamá foram descritos morfológicamente por meio de observações macroscópicas da colônia com crescimento micelial em meio BDA a 25 °C e 12 horas de fotoperíodo. Após 72 horas de incubação, as placas contendo as culturas fúngicas foram avaliadas com relação ao diâmetro do raio das colônias, textura, coloração, formação de conídios, alteração da coloração do meio de cultivo como indicativo da produção de metabólitos, presença e ausência de odores característicos. As características morfológicas foram observadas em microscópio de luz (Leica®)

DM750) e comparadas com as chaves de identificação online disponíveis em *Systematic Mycology and Microbiology Laboratory* e um atlas amplamente ilustrado com a descrição das 27 espécies atualmente reconhecidas como válidas de *Trichoderma* spp. (SAMUELS et al., 2014).

### **Identificação molecular dos isolados de *Trichoderma* spp.**

Foi realizada a extração de DNA dos isolados de *Trichoderma* spp. com o kit UltraClean<sup>®</sup> Microbial DNA Isolation (MoBio, USA), seguindo as recomendações do fabricante. A integridade e a quantidade do DNA foram verificados usando eletroforese em gel de agarose a 0,8 % e o Qubit<sup>®</sup> 2.0 Fluorometer (Invitrogen), respectivamente.

Para as amplificações das regiões espaçadoras transcritas ITS1 5.8S e ITS2 foram utilizados os *primers* ITS 1 e ITS 4 (WHITE et al., 1990) e os seguintes reagentes e concentrações: 60 ng de DNA de cada amostra; 1x de tampão da enzima Taq DNA polimerase; 3,7 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,6 pmol/μL de dNTPs; 0,4 pmol/μL de cada primer; 5 U de Taq DNA polimerase, com volume final ajustado para 50 μL com água ultra pura. Os ciclos de amplificações foram realizados no Veriti Thermal Cycler PCR (Applied Biosystems) sob as seguintes condições térmicas: 94 °C por 4 minutos, 39 ciclos (94 °C por 1 minuto, 56 °C por 1 minuto e 72 °C por 1 minuto), 72 °C por 10 minutos finalizando com o resfriamento a 8 °C. Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose a 1%, corados com brometo de etídio e visualizados sobre luz ultravioleta. Em seguida, os amplicons foram purificados utilizando o kit Illustra<sup>®</sup> GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare Life Sciences) para posterior identificação nucleotídica utilizando o sequenciador automático *ABI-Prism 3500 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems) da empresa ACTGene Análises Moleculares LTDA. A edição e montagem das sequências foi realizada com o programa Sequencher 4.1.4 (Gene Code Corporation). As sequências foram submetidas aos programas TrichoBLAST e TrichoKEY, disponíveis em *International Subcommittee on Trichoderma and Hypocrea Taxonomy* que permitem a identificação molecular de fungos do gênero *Trichoderma*, por comparação com sequências de espécies “vouchers” (DRUZHININA et al., 2005; KOPCHINSKIY et al., 2005; NAGY et al., 2007).

### **Preparo do inóculo e suspensão de Foc**

O isolado Foc 0801 foi multiplicado em meio de cultura de batata-dextrose-agar (BDA) e incubado a temperatura de  $25 \pm 1$  °C durante sete dias. Após esse período foram retirados das bordas das colônias quatro discos de micélio com 5 mm, os quais foram transferidos para frascos de Erlenmeyer com capacidade para 250 mL contendo o substrato de crescimento esterilizado (100 g de meio de cultivo areia + flocos de milho na proporção 2:1) e 40 mL de água destilada. Este substrato com estruturas do patógeno (Foc) foi incubado a  $25 \pm 1$ °C durante 20 dias. Posteriormente foi quantificada a densidade de inóculo e a suspensão foi ajustada para a concentração de  $10^6$  conídios por  $\text{mL}^{-1}$ .

### **Preparo do inóculo e suspensão de *Trichoderma* sp.**

A partir dos resultados *in vitro* foram selecionados os isolados *Trichoderma* sp. codificados como TCS 85, TCS 87, TCS 97, TCS 101 e TCS 103, com ação antagônica contra o Foc 0801. O isolado de *Trichoderma* sp. TCS29 foi também selecionado por já ter sido selecionado como potencial agente de biocontrole de Foc (Souza, 2016).

Os isolados de *Trichoderma* spp. foram multiplicados em meio de cultura BDA e incubados a temperatura de  $25 \pm 1$  °C durante sete dias. Após esse período, a concentração de esporos foi ajustada para  $10^8$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ .

### **Controle do mal do Panamá com isolados de *Trichoderma* sp.:**

#### **Ensaio em casa de vegetação**

As mudas de bananeira da cultivar Prata Anã foram produzidas pela técnica de cultura de tecidos *in vitro* na Empresa de Biotecnologia Vegetal Campo, localizada nas dependências da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA. As mudas foram aclimatadas por quatro semanas em estufa agrícola. Após a fase de aclimação e ainda nas bandejas (2,7 X 2,7 X 4,4 cm) tipo tubete com substrato de fibra de coco, foram inoculadas com a suspensão dos isolados de *Trichoderma* sp., colocando-se no substrato, com uma micropipeta automática, 10 mL da suspensão com  $10^8$  conídios  $\text{mL}^{-1}$  para o conjunto de 10 mudas de cada tratamento.

O solo em sacos plásticos de muda, com 2 kg de solo esterilizado por saco, foi infestado superficialmente com a suspensão de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (preparo e concentração descritos acima), colocando-se 10 mL da suspensão de Foc na concentração de  $10^6$  conídios mL<sup>-1</sup> no solo. Após três dias da aplicação de inóculo de Foc e 15 dias da aplicação do *Trichoderma* sp. fez-se o transplantio das mudas para os sacos com o solo infestado. Após o transplantio fez-se novamente a inoculação de *Trichoderma* sp., colocando-se 10 mL de suspensão ( $10^8$  conídios mL<sup>-1</sup>) no solo próximo as raízes da planta, e fez-se a aplicação dos subprodutos agrícolas ao solo, colocando-se 15 g do material (subproduto do descascamento da mandioca ou película da amêndoa de cacau) a aproximadamente 5 cm abaixo da superfície do solo. O controle positivo foi composto por solo esterilizado e infestado com a suspensão do patógeno na concentração de  $10^6$  conídios mL<sup>-1</sup>. As plantas foram cultivadas em casa de vegetação na área experimental do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas (CCAAB), no campus de Cruz das Almas da UFRB e foram coletadas aos 60 dias após a inoculação dos *Trichoderma* sp.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com seis isolados de *Trichoderma* sp., duas fontes de matéria orgânica e o tratamento controle, contendo apenas o patógeno, com 10 repetições por tratamento (Tabela 2).

**Tabela 2.** Tratamentos com diferentes isolados de *Trichoderma* sp. e fontes de matéria orgânica em solo infestado com Foc. Controle positivo - inoculado apenas com o patógeno. (SM - solo + subproduto da mandioca; PAC - solo + película da amêndoa de cacau).

Tratamentos	<i>Trichoderma</i> spp.	M.O.
T1	TCS29	-
T2	TCS85	-
T3	TCS87	-
T4	TCS97	-
T5	TCS101	-
T6	TCS103	-
T7	TCS29	SM
T8	TCS85	SM
T9	TCS87	SM
T10	TCS97	SM
T11	TCS101	SM
T12	TCS103	SM
T13	TCS29	PAC
T14	TCS85	PAC
T15	TCS87	PAC
T16	TCS97	PAC
T17	TCS101	PAC
T18	TCS103	PAC
T19 (C+)	-	-

Sessenta dias após inoculação dos isolados de *Trichoderma* sp. foi avaliada a severidade da doença com base na escala de notas para o mal do Panamá (Tabela 3) e as notas foram transformadas em índice de doença (ID) aplicando a equação proposta por McKinney (1923):

$$ID (\%) = \Sigma \left[ \frac{(f \cdot v)}{(n \cdot x)} \times 100 \right]$$

Na qual:

ID = índice de doença;

f = frequência de determinada nota;

v = grau de infecção (nota);

n = número total de folhas avaliadas;

x= grau máximo de infecção (nota máxima).

**Tabela 3.** Escala de notas para avaliação de severidade do mal do Panamá em bananeira adaptada de CORDEIRO e DANTAS (1993).

0	1	2	3	4	6
Tecido vascular completamente claro, sem descoloração vascular	Pontos isolados de descoloração no tecido vascular	Descoloração em 1/3 do tecido vascular	Descoloração entre 1/3 e 2/3 do tecido vascular	Descoloração maior que 2/3 do tecido vascular	Descoloração total do tecido vascular

Para a avaliação da produção de matéria fresca e seca, as plantas foram coletadas, separadas em raiz e parte aérea e lavadas com água destilada. O peso da matéria fresca das raízes (MFR) e matéria fresca da parte aérea (MFA) foi obtido por passagem em balança analítica e a matéria seca das raízes (MSR) e da parte aérea (MSA) foram obtidas após secagem do material em estufa de ventilação forçada a 45 °C por 72 horas.

O IQD - índice de qualidade de Dickson, (1960) foi determinado em função da altura (H), diâmetro ao nível do colo (DC), MSA e MSR aplicando a equação:

$$IQD = \frac{MST}{\frac{H}{DC} + \frac{MAS}{MSR}}$$

### **Controle do mal do Panamá com subprodutos agrícolas:**

#### **Ensaio em casa de vegetação**

Foram utilizados os mesmos métodos e avaliações do item anterior, contudo isolados de *Trichoderma* sp. não foram utilizados nestes testes, sendo os tratamentos constituídos apenas pelos subprodutos agrícolas e o patógeno (Tabela 4).

