



**CATIE**

**EFEITO DE RE-INOCULAÇÕES DE FUNGOS  
ENDOFÍTICOS SOBRE O CONTROLE DO  
NEMATÓIDE CAVERNÍCOLA DA BANANEIRA  
(*Radopholus similis*)**

**ELAINE CRISTINA STOLF**

Turrialba, Julho de 2006.



**CATIE**

**EFEITO DE RE-INOCULAÇÕES DE FUNGOS  
ENDOFÍTICOS SOBRE O CONTROLE DO  
NEMATÓIDE CAVERNÍCOLA DA BANANEIRA  
(*Radopholus similis*)**

Relatório de estágio de conclusão de curso submetido ao curso de Agronomia da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de

**Engenheiro Agrônoma**

Aluno (a): Elaine C. Stolf

Supervisor :Prof. Dr. Luis E. Pocasangre

Orientador: Prof. Dr. Miguel Pedro Guerra

Instituição : Centro Agronômico Tropical de  
Investigación y Enseñanza

Turrialba, Julho de 2006.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Luis E. Pocasangre, supervisor deste trabalho, pela oportunidade, da realização deste estágio, pela orientação, disposição, e seu valioso apoio e incentivo durante a condução deste experimento.

Ao Prof. Dr. Miguel Pedro Guerra, pela excelente orientação, oportunidades e conselhos oferecidos durante meu período acadêmico.

Ao Centro Agrônômico Tropical de Investigación y Enseñansa (CATIE) e ao INIBAP pela oportunidade da realização deste trabalho.

À Emilge Riveros por compartilhar suas experiências e colaboração durante os trabalhos conduzidos.

Aos companheiros do Laboratório de Nematologia: Cindy, Carmen Nunes, Carlos, Leonela, José e Manriquez por compartilhar seus conhecimentos e pelos maravilhosos momentos de descontração.

Aos amigos Alessandra, Gesine, Blanca, Ruben, Julia, Gina, Gustavo (Tchê), em especial a Miguel Barrios que sempre estiveram presentes oferecendo-me apoio moral, carinho e conselhos valiosos.

Aos demais companheiros do Ed. Andino pelos maravilhosos momentos que compartilhamos.

Às companheiras do curso de Agronomia, Deni, Francele, Franciele e Paulinha pelo carinho e amizade a qualquer distância.

Em especial, à minha família que sempre esteve presente incentivando, apoiando, dedicando seus ensinamentos e me auxiliando na busca por meus ideais.

## ÍNDICE

AGRADECIMENTOS .....	i
ÍNDICE .....	ii
ÍNDICE DE TABELAS .....	iii
ÍNDICE DE FIGURAS .....	iv
APRESENTAÇÃO .....	v
DESCRIÇÃO DA INSTITUIÇÃO .....	vi
RESUMO .....	vii
RESUMEN .....	viii
ABSTRACT .....	ix
1. INTRODUÇÃO .....	1
1. 1. Objetivos.....	3
1. 1. 1. Geral .....	3
1. 1. 2. Específicos.....	3
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	4
2. 1. Biologia e danos causados pelo nematóide cavernícola da bananeira <i>Radopholus similis</i> .....	5
2. 2. Controle químico de nematóides da bananeira.....	7
2. 3. Utilização de microorganismos para biocontrole de nematóides da bananeira....	9
2. 3. 1. Fungos nematófagos.....	9
2. 3. 2. Fungos micorrizicos arbusculares .....	11
2. 3. 3. Fungos endofíticos.....	12
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	16
3. 1. Material experimental.....	16
3. 2. Cultivo de Fungos endofíticos.....	16
3. 3. Cultivo de <i>Radopholus similis</i> .....	16
3. 4. Descrição dos tratamentos .....	17
3. 5. Preparo da suspensão de esporos.....	17
3. 6. Inoculação das mudas com fungos endofíticos .....	18
3. 7. Inoculação do material vegetativo com <i>Radopholus similis</i> .....	18
3. 8. Variáveis avaliadas .....	18
3. 9. Delineamento experimental e análises estatísticas .....	19
4. RESULTADOS .....	20
4. 1. Efeito do fungo endofítico <i>Fusarium</i> spp. sobre o biocontrole de <i>Radopholus similis</i> em mudas micropropagadas de bananeira cv. Williams.....	20
4. 2. Efeito do fungo endofítico <i>Fusarium</i> spp. sobre a promoção de crescimento de mudas micropropagadas de bananeira cv. Williams.....	21
4. 3. Efeito do fungo endofítico <i>Trichoderma</i> spp. sobre o biocontrole de <i>Radopholus similis</i> em mudas micropropagadas de bananeira cv. Williams.....	22
4. 4. Efeito do fungo endofítico <i>Trichoderma</i> spp. no crescimento de mudas micropropagadas de bananeira cv. Williams.....	23
5. DISCUSSÃO .....	25
6. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES.....	30
6. 1. Conclusões.....	30
6. 2. Recomendações .....	31
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	32
ANEXOS .....	37