**Tabela 4.** Tratamentos com diferentes fontes de matéria orgânica com e sem inoculação do patógeno. Controle positivo - inoculado apenas com o patógeno. (SM - solo + subproduto da mandioca; PAC - solo + película da amêndoa de cacau).

Tratamentos	Foc	Matéria Orgânica
C1(C+)	Sim	-
C2	-	SM
C3	-	PAC
C4	Sim	SM
C5	Sim	PAC
C6	-	-

Controle positivo = C+

#### **Avaliação da colonização de mudas de bananeira por *Trichoderma* sp.**

A avaliação da colonização das plantas de bananeira (raízes, pseudocaule e folhas) por *Trichoderma* sp. foi realizada após a coleta das plantas. Fragmentos de tecidos de folha, pseudocaule e raízes de três plantas de cada tratamento foram desinfestados pela imersão em soluções de álcool 70% (1 minuto), hipoclorito de sódio 1% (1 minuto), seguido de três lavagens consecutivas em água destilada esterilizada. Após desinfestados em câmara de fluxo laminar, os tecidos foram cortados em fragmentos de 5 mm com bisturi esterilizado e dez fragmentos de cada tecido foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultivo TSM adaptado (0,2 g L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,9 g L<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,15 g L<sup>-1</sup> de KCl; 1 g L<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>; 3 g L<sup>-1</sup> de dextrose; 0,15 g L<sup>-1</sup> de rosa de Bengala; 3 mL L<sup>-1</sup> de Triton X100 e 2 mL L<sup>-1</sup> de Carbendazim) e incubados a 25 ± 1 °C por 3 dias em incubadora BOD para observação do crescimento de *Trichoderma* sp. A avaliação da colonização foi feita com base na contagem do número de fragmentos de raiz, de pseudocaule e folha de bananeira com crescimento micelial de *Trichoderma* sp., sendo determinada a frequência de fragmentos colonizados pelo fungo (fragmentos colonizados em relação ao número total de fragmentos semeados em meio TSM adaptado). Os dados foram transformados pela fórmula  $\log(x + 1)$ , para normalização dos dados e fez-se a análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de agrupamento de médias de Scott-knott (5% de significância).

### **Avaliação da colonização do solo pelo patógeno e antagonista.**

A população do patógeno e de *Trichoderma* sp. no solo foi avaliada ao final do experimento pela metodologia de diluição seriada e contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) no solo. De cada saco de muda contendo solo foi retirada uma alíquota de 5 g de solo. As alíquotas de 20 sacos de muda (repetições de cada tratamento) foram misturadas e homogeneizadas, totalizando 14 amostras compostas de solo. Para o preparo das diluições seriadas dessas amostras foram feitas suspensões de 10 g de cada amostra composta de solo em 90 mL de solução salina (0,85 % NaCl) esterilizada, utilizando frascos de Erlenmeyer com capacidade para 250 mL. Os frascos foram colocados em agitador orbital por 30 minutos. A partir dessa suspensão de solo foram preparadas diluições até  $10^{-6}$ . Das diluições  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  e  $10^{-6}$  alíquotas de 0,1 mL foram transferidas para placas de Petri contendo meio batata dextrose ágar (BDA) com  $1 \text{ mL L}^{-1}$  de oxitetraciclina, sendo plaqueadas três repetições para cada diluição. As placas foram incubadas em BOD a  $25 \pm 2^\circ \text{C}$  por três dias e fez-se a contagem das colônias. A população de Foc foi determinada pela contagem das unidades formadoras de colônia (UFC).

### **Análise dos dados**

Para análise de variância e o agrupamento de médias pelo teste Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ) foi utilizado o programa R 3.3.1 (R CORE TEAM, 2016).

## RESULTADOS

Dos 24 isolados de *Trichoderma* sp. testados inicialmente, 65,22% foram agrupados na classe 1 pela escala de Bell, indicando que o *Trichoderma* cresceu sobre o patógeno ocupando toda superfície do meio, sendo um potencial agente de biocontrole (Tabela 5).

**Tabela 5.** Área de crescimento micelial de Foc, porcentagem de inibição do patógeno pelo antagonista e agrupamento destes em termos de eficiência no antagonismo em culturas pareadas, segundo a escala de Bell et al. (1982).

Isolados	Área de crescimento micelial de Foc (cm)	Inibição do patógeno (%)	BELL
TCS 101	6,16 ± 0,62 a	88,05	1
TCS 95	6,51 ± 0,50 a	87,37	1
TCS 100	6,71 ± 0,84 a	86,99	1
TCS 97	7,07 ± 0 a	86,31	1
TCS 81	7,08 ± 0,67 a	86,29	1
TCS 98	7,08 ± 0,67 a	86,29	1
TCS 94	7,09 ± 0,95 a	86,23	1
TCS 96	7,26 ± 0,43 a	85,94	1
TCS 93	7,27 ± 0,79 a	85,91	2
TCS 89	7,27 ± 0,79 a	85,91	1
TCS 102	7,27 ± 0,79 a	85,91	1
TCS 99	7,28 ± 1,07 a	85,89	1
TCS 90	7,33 ± 1,57 a	85,79	1
TCS 92	7,69 ± 1,47 a	85,08	2
TCS 84	8,05 ± 0,71 a	84,4	1
TCS 83	8,06 ± 1,00 a	84,38	2
TCS 103	8,09 ± 1,45 a	84,33	1
TCS 85	9,56 ± 1,67 b	81,47	1
TCS 88	9,75 ± 1,25 b	81,09	2
TCS 80	9,99 ± 1,44 b	80,64	2
TCS 86	10,72 ± 2,26 b	79,22	2
TCS 91	10,77 ± 2,72 b	79,12	2
TCS 87	11,48 ± 2,91 b	77,75	2
Controle	51,63 ± 9,53 c	-	-
<b>CV (%)</b>	<b>7,99</b>		

<sup>(1)</sup>Valores seguidos pela mesma letra na coluna pertencem ao mesmo grupo, segundo o teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade; <sup>(2)</sup>Classe 1: *Trichoderma* cresce sobre o patógeno e ocupa toda a superfície do meio; Classe 2: *Trichoderma* cresce sobre pelo menos 2/3 da superfície do meio; Classe 3: *Trichoderma* ocupa aproximadamente metade da superfície do meio; Classe 4: *Trichoderma* cresce sobre 1/3 da superfície do meio; Classe 5: *Trichoderma* não cresce e o patógeno ocupa toda a superfície da placa. Controle - crescimento de Foc sem *Trichoderma*.

Os demais isolados também revelaram potencial para o controle de Foc, sendo agrupados na classe 2 da mesma escala. O antagonista é classificado como eficiente com nota 2,0 quando crescem sobre todo o meio ou muito eficiente com a nota 1,0 quando cresce sobre o meio e o patógeno (ETHUR, 2006). Entretanto, observa-se que todos os isolados causaram de 77,75 a 88,05% de inibição do crescimento micelial de Foc.

Nos testes de metabólitos voláteis os isolados TCS 97, TCS 87, TCS 101, TCS 85, TCS 103, TCS 86, TCS 96, TCS 98, TCS 94 e TCS 91 apresentaram as maiores porcentagens de inibição do crescimento micelial (ICM%) sobre o patógeno (Foc), com valores entre 40 e 50% de inibição (Tabela 6).

**Tabela 6.** Área abaixo da curva de crescimento micelial (AACCM) e porcentagem de inibição do crescimento micelial (ICM%) de *Foc*, obtidos pelos métodos de detecção de metabólitos voláteis (MV) e metabólitos não voláteis (MNV).

Isolados	MV		MNV	
	AACCM	ICM (%)	AACCM	ICM (%)
TCS 97	92,50 a	50,00	1,95 a	83,32
TCS 87	100,11 a	45,89	2,54 b	78,29
TCS 101	105,52 a	42,97	2,02 a	82,68
TCS 85	105,94 a	42,74	2,90 b	75,16
TCS 103	106,40 a	42,49	2,28 a	80,53
TCS 86	107,51 a	41,89	1,99 a	82,93
TCS 91	107,66 a	41,81	2,42 b	79,33
TCS 98	108,00 a	41,62	2,11 a	81,98
TCS 96	108,36 a	41,43	1,88 a	83,88
TCS 94	109,87 a	40,61	2,64 b	77,41
TCS 100	112,74 a	39,06	1,94 a	83,45
TCS 93	114,26 a	38,24	2,76 b	76,43
TCS 84	114,98 a	37,86	2,00 a	82,88
TCS 102	116,09 a	37,25	2,08 a	82,22
TCS 99	118,68 a	35,85	2,17 a	81,47
TCS 95	127,11 a	31,30	2,25 a	80,72
TCS 90	129,24 a	30,15	2,87 b	75,43
TCS 82	135,98 b	26,50	2,33 a	80,75
TCS 81	137,84 b	25,55	2,12 a	81,81
TCS 92	144,36 b	21,98	1,90 a	83,75
TCS 83	155,51 b	15,95	3,42 c	70,76
TCS 80	159,79 b	13,64	2,02 a	82,71
TCS 89	-	-	1,79 a	83,37
Controle	185,03 c	-	11,70 d	-
C.V.(%)	13,55		10,01	

As médias seguidas pela mesma letra pertencem ao mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Controle - crescimento de *Foc* sem *Trichoderma*.

Todos os isolados de *Trichoderma* sp. causaram acima de 70% de inibição do crescimento micelial de *Foc* pela ação de compostos não voláteis (Tabela 6).

Também todos os isolados de *Trichoderma* cresceram nos substratos com subproduto da mandioca (SM) e com subproduto da película da amêndoa de cacau

(PAC). Os dois subprodutos agrícolas incorporados ao substrato como fonte de matéria orgânica proporcionaram o crescimento do antagonista e a inibição do patógeno. A inibição do patógeno pelos isolados de *Trichoderma* variou com o tipo de matéria orgânica e o isolado deste fungo antagonista (Tabela 7). Apenas nos tubos com os isolados TCS 92 e TCS 97 e com PAC como fonte de matéria orgânica não houve o crescimento de *Trichoderma* sobre o patógeno.

**Tabela 7.** Colonização micelial de Foc (CMF) por volume de substrato (cm<sup>3</sup>) e Inibição do crescimento de Foc (ICF%).

Isolados de <i>Trichoderma</i> sp.	PAC		SM	
	CMF(cm <sup>3</sup> )	ICF (%)	CMF (cm <sup>3</sup> )	ICF (%)
TCS 87	13,43 ± 7,06 a	78,81	57,98 ± 0,70 b	13,09
TCS 103	21,21 ± 5,34 a	66,64	57,96 ± 3,93 b	13,07
TCS 85	37,69 ± 26,61 b	40,52	57,25 ± 3,67 b	14,13
TCS 84	40,05 ± 24,93 b	36,8	25,92 ± 10,80 a	61,13
TCS 96	40,29 ± 16,71 b	36,43	57,96 ± 11,68 b	13,07
TCS 99	48,77 ± 4,30 b	23,04	34,87 ± 24,09 a	47,7
TCS 98	49,95 ± 6,33 b	21,18	59,85 ± 3,26 b	10,24
TCS 92	57,72 ± 4,08 c	8,92	45,00 ± 14,49 a	14,49
TCS 101	59,14 ± 6,01 c	6,69	58,00 ± 0,0 b	13,15
TCS 97	60,32 ± 11,92 c	4,83	55,13 ± 1,22 b	17,31
Controle	63,37 ± 3,89 c	-	66,67 ± 1,47c	-
C.V. %	14,09	-	18,06	-

Médias seguidas pela mesma letra na coluna pertencem ao mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. CMFoc: Colonização micelial de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense*; ICF: inibição de crescimento de Foc; SM: subproduto da mandioca; PAC: película da amêndoa de cacau. Controle – crescimento de Foc sem *Trichoderma*.

A inibição do crescimento de Foc (ICF) foi maior com o isolado TCS 87 (78,81%) e o isolado TCS 103 (66,64%), sendo também estes isolados os que promoveram a maior colonização no substrato com a película de amêndoa de cacau, com 86,57cm<sup>3</sup> e 78,79cm<sup>3</sup>, respectivamente. No substrato com o subproduto da mandioca a colonização foi maior com os isolados TCS 84, TCS 99 e TCS 92 com inibição de 61,13%, 47,4% e 14,49% respectivamente (dados não apresentados).

Para os estudos de controle do mal do Panamá em mudas de bananeira foram selecionados os isolados TCS 85, TCS 87, TCS 97, TCS 101 e TCS 103 e acrescentou-se o isolado TCS 29 selecionado por Souza (2016) para o controle

desta doença em mudas de bananeira. Estes isolados de *Trichoderma* sp. foram identificados pelas características morfológicas e por sequenciamento do DNA, como *Trichoderma harzianum* e *T. asperellum* (Tabela 8).

**Tabela 8.** Identificação molecular dos isolados de *Trichoderma* selecionados para utilização em casa de vegetação.

Isolado	Tamanho	Cobertura	Identidade <sup>2</sup>	Taxonomia	Nº de acesso <sup>3</sup>
TCS29	483	100%	100%	<i>Trichoderma harzianum</i>	KR232487.1; KM875463.1
TCS85	577	99%	99%	<i>Trichoderma asperellum</i>	KT336508.1
TCS87	423	100%	100%	<i>Trichoderma asperellum</i>	KM103338.1
TCS97	434	100%	100%	<i>Trichoderma asperellum</i>	JQ013144.1
TCS101	540	100%	100%	<i>Trichoderma asperellum</i>	JN004173.1
TCS103	512	99%	98%	<i>Trichoderma asperellum</i>	KU497723.1

Os tratamentos com *T. harzianum* (TCS 29) e *T. asperellum* (TCS 85, TCS 87, TCS 101 e TCS 103) e a adição do subproduto de película da amêndoa de cacau promoveram os melhores resultados em termos de promoção de crescimento das mudas de bananeira (Tabela 9). Dos tratamentos com o subproduto da mandioca, os isolados TCS 29 e TCS 85 promoveram maior produção de matéria seca da raiz, maior altura, diâmetro do pseudocaule e volume de raízes (Tabela 9).

Sem os subprodutos agrícolas, apenas os isolados TCS 97 e TCS 101 de *T. asperellum* promoveram o aumento significativo da altura da planta e diâmetro do pseudocaule. O isolado TCS 85 de *T. asperellum* promoveu o aumento da massa seca das raízes, o isolado TCS 87 desta mesma espécie promoveu o aumento na massa seca e volume das raízes e diâmetro do pseudocaule, e o TCS 103 promoveu o aumento do diâmetro do caule. Não foi observado um efeito benéfico do isolado TSC 29 sem a adição do subproduto agrícola ao solo.

**Tabela 9.** Matéria seca da parte aérea (MSA), matéria seca da raiz (MSR), matéria seca total (MST), altura (ALT), diâmetro abaixo do colo (DAC) e volume da raiz (VOL) de mudas de bananeira, após 60 dias de inoculação com os isolados de *Trichoderma* e *Foc (Fusarium oxysporum f. sp. cubense)*, em condições de casa de vegetação.

<i>Trichoderma</i>	M.O.	MSA (g)	MSR (g)	MST (g)	ALT (cm)	DAC (cm)	VOL (cm <sup>3</sup> )
TCS 29	-	2,38 ± 0,62 a	1,20 ± 0,73a	3,58 ± 1,14a	25,40 ± 2,07a	1,20 ± 0,07a	10,00 ± 2,00a
TCS 85	-	2,63 ± 0,96a	1,90 ± 0,77b	4,53 ± 1,57a	22,20 ± 9,07a	1,20 ± 0,39a	15,20 ± 5,59b
TCS 87	-	2,65 ± 1,36a	2,65 ± 2,92b	5,30 ± 3,82a	23,20 ± 5,22a	1,36 ± 0,19b	22,60 ± 2,79c
TCS 97	-	2,82 ± 2,11a	1,67 ± 1,67a	4,49 ± 3,63a	26,70 ± 4,76b	1,58 ± 0,29b	15,20 ± 10,35b
TCS 101	-	3,46 ± 2,11a	1,03 ± 0,85a	4,49 ± 2,76a	26,76 ± 8,78b	1,54 ± 0,42b	13,60 ± 7,13b
TCS 103	-	1,41 ± 0,27a	0,85 ± 0,50a	2,26 ± 0,61a	23,60 ± 3,29a	1,32 ± 0,11b	9,20 ± 4,15a
TCS 29	RM	3,05 ± 1,47a	1,93 ± 1,60b	4,98 ± 2,55a	30,90 ± 5,48b	1,52 ± 0,28b	24,28 ± 8,16c
TCS 85	RM	3,04 ± 0,83a	2,09 ± 1,06b	5,13 ± 1,10a	30,06 ± 1,89b	1,34 ± 0,05b	13,20 ± 3,03b
TCS 87	RM	2,45 ± 2,23a	1,21 ± 0,77a	3,66 ± 2,28a	28,38 ± 4,45b	1,28 ± 0,16a	14,40 ± 6,69b
TCS 97	RM	1,16 ± 0,42a	0,65 ± 0,23a	1,81 ± 0,31a	21,94 ± 2,43a	1,08 ± 0,08a	6,40 ± 3,29a
TCS 101	RM	1,49 ± 0,67a	0,97 ± 0,47a	2,46 ± 1,11a	23,44 ± 3,75a	1,10 ± 0,14a	12,40 ± 3,85b
TCS 103	RM	1,97 ± 0,73a	1,31 ± 0,48a	3,28 ± 1,14a	25,00 ± 2,89a	1,28 ± 0,08a	16,80 ± 3,63b
TCS 29	PC	6,26 ± 1,82b	3,13 ± 2,29b	9,39 ± 3,53b	47,13 ± 1,58c	2,14 ± 0,11d	29,60 ± 14,79c
TCS 85	PC	3,87 ± 2,44a	3,86 ± 1,82b	7,73 ± 3,52b	43,88 ± 8,04c	1,72 ± 0,36c	27,60 ± 6,39c
TCS 87	PC	9,59 ± 5,41b	2,70 ± 1,29b	12,29 ± 6,63b	49,70 ± 8,03c	2,56 ± 0,44d	27,20 ± 8,32c
TCS 97	PC	2,38 ± 1,85a	0,99 ± 0,85a	3,37 ± 2,69a	34,20 ± 11,17b	1,24 ± 0,43a	23,20 ± 6,26c
TCS 101	PC	6,36 ± 4,10b	2,67 ± 2,29b	9,03 ± 6,01b	48,20 ± 6,01c	1,86 ± 0,30c	24,40 ± 10,71c
TCS 103	PC	7,03 ± 2,44b	2,78 ± 0,76b	9,81 ± 2,76b	45,88 ± 0,93c	2,10 ± 0,22d	26,80 ± 5,40c
Controle	-	2,56 ± 1,32a	1,40 ± 0,63a	3,96 ± 1,70a	27,60 ± 3,66b	1,42 ± 0,36b	16,00 ± 6,93b
<b>C.V.%</b>		<b>19,9</b>	<b>22,34</b>	<b>25,32</b>	<b>5,91</b>	<b>11,06</b>	<b>12,89</b>

As médias seguidas pela mesma letra na coluna pertencem ao mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

O diâmetro do pseudocaule foi maior para os tratamentos com TCS 87, TCS 29 e TCS 103 combinado com a incorporação ao solo do subproduto de película de cacau, sendo de 2,56 cm, 2,14 cm e 2,10 cm respectivamente.

Para avaliação dos parâmetros de crescimento, de qualidade das mudas e o controle da doença foi calculada a relação entre altura da planta e diâmetro do caule (RAD), entre a parte aérea e raiz (RPAR), o índice de qualidade de Dickson e o índice de severidade da doença (Tabela 10). No tratamento com a adição da película de cacau em solo infestado com *Fusarium* e *Trichoderma asperellum* (TCS 97), o índice de qualidade da muda (índice de Dickson) foi muito baixo (0,11). O índice de qualidade da muda foi superior com valores de 0,39; 0,29; 0,46; 0,31 e 0,40 para os tratamentos com película de cacau combinada com os isolados *T. harzianum* (TCS 29) e *T. asperellum* (TCS 85, TCS 87, TCS 101 e TCS 103), respectivamente. Os tratamentos com TCS 29, TCS 87 e TCS 103 foram significativamente superiores aos tratamentos com TCS 85 e TCS 101. O tratamento com o isolado TCS 85 e sem o subproduto agrícola proporcionou um índice de qualidade da muda de 0,29, o qual foi semelhante aos valores observados para esse isolado e para o isolado TCS 101 com película de cacau (Tabela 10).

**TABELA 10.** Parâmetros de crescimento e qualidade de mudas de bananeira: Relação entre altura da planta e diâmetro do pseudocaule (RAD), matéria seca da parte aérea e raízes (RPAR), índice de qualidade de Dickson (IQD), e índice de severidade (IS) em função dos dois tipos de substratos e dos isolados de *Trichoderma*.

TRATAMENTOS		PARÂMETROS DE CRESCIMENTO			
<i>Trichoderma</i>	M.O.	RAD	RPAR	IQD	IS
TCS29	-	21,16 ± 2,70b	1,98 ± 0,93a	0,15 ± 0,05a	66,00 ± 20,74b
TCS85	-	18,50 ± 3,73a	1,38 ± 0,83a	0,22 ± 0,11b	48,00 ± 31,14b
TCS87	-	17,05 ± 4,14a	1,00 ± 0,93a	0,29 ± 0,37c	14,00 ± 13,42a
TCS97	-	16,89 ± 2,61a	1,68 ± 0,87a	0,24 ± 0,22b	66,00 ± 33,62b
TCS101	-	17,37 ± 2,33a	3,35 ± 3,09c	0,21 ± 0,14b	60,00 ± 38,08b
TCS103	-	17,87 ± 2,19a	1,65 ± 0,73a	0,11 ± 0,04a	76,00 ± 18,17b
TCS29	RM	20,32 ± 2,80a	1,58 ± 1,79a	0,22 ± 0,14b	44,00 ± 36,47b
TCS85	RM	22,43 ± 2,19b	1,45 ± 0,91a	0,21 ± 0,06b	34,00 ± 37,82a
TCS87	RM	22,17 ± 4,70b	2,02 ± 1,96b	0,15 ± 0,06a	72,00 ± 16,43b
TCS97	RM	20,31 ± 1,31a	1,78 ± 1,34a	0,08 ± 0,01a	64,00 ± 11,40b
TCS101	RM	21,30 ± 5,18b	1,53 ± 0,36a	0,10 ± 0,05a	62,00 ± 25,88b
TCS103	RM	19,53 ± 1,90a	1,50 ± 0,45a	0,15 ± 0,06a	44,00 ± 27,93b
TCS29	PC	22,02 ± 0,88b	2,00 ± 1,35b	0,39 ± 0,17d	8,00 ± 10,95a
TCS85	PC	25,51 ± 4,41b	1,00 ± 1,02a	0,29 ± 0,16c	18,00 ± 16,43a
TCS87	PC	23,00 ± 2,95b	3,55 ± 1,19c	0,46 ± 0,27d	4,00 ± 5,48a
TCS97	PC	27,58 ± 8,14b	2,40 ± 1,77b	0,11 ± 0,10a	44,00 ± 27,93b
TCS101	PC	25,91 ± 5,52b	2,38 ± 1,98b	0,31 ± 0,24c	8,00 ± 8,37a
TCS103	PC	21,84 ± 2,08b	2,52 ± 1,11b	0,40 ± 0,11d	6,00 ± 5,48a
Controle	-	19,43 ± 6,30a	1,82 ± 1,10a	0,18 ± 0,05a	88,00 ± 13,04b
<b>C.V.%</b>		<b>5,48</b>	<b>6,62</b>	<b>13,52</b>	<b>32,38</b>

As médias seguidas pela mesma letra na coluna pertencem ao mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Os menores índices de severidade da doença foram obtidos nos tratamentos com *T. asperellum* (isolado TSC 87), com e sem a adição do subproduto de película de cacau. Com esse subproduto e o isolado TSC 87, o índice de doença caiu de 14 para 4, sendo o índice mais baixo observado neste trabalho. Os tratamentos com *T. asperellum* (isolado TSC 85) e os dois subprodutos incorporados ao solo promoveram índices baixos da doença. Os isolados TSC 29, TCS 85, TCS 87, TSC 101 e TSC 103 promoveram índices baixos da doença, nos tratamentos com a incorporação do subproduto de película de cacau (Tabela 10). Estes índices baixos da doença promovidos pelos tratamentos acima indicados corresponderam também

aos melhores índices de qualidade da muda, com destaque para os tratamentos com os isolados *T. harzianum* (TCS 29) e *T. asperellum* (TCS 87 e TCS 103) com a adição ao solo do subproduto de película de cacau. A combinação da incorporação de película de cacau e espécies selecionadas de *Trichoderma* promoveu uma melhoria na qualidade das mudas como resultado do controle da doença e o melhor crescimento destas.

Índices elevados de doença foram observados nos tratamentos contendo apenas *Trichoderma*, exceto para o tratamento com *T. asperellum* (isolado TSC 87). Nos tratamentos com *Trichoderma* e a incorporação do subproduto da mandioca, o índice da doença foi elevado, inclusive para o tratamento com TSC 87 (Tabela 10). Este isolado (TSC 87) foi eficiente no controle da doença e promoção de crescimento das mudas de bananeira quando aplicado sem matéria orgânica ou com o subproduto de película de cacau como fonte de matéria orgânica.

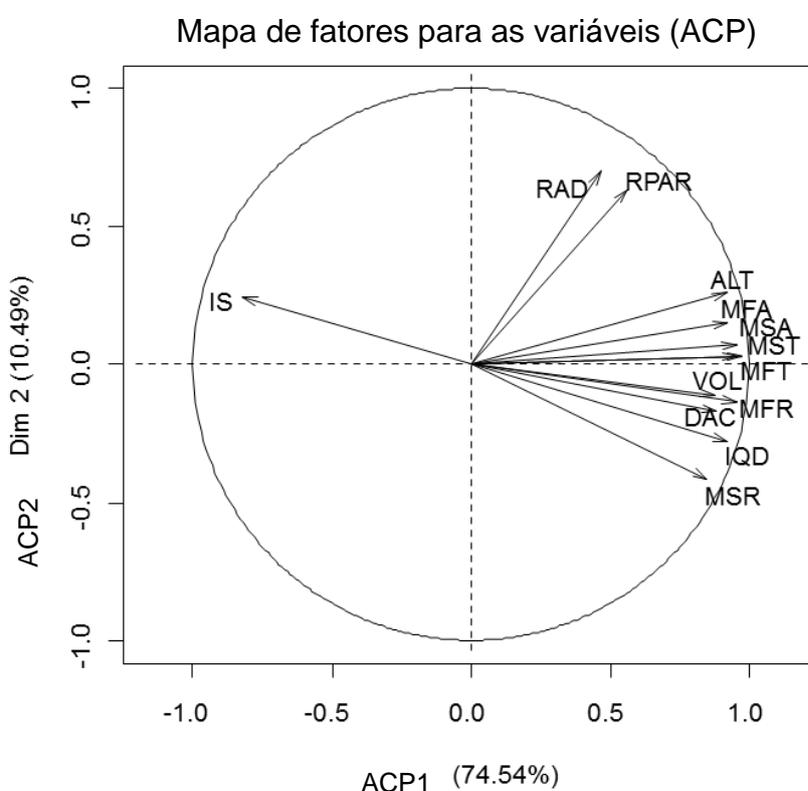
Nas avaliações do crescimento das mudas em solo com e sem matéria orgânica, sem *Trichoderma*, infestado ou não com Foc observou-se o efeito superior do tratamento com a adição ao solo do subproduto de película de cacau (Tabela 11). Os melhores resultados em relação ao crescimento das mudas de bananeira foram com os tratamentos em solo não infestado com Foc e com a adição da película de subproduto de cacau, com quase o dobro do valor de índice de qualidade da muda. Entretanto, o crescimento das mudas na presença de Foc e com a adição da película de cacau atingiu valores semelhantes aqueles observados nas mudas produzidas em solo sem Foc e sem matéria orgânica (Tabela 11).

**TABELA 11.** Matéria seca da parte aérea (MSA), matéria seca da raiz (MSR), matéria seca total (MST), altura (ALT), diâmetro do pseudocaule (DAC) e volume da raiz (VOL) de mudas de bananeira e parâmetros de crescimento e qualidade das mudas: Relação entre altura da planta e diâmetro do coleto (RAD), matéria seca da parte aérea e raízes (RPAR), índice de qualidade de Dickson (IQD), e índice de severidade (IS) após 60 dias de inoculação com *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* e adição de matéria orgânica, em de casa de vegetação.

Tratamentos	MSA (g)	MSR (g)	MST (g)	ALT (cm)	DAC(cm)	VOL(cm <sup>3</sup> )	RAD	RPAR	IQD	IS
<b>C1</b>	2,55 ± 1,32a	0,89 ± 0,63a	3,96 ± 1,70a	27,60 ± 3,66 <sup>a</sup>	1,42 ± 0,36a	16,00 ± 6,93a	20,51 ± 6,30a	2,04 ± 1,10a	0,17 ± 0,05a	88 ± 13,04c
<b>C2</b>	2,59 ± 0,57a	1,05 ± 1,70a	5,22 ± 1,91a	28,18 ± 1,36 <sup>a</sup>	1,56 ± 0,19a	20,80 ± 3,03a	18,25 ± 2,14a	1,35 ± 0,84a	0,26 ± 0,10b	0 ± 0a
<b>C3</b>	16,55 ± 3,67c	4,25 ± 0,59c	20,60 ± 3,59c	58,20 ± 2,95c	2,12 ± 0,11b	38,80 ± 5,02c	27,50 ± 1,75b	4,18 ± 1,24b	0,64 ± 0,08c	0 ± 0a
<b>C4</b>	2,03 ± 1,67a	0,56 ± 0,58a	3,34 ± 2,16a	26,10 ± 4,87 <sup>a</sup>	1,42 ± 0,22a	15,60 ± 4,34a	18,94 ± 5,49a	1,45 ± 0,61a	0,17 ± 0,11a	88 ± 13,04c
<b>C5</b>	5,48 ± 6,30a	1,02 ± 0,64a	6,66 ± 6,93a	43,80 ± 11,43b	1,36 ± 0,05a	22,80 ± 11,97b	32,20 ± 8,10b	3,86 ± 2,13b	0,16 ± 0,12a	44 ± 27,93b
<b>C6</b>	6,78 ± 0,69b	3,59 ± 0,73b	9,08 ± 1,01b	42,00 ± 1,00b	1,82 ± 0,20b	23,60 ± 4,98b	23,33 ± 2,91a	3,14 ± 0,86b	0,35 ± 0,08b	0 ± 0a
<b>CV %</b>	15,19	14,67	19,28	14,57	8,75	8,17	6,26	16,7	7,92	3,27

C1 – solo com Foc e sem matéria orgânica; C2 – solo sem Foc e com subproduto da mandioca; C3 – solo sem Foc e com película de cacau; C4 - solo com Foc e com subproduto da mandioca; C5 – solo com Foc e com película de cacau; C6 – solo sem Foc e sem matéria orgânica; CV – coeficiente de variação. As médias seguidas pela mesma letra na coluna pertencem ao mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Na análise dos componentes principais (ACP) (Figura 1), 85,03% da variância pode ser explicada pelo componente principal 1 (ACP 1) e o componente principal 2 (ACP 2). ACP 1 concentrou 74,54% da variabilidade contida nas variáveis: matéria seca da parte aérea (MSA), matéria seca da raiz (MSR), matéria seca total (MST), matéria fresca da parte aérea (MFA), matéria fresca da raiz (MFR), matéria fresca total (MFT), altura (ALT), diâmetro abaixo do colo (DAC) e volume da raiz (VOL), índice de qualidade de Dickson (IQD), e índice de severidade (IS). O segundo componente principal (ACP 2) concentrou 10,49% da variabilidade contida nos parâmetros: relação entre altura da planta e diâmetro do coleto (RAD), matéria seca da parte aérea e raízes (RPAR).

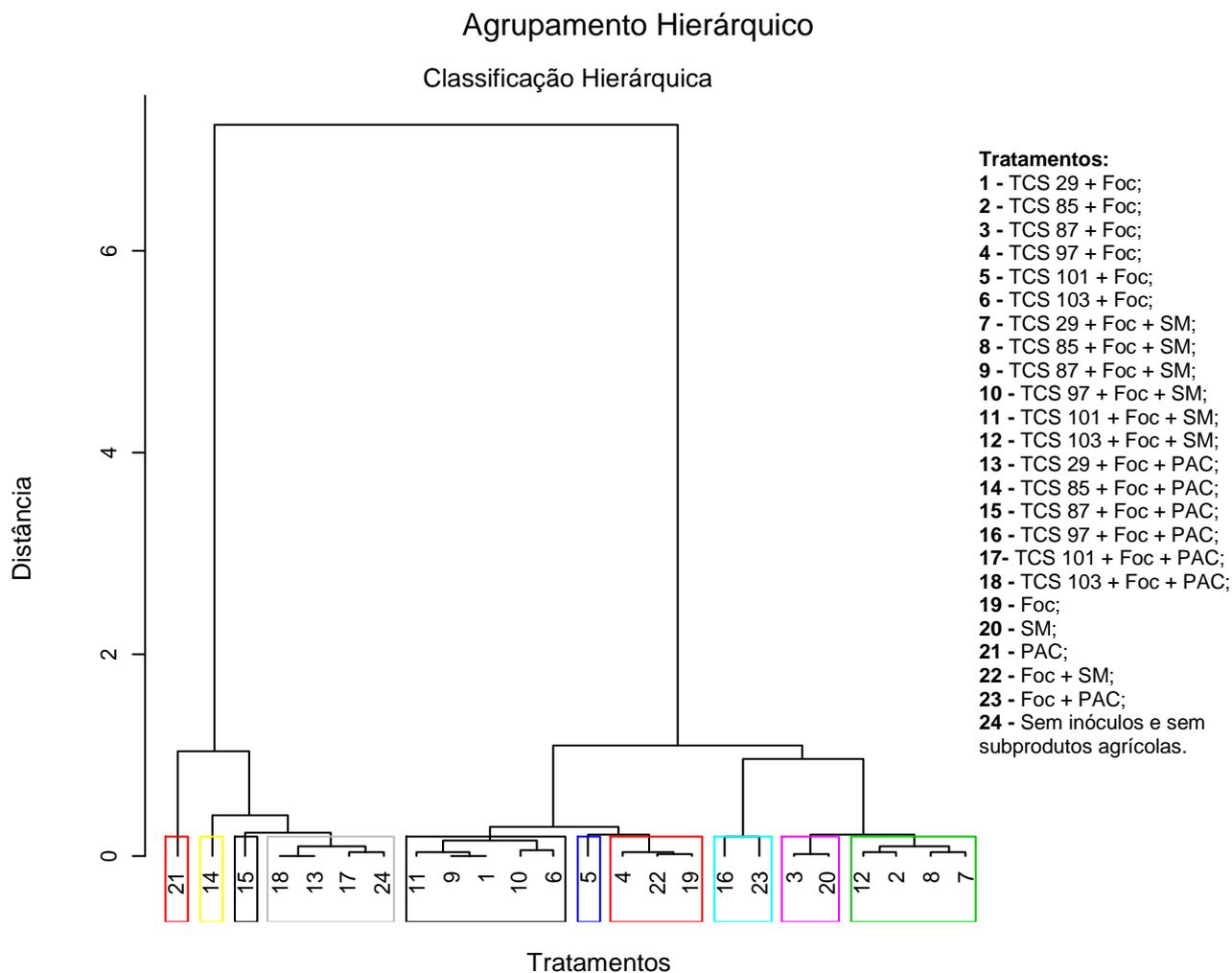


**Figura 1.** Análise de componentes principais (ACP) com as variáveis: matéria seca da parte aérea (MSA), matéria seca da raiz (MSR), matéria seca total (MST), matéria fresca da parte aérea (MFA), matéria fresca da raiz (MFR), matéria fresca total (MFT), altura (ALT), diâmetro abaixo do colo (DAC) e volume da raiz (VOL), relação entre altura da planta e diâmetro do coleto (RAD), matéria seca da parte aérea e raízes (RPAR), índice de qualidade de Dickson (IQD), e índice de severidade (IS), utilizadas na seleção de isolados de *Trichoderma* sp. e de subproduto agrícola para controle do mal do Panamá.

A RAD foi positivamente correlacionada com a RPAR. Assim como MSA, MSR, MST, ALT, DAC, VOL, IQD, MFR, MFA, MFT correlacionaram-se positivamente. O índice de severidade da doença (IS) não se agrupou a nenhuma outra variável.

Através da análise de agrupamento hierárquico (Figura 2), os tratamentos foram agrupados, formando *clusters* de acordo com o grau de similaridade entre eles, ou seja de acordo com o menor índice da doença ou ausência da doença e o crescimento da planta. Os tratamentos 21, 14 e 15 foram os melhores tratamentos em relação a todas as variáveis analisadas. Os tratamentos 14 e 15 foram eficientes no controle do mal do Panamá. O tratamento 21 tem apenas a incorporação ao solo da película da amêndoa de cacau (PAC) como fonte de matéria orgânica, sem inoculação do patógeno e nem do antagonista. Os tratamentos 14 e 15 integram os isolados TCS 85 e TCS 87 de *T. asperellum* respectivamente, mais a incorporação ao solo de PAC e o patógeno no solo.

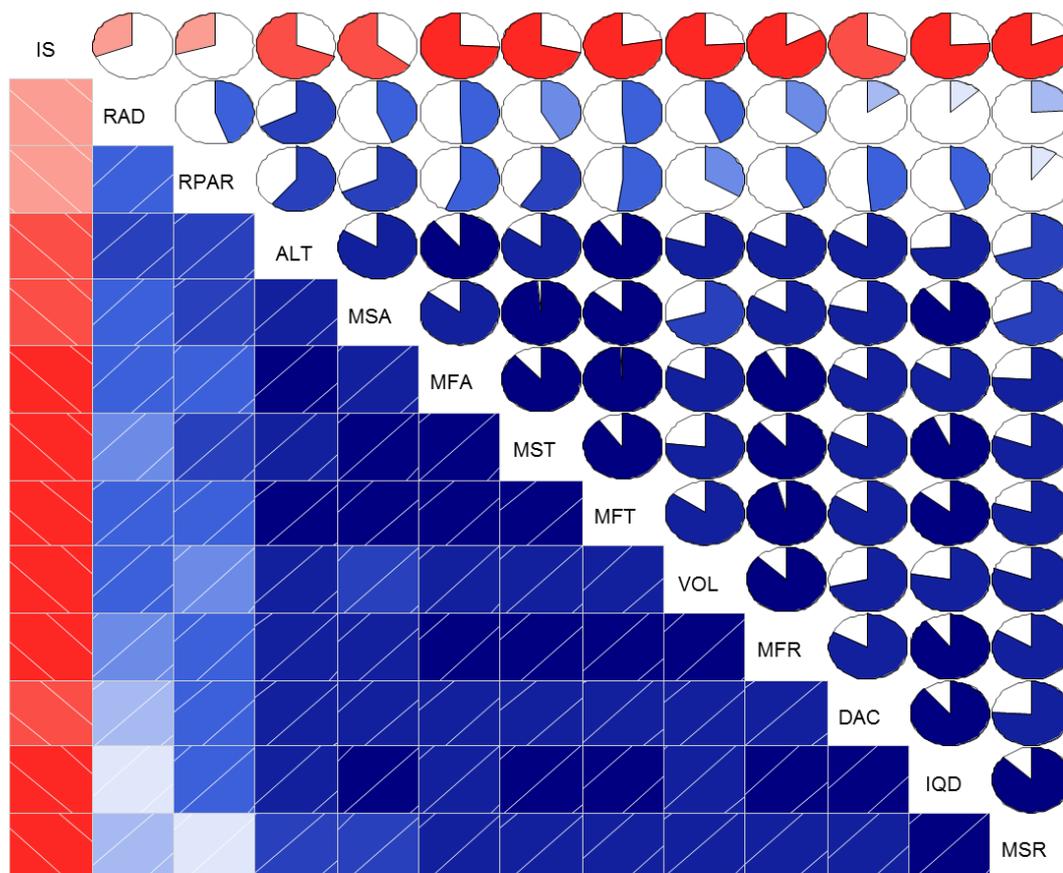
Os tratamentos 18, 13, 17 e 24 formaram um cluster, não havendo diferença entre os três primeiros tratamentos (18,13 e 17) e o tratamento controle (24 - sem nenhuma adição de subprodutos agrícolas e sem infestação de *Foc* e *Trichoderma*). O ultimo cluster contendo os tratamentos 12, 2, 8 e 7 indica os piores tratamentos em relação a todas as variáveis analisadas e ao controle da doença.



**Figura 2.** Representação gráfica da análise de agrupamento (dendrograma) dos 24 tratamentos em função de todas as variáveis analisadas: matéria seca da parte aérea (MSA), matéria seca da raiz (MSR), matéria seca total (MST), altura (ALT), diâmetro abaixo do colo (DAC) e volume da raiz (VOL), relação entre altura da planta e diâmetro do coleto (RAD), matéria seca da parte aérea e raízes (RPAR), índice de qualidade de Dickson (IQD), e índice de severidade (IS).

O correlograma (Figura 3) indica as associações negativas entre IS e todas as outras variáveis, sendo elas inversamente proporcionais. A correlação entre IS e MFR, assim como IS e MSR é negativa. As outras variáveis que não o IS apresentam correlação positiva. Por exemplo, MSA e MST, MRA e MFT, MFT e MFR indicam as correlações positivas mais fortes entre as variáveis analisadas. Quando correlacionadas RPAR e MSR, RAD e IQD, RAD e DAC as associações são fracas.

### Dados em ordem CP2/CP2



**Figura 3.** Correlograma das variáveis avaliadas em experimento em casa de vegetação. A cor vermelha indica uma correlação negativa entre as variáveis, azul uma correlação positiva. O tamanho da fatia da pizza e a intensidade da cor indicam a força da associação entre as variáveis. Índice de severidade (IS) da doença, relação entre altura da planta e diâmetro do coleto (RAD), matéria seca da parte aérea e raízes (RPAR), altura (ALT), matéria seca da parte aérea (MSA), matéria fresca da parte aérea (MFA), matéria seca total (MST), matéria fresca da parte aérea (MFT), volume da raiz (VOL), matéria fresca da raiz (MFR), diâmetro abaixo do colo (DAC), índice de qualidade de Dickson (IQD), matéria seca da raiz (MSR).

A colonização das mudas de bananeira pelos isolados de *Trichoderma* foi observada em 100% dos fragmentos de raiz, caule e folha. Também foi observada a colonização do solo pelo patógeno em baixas concentrações ( $10^2$ ) e pelos isolados de *Trichoderma* em concentrações mais altas ( $10^6$ ).

## DISCUSSÃO

Nos testes *in vitro* de pareamento, todos os isolados de *Trichoderma* sp. mostraram-se eficientes na inibição do patógeno, sendo considerados potenciais agentes de biocontrole. A inibição do crescimento de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* por *Trichoderma* sp. foi acima de 77,75% (Tabela 5) em relação ao crescimento micelial e ocorreu pela ação de compostos voláteis e não voláteis (tabela 6) e também pelo crescimento do antagonista sobre o patógeno (tabela 5), indicando possível ação por antibiose, competição e hiperparasitismo.

De acordo com BOSAH et al., (2010), nos testes de pareamento pode-se observar a colonização rápida das estruturas do patógeno, indicando o potencial de ação por competição e hiperparasitismo. Espécies do gênero *Trichoderma* apresentam mecanismos de ação como antibiose, parasitismo, competição por espaço e nutrientes, além de atuarem em alguns casos na promoção do crescimento de plantas e na indução de resistência a doenças (HARMAN, 2004). Esses mecanismos de ação podem variar entre microrganismos de uma mesma espécie (MARTINS-CORDER; MELO, 1998; CARVALHO et al., 2011).

No presente trabalho os diferentes isolados de *Trichoderma* sp. apresentaram diferenças na eficiência de biocontrole. A produção de substâncias tóxicas, metabólitos voláteis e não voláteis, como alguns ácidos e enzimas fazem parte do mecanismo de antibiose, capazes de inibir a ação do fitopatógeno (REINO et al., 2008; LOUZADA et al., 2009).

No substrato com subprodutos agrícolas, os isolados selecionados de *Trichoderma* apresentaram capacidade de colonização deste e inibição de Foc (Tabela 7), sendo a película de amêndoa de cacau o subproduto mais eficiente, com as maiores porcentagens de inibição quando comparado ao substrato contendo subproduto da mandioca. A adição de matéria orgânica ao solo fornece fontes de nutrientes que favorecem a colonização de antagonistas presentes no solo (LEANDRO et al., 2007). O efeito gerado pela matéria orgânica difere conforme suas características (CASTANO et al., 2011; SAISON et al., 2005). O sucesso da colonização do substrato pelos isolados de *Trichoderma* e inibição de Foc pode estar associado também à produção de metabólitos secundários pelo *Trichoderma* sp. e, também ao fato de alguns isolados terem crescido sobre o *Fusarium* no substrato, indicando possível mecanismo de hiperparasitismo.

O subproduto PAC também promoveu os melhores resultados em termos de crescimento das plantas e controle do mal do Panamá, de forma isolada e combinado com *Trichoderma* (isolados TCS 85, TCS 87, TCS 103, TCS 29 e TCS 101). Algumas espécies do gênero *Trichoderma* são responsáveis por solubilizar e disponibilizar para a planta o ferro, cobre, zinco, fósforo e manganês presentes no solo. Outras podem melhorar os mecanismos de absorção, aumentando a eficiência da planta na utilização de nutrientes essenciais (ALTOMARE et al., 1999). Também podem aumentar a superfície total do sistema radicular, possibilitando um maior acesso aos minerais (HARMAN, 2004).

O potencial de *T. asperellum* incorporado a um composto de resíduo agrícola na supressividade da murcha de *Fusarium* em plantas de cravos (*Dianthus caryophyllus* L.) ornamentais foi relatada por Sant et al., (2010). A incorporação de PAC resultou em maiores acúmulos de MSA, MSR, MST, ALT, DAC e VOL, com exceção do tratamento 16 que não diferiu estatisticamente dos tratamentos com SM e daqueles sem matéria orgânica.

Outros parâmetros de crescimento como RAD, RPAR, IS e a qualidade das mudas também foram avaliados (Tabela 10). Para o cálculo do IQD são levados em consideração a robustez e o equilíbrio da distribuição de biomassa (CALDEIRA et al., 2005; CALDEIRA et al., 2007). Quanto maior o IQD, melhor é a qualidade da muda (CALDEIRA et al., 2012). Contudo, o índice de qualidade pode variar conforme a espécie, o manejo das mudas, tipo e quantidade do substrato, volume do recipiente e idade das mudas (GOMES et al., 2013). O IQD foi maior nos tratamentos com os isolados de *T. harzianum* (TCS 29) e de *T. asperellum* (TCS 87 e TCS 103), respectivamente, em combinação com o subproduto da PAC. Os menores IS da doença foram observados nos tratamentos com PAC, indicando que este subproduto da fabricação do chocolate tem enorme potencial para uso na agricultura, na indução de supressividade ao mal do Panamá e, em combinação com *T. harzianum* (TCS 29) e *T. asperellum* (TCS 87 e TCS 103) promove um controle eficiente desta doença em mudas de bananeira.

O gênero *Trichoderma* apresenta uma grande diversidade metabólica e, mesmo dentro da mesma espécie, há um alto nível de complexidade (LOPES et al., 2012). *Trichoderma harzianum* e *T. asperellum* são as espécies do gênero *Trichoderma* mais prevalentes no país. *T. harzianum* é uma espécie bastante

conhecida e utilizada em cerca de 50 formulados utilizados no controle biológico por todo o mundo (WOO, 2006).

Sem a presença do patógeno e sem *Trichoderma*, o PAC promoveu o melhor desenvolvimento das plantas, o que pode estar associado à disponibilidade de nutrientes. O tratamento com Foc e a incorporação de PAC ao solo apresentou resultados semelhantes ao tratamento sem adição de PAC e sem Foc, demonstrando o efeito positivo e significativo da adição do subproduto de película de cacau em solo infestado com *Fusarium*, superando o efeito negativo da infestação por este patógeno.

Na análise de componentes principais (Figura 1), a variável IS não se agrupou com nenhuma outra variável, uma vez que o índice de severidade da doença está inversamente correlacionado com o índice de qualidade da muda (índice de Dickson), afetando todos os parâmetros de crescimento da muda.

O dendograma (Figura 2) agrupa os tratamentos em função do padrão de similaridade, ou seja, quanto maior a distância, maior é a diferença entre os tratamentos. O tratamento com a película da amêndoa de cacau (PAC) como fonte de matéria orgânica, sem inoculação do patógeno nem do antagonista (tratamento 21) é o melhor tratamento e não forma clusters com nenhum outro, indicando o efeito positivo e significativo da adição do subproduto de película de cacau ao solo. Entretanto, os tratamentos 14 e 15, ambos com infestação de Foc, mas com a incorporação de PAC e de *Trichoderma asperellum* estão próximos ao tratamento 21 no dendograma, demonstrando que a inoculação de *T. asperellum* (TCS 85 e TCS 87) combinada com este subproduto agrícola promoveu o controle do mal do Panamá. Fontes de matéria orgânica influenciam positivamente na eficácia dos agentes de controle biológico, potencializando a colonização e a ação do antagonista (GAVA; PINTO, 2016).

Os tratamentos 18,13 e 17 com os isolados TCS 103, TCS 29, TCS 101 em solo infestado com Foc e com a incorporação de PAC apresentaram resultados semelhantes ao tratamento 24 (sem nenhuma adição de matéria orgânica e sem infestação com Foc e sem *Trichoderma*), formando um único cluster, indicando que o crescimento das mudas de bananeira na presença do patógeno é semelhante a um tratamento sem Foc. Houve o controle da doença, no entanto não tão eficiente como obtido com os isolados *T. asperellum* TCS 85 e TCS 87.

O correlograma (Figura 3) assim como a análise de componentes principais (Figura 1) indica o IS como inversamente proporcional às outras variáveis, ou seja, a doença, avaliada pelo IS, é o fator que mais afeta negativamente o crescimento da planta e, conseqüentemente, a qualidade das mudas de bananeira. A cor vermelha na correlação entre IS e todas as outras variáveis demonstram essa correlação inversa. IS e RAD, IS e RPAR formam as correlações negativas mais fracas quando relacionamos todos os resultados das correlações de IS

As demais variáveis quando correlacionadas entre si, apresentam cor azul, indicando uma correlação positiva, o que indica que uma variável influencia positivamente a outra variável, estando estas relacionadas ao crescimento da planta e, conseqüentemente, a qualidade da muda de bananeira, que por sua vez estão inversamente relacionadas ao IS da doença.

## CONCLUSÕES

Os isolados de *Trichoderma* sp. crescem em substratos com subproduto da mandioca e subproduto da película da amêndoa de cacau.

Os isolados de *T. asperellum* TSC 85, TSC 87, TSC 101 e TSC 103 apresentaram potencial para o controle *in vitro* de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*.

O subproduto de película da amêndoa de cacau promove o crescimento de mudas de bananeira e o controle do mal do Panamá.

O subproduto da mandioca não promove o crescimento de mudas de bananeira e nem o controle do mal do Panamá.

*Trichoderma asperellum* (isolado TCS 87) de forma isolada ou combinado com subproduto de película da amêndoa de cacau promovem o controle do mal do Panamá em mudas de bananeira e, com a adição da película da amêndoa de cacau, o crescimento das mudas é maior.

*Trichoderma asperellum* (TCS 85, TCS 87, TCS 103 e TCS 101) e *T. harzianum* (TCS 29) combinados com a incorporação ao solo do subproduto de película da amêndoa de cacau promovem o controle do mal do Panamá.

## REFERÊNCIAS

ABBOTT, W. S. A. Method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology**, v.18, p.265- 267,1925.

ALTOMARE, C.; NORVWELL, W. A.; BJORKMAN, T.; HARMAN, G. E. Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrole fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22, **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p.2926-2933, 1999.

BELL, D.K.; WELLS, H.D.; MARKHAM, C. R. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. **Phytopathology**, v.72, n.4, p.379-382, 1982.

BOSAH, O.; IGELEKE, C. A.; OMORUSI, V. I. *In vitro* microbial control of pathogenic *Sclerotium rolfsii*. **International Journal of Agriculture & Biology**, v.12, n.3, p.474-476, 2010.

CALDEIRA, M. V. W.; SPATHELF, P.; BARICHELO, L. R.; VOGEL, H. L. M.; SCHUMACHER, M. V. Effect of different doses of vermicompost on the growth of *Apuleia leiocarpa* (Vog) Macbr. seedlings. **Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais**, v.3, p.11-17, 2005.

CALDEIRA, M. V. W.; MARCOLIN, M.; MORAES, E.; SCHAADT, S. S. Influência do resíduo da indústria do algodão na formulação de substrato para produção de mudas de *Schinus terebinthifolius* Raddi, *Archontophoenix alexandrae* Wendl. et Drude e *Archontophoenix cunninghamiana* Wendl. et Drude. **Ambiência**, Guarapuava, v.3, n.3, p.1-8, 2007.

CALDEIRA, M. V. W.; DELARMELINA, W. M.; LÜBE, S. G.; GOMES, D. R.; GONÇALVES, E. O.; ALVES, A. F. Biossólido na composição de substrato para a produção de mudas de *Tectona grandis*. **Floresta**, v.42, n.1, p.77-84, 2012.

CARVALHO, D. D. C.; MELLO, S. C. M.; LOBO JÚNIOR, M.; SILVA, M. C. Controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* *in vitro* e em sementes, e promoção de crescimento inicial do feijoeiro comum por *Trichoderma harzianum*. **Tropical Plant Pathology**, v.36, n.1, p.28-34, 2011.

CASTAÑO, R.; BORRERO, C.; AVILÉS, M. Organic matter fractions by SP-MAS 13 NMR and microbial communities involved in the suppression of Fusarium wilt in organic growth media. **Biological Control**, v.58, p.286–293, 2011.

CORDEIRO, Z.J.M.; DANTAS, J.L.L. Rating bananas reaction to fusarium wilt in Brazil. Proceedings, **International Symposium on Recent Developments in Banana Cultivation Technology**, Taiwan, p.85-88, 1993.

DENNIS, C; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma*, III Hyphal interactions. **Transactions British Mycological Society**, v.57, p.363-369, 1971.

DIAS, J. S. A., ABREU, M. S., RESENDE, M. L. V. Caracterização de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) quanto à compatibilidade vegetativa e à atogenicidade em cultivares de bananeira diferenciadoras de raças no Brasil. **Biota Amazônia**, Macapá, v.4, n.4, p.60-65, 2014.

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

DICKSON, A.; LEAF, A. L.; HOSNER, J. F. Quality appraisal of white spruce and white pine seedling stock in nurseries. **Forestry Chronicle**, v.36, p.10-13, 1960.

DRUZHININA, I.S.; KOPTCHINSKI, A.G.; KOMOM, M.; BISSET, J.; SZAKACS, G.; KUBICEK, C.P. An oligonucleotide barcode for species identification in *Trichoderma* and *Hypocrea*. **Fungal Genetics and Biology**, v.42, p.813-828, 2005.

ELAD Y.; DAVID D.R.; HAREL Y.M.; BORENSHTEIN M.; KALIFA H.B.; SILBER A.; GRABER E.R. Induction of systemic resistance in plants by biochar, a soil-applied carbon sequestering agent. **Phytopathology**, v.100, p.913-921, 2010.

ETHUR, L.Z. Dinâmica populacional e ação de *Trichoderma* no controle de fusariose em mudas de tomateiro e pepineiro. 154 f. **Tese** (Doutorado em Agronomia) -Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.

FAO, FOOD AND AGRICULTUR ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Faostat. Disponível em: <http://www.fao.org>. Acesso em 28 maio 2016.

GAVA, C. A. T; PINTO, J. M. Biocontrol of melon wilt caused by *Fusarium oxysporum* Schlect f. sp. melonis using seed treatment with *Trichoderma* spp. And liquid compost., **Biological Control**, v.97, p.13-20, 2016.

GOMES, D. R.; CALDEIRA, M. V. W.; DELARMELENA, W. M.; GONÇALVES, E. O.; TRAZZI, P. A. Lodo de esgoto como substrato para a produção de mudas de *Tectona grandis* L. **Cerne**, Lavras, v.19, n.1, p.123-131, 2013.

HARMAN, G. E. Myths and Dogmas of Biocontrol. Changes in the perceptions derived from the research on *Trichoderma harzianum* T-22. **Plant Disease**, v.84, p.377-393, 2000.

HARMAN, G.E.; HOWELL, C. R.; VITERBO, A.; CHET. I.; LORITTO, M. *Trichoderma* species – opportunistic avirulent plant symbionts. **Nature Reviews**, v.2, p.43-56, 2004.

KOPCHINSKIY, A.; KOMON, M.; KUBICEK, C.P.; DRUZHININA, I.S. TrichoBLAST: a multilocus database for *Trichoderma* and *Hypocrea* identifications. **Mycological Research**, v.109, p.658-660, 2005.

LEANDRO, L.F.S; GUZMAN, T; FERGUSON, L.M; FERNANDEZ, G.E; LOUWS, F.J. Population dynamics of *Trichoderma* in fumigated and compost-amended soil and on strawberry roots. **Applied Soil Ecology**, v.35, p.237–246, 2007.

LI, H.; CHOUGULE, N. P.; BONNING, B. C. Interaction of the *Bacillus thuringiensis* delta endotoxins Cry1Ac and Cry3Aa with the gut of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*(Harris). **Journal of Invertebrate Pathology**, v.107, n.1, p.69-78, 2011.

LOPES, F.A.; STEINDORFF, A.S.; GERALDINE, A.M.; BRANDÃO, R.S.; MONTEIRO, V.N.; LOBO, M.J.R.; COELHO, A.S.; 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.

SOUZA, L.S.S. *Trichoderma* spp. e resíduos orgânicos no controle integrado do mal do Panamá. 175f. **Tese** (Doutorado em Ciências Agrárias) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 2016.

LOUZADA, G.A.S; CARVALHO, D. D. C; MELLO, S.C.M., LOBO JÚNIOR, M.; MARTINS, I., BRAÚNA L.M. Potencial antagônico de *Trichoderma* spp. originários de diferentes ecossistemas contra *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium solani*. **Biota Neotropical**, v.9, n.3, p.145–149, 2009.

MCKINNEY, H.H. Influence of soil, temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. **Journal of Agricultural Research**, Washington, v.26, p.195-217,1923.

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.

MARTINS-CORDER, M. P; MELO, I. S. Antagonismo “*in vitro*” de *Trichoderma* ssp. a *Verticillium dahlia* KLEB. **Scientia Agrícola**, v.55, p.1-7,1998.

NAGY, V.; SEIDL, V.; SZAKACS, G.; KOMON-ZELAZOWSKA, M.; KUBICEK, C.P.; DRUZHININA, I.S. Application of DNA bar codes for screening of industrially important fungi: the haplotype of *Trichoderma harzianum* sensu stricto indicates superior chitinase formation. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, p.7048-7058., 2007.

NEL, B.; STEINBERG, C.; LABUSCHAGNE, N.; VILJOEN, A. Evaluation of fungicides and sterilants for potential application in the management of Fusarium wilt of banana. **Crop Protection**. 26, 697–705, 2007.

PLOETZ R.C. Fusarium wilt of banana is caused by several pathogens referred to as *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. **Phytopathology**, v.96, p.653-656, 2006.

PLOETZ, R.C.; EVANS, E.A. Banana diseases and the future of the industry. **Horticultural Reviews**, v.43, p.311-351, 2015.

R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em: <https://www.R-project.org/>. Acesso em 18 de junho de 2016

REINO, J.L.; GUERRERO, R.F.; HERNANDEZ-GALAN, R.; COLLADO, I.G. Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. **Phytochemistry**, v.7, p.89-123, 2008.

SAISON, C.; DEGRANGE, V.; OLIVIER, R.; MILLARD, P.; COMMEAUX, C.; MONTANGE, D.; LE ROUX, X. Alteration and resilience of the soil microbial communities following compost amendment: effects of composting level and compost-borne microbial community. **Environmental Microbiology**, v.8, p.247-257, 2005.

SAMUELS, G. J.; CHAVERRI, P.; FARR, D. F.; MCCRAY, E. B. *Trichoderma* Online, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. Disponível em: <http://nt.ars-grin>.

[gov/taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm](http://gov/taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm). Acesso em 25 de nov. 2015.

SANT, D.; CASANOVA, E.; SEGARRA, G.; AVILÉS, M.; REIS, M.; TRILLAS, M.I. Effect of *Trichoderma asperellum* strain T34 on Fusarium wilt and water usage in carnation grown on compost-based growth medium. **Biological Control**, v.53, p.291–296, 2010.

SHAHAT, A.; BRAHIM, A. Y.; HENDAWY, S. F.; OMER, E. A.; HAMMOUDA, F. M.; ABDEL-RAHMAN, F. H.; SALEH, M. A. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of essential oils from organically cultivated fennel cultivars. **Molecules**, v.16, n.2, p.1366- 1377, 2011.

THANGAVELU, R.; MUSTAFFA, M.M. First report on the occurrence of a virulent strain of Fusarium wilt pathogen (Race-1) infecting Cavendish (AAA) group of bananas in India. **Plant Disease**, v.94, p.1379, 2010.

WHITE, T. M.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA for phylogenetics. In: INNIS, M. A. GELFAND, D. H., SNINSKY, J. J., WHITE, T.J. (Eds.), PCR protocols: a guide to methods and applications. **Academic Press**, San Diego, p.315–321, 1990.

WOO, S.L.; SCALA, F.; RUOCCO, M.; LORITO, M. The molecular biology of the interactions between *Trichoderma* spp., phytopathogenic fungi, and plants. **Phytopathology**, v.96, p.181–185, 2006.

WOO, S.L., RUOCCO, M., VINALE, F., NIGRO, M., MARRA, R., LOMBARDI, N., PASCALE, A., LANZUISE, S., MANGANIELLO, G., LORITO, M. *Trichoderma*-based products and their widespread use in agriculture. **Open Mycology Journal**, v.8, p.71–126, 2014.

ZHANG, F., ZHU, Z., YANG, X., RAN, W., SHEN, Q. *Trichoderma harzianum* T-E5 significantly affects cucumber root exudates and fungal community in the cucumber rhizosphere. **Applied Soil Ecology**, v.72, p.41-48, 2013.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

*Trichoderma asperellum* (isolados TCS 85, TCS 87, TCS 101 e TCS 103) apresenta potencial para o controle *in vitro* de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* (Foc). Estes isolados crescem em substrato com os subprodutos do descascamento da mandioca (SM) e a película da amêndoa de cacau (PAC) como fontes de matéria orgânica. Os isolados TCS 103 e TCS 87 inibem significativamente o crescimento de Foc no substrato de areia com o subproduto da PAC.

*Trichoderma asperellum* (isolados TCS 85, TCS 87, TCS 103, TCS 101) e *T. harzianum* (isolado TCS 29) foram os mais eficientes no controle do mal do Panamá em mudas de bananeira produzidas em solo infestado com Foc e com a adição do subproduto de PAC na concentração de 10g para cada 1 kg de solo. Este subproduto promove o crescimento das mudas de bananeira e o controle do mal do Panamá, gerando mudas de bananeira Prata Anã com melhores índices de qualidade, pelo índice de Dickson.

Sem a PAC apenas o isolado de *T. asperellum* TCS 87 promoveu o controle do mal do Panamá e o crescimento das mudas de bananeira. A inoculação de *Trichoderma* integrada à incorporação ao solo de uma fonte de matéria orgânica são práticas que contribuem para o manejo integrado da bananeira e do mal do Panamá. Os isolados de *Trichoderma* selecionados são produtores de substâncias voláteis e não voláteis com ação inibitória ao *Fusarium*.

Diante disso, recomenda-se para a produção de mudas, um substrato com película da amêndoa de cacau e *Trichoderma asperellum* (isolados TCS 85, TCS 87).