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Origem dos fungos endofíticos identificados, isolados de diferentes cultivares de banana na América Central.....	14
Tabela 2. Efeito do fungo endofítico <i>Fusarium</i> spp. sobre o peso radicular e a população de <i>Radopholus similis</i> em raízes de mudas micropropagadas de bananeira cv. Williams. ....	21
Tabela 3. Efeito do fungo endofítico <i>Fusarium</i> spp. sobre a promoção de crescimento de mudas micropropagadas de bananeira cv. Williams.....	21
Tabela 4. Efeito do fungo endofítico <i>Trichoderma</i> spp. sobre o peso radicular e a população de <i>Radopholus similis</i> em raízes de mudas micropropagadas de bananeira cv. Williams. ....	22
Tabela 5. Efeito do fungo endofítico <i>Trichoderma</i> spp. sobre a promoção de crescimento de mudas micropropagadas de bananeira cv. Williams.....	24

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida do nematóide *Radopholus similis* na bananeira. .... 6

Figura 2. Efeito do biocontrole de *Trichoderma* spp. em raízes de bananeira sobre o nematóide *Radopholus similis*. A) TR= Testemunha; B) T1= inoculação normal; C) T3 = inoculação normal + três re-inoculações. .... 23

## APRESENTAÇÃO

O presente relatório, fruto do Estágio de Conclusão do Curso de Agronomia do CCA/UFSC foi realizado no Centro Agronômico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE) em parceria com International Network for the Improvement of Banana and Plantain (INIBAP), Turrialba - Costa Rica. O estágio foi realizado no período de 5 de Maio à 31 de Julho de 2006, sob supervisão do Dr. Luis E. Pocasangre do CATIE e sob a orientação do Prof. Miguel Pedro Guerra do CCA/UFSC..

O estágio de conclusão de curso permite ao aluno aplicar e aprofundar os conhecimentos acumulados durante o curso de Agronomia, além de desenvolver o amadurecimento e responsabilidade profissional exigidas durante o exercício da carreira de Engenheiro Agrônomo.

A bananicultura brasileira tem avançado muito nos últimos anos, porém muitos aspectos produtivos ainda devem ser melhorados para se obter um sistema de produção economicamente viável, ambientalmente correto e socialmente justo.

Os nematóides constituem-se num dos principais problemas da cultura da banana, principalmente para as cultivares do subgrupo Cavendish. O controle geralmente é realizado com a utilização de nematicidas carbamatos e organofosforados. Este método tem apresentado pouca eficácia devido a problemas de biodegradação, seleção de nematóides resistentes aos produtos aplicados, entre outros.

Recentes pesquisas relatam que o controle biológico de nematóides com a utilização de fungos endofíticos têm apresentado ótimos resultados para o controle de nematóides. Assim, neste trabalho avaliou-se o efeito de re-inoculações de fungos endofíticos (*Fusarium* spp. e *Trichoderma* spp.) da bananeira sobre o biocontrole do nematóide *Radopholus similis*.

Os resultados obtidos pela realização deste trabalho podem constituir-se em valiosas ferramentas para garantir a proteção de mudas micropropagadas ao ataque do nematóide *R. similis* e, conseqüentemente, um melhor e mais rápido desenvolvimento das mudas no campo.

## **DESCRIÇÃO DA INSTITUIÇÃO**

O Centro Agronomico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE) foi fundado em 1973 a partir do Instituto Interamericano de Ciências Agrícolas (IICA) em acordo com o Governo da Costa Rica. Esta instituição apóia os países americanos com suas pesquisas agrícolas e ajuda a capacitar profissionais da área agrônômica, por intermédio de cursos de Pós-graduação.

O ensino e a pesquisa concentram-se nas áreas de Agricultura, Sistemas Agroflorestais e Recursos Naturais e Ambiente destacando a pesquisa e o desenvolvimento de tecnologias limpas para Musáceas, e o manejo e uso sustentável de recursos filogenéticos fomentados pelo INIBAP (International Network for the Improvement of Banana and Plantain), de cujo projeto faz parte este trabalho.

INIBAP é uma rede de serviço de pesquisa e informação com a missão de assegurar o bem-estar dos pequenos produtores de banana e plátano. Assume papel especial de serviço em conservação e distribuição de germoplasma e na compilação e distribuição da metodologia de pesquisa e informações sobre Musa. O INIBAP não conduz suas próprias pesquisas, porém alcança seus objetivos coordenando, orientando e fomentando as pesquisas que seus sócios realizam em todo o mundo.



## RESUMO

O objetivo da presente pesquisa foi avaliar o efeito de fungos endofíticos elite, correspondentes a um isolado de *Trichoderma atroviride* e uma cepa não patogênica de *Fusarium oxysporum* sobre o biocontrole de *Radopholus similis* e seu efeito sobre a promoção de crescimento em mudas de bananeira micropropagadas do cultivar “Williams”. Plantas com seis semanas de crescimento foram inoculadas separadamente com *Trichoderma* e *Fusarium*, respectivamente. A inoculação foi realizada imergindo as raízes numa suspensão de esporos de  $1.5 \times 10^6$  ufc.mL<sup>-1</sup>, por cinco minutos. Essas mudas foram posteriormente transplantadas para potes de 1 litro de capacidade. Depois de 15 dias do transplante as plantas foram inoculadas com 500 nematóides por planta. Os tratamentos avaliados foram: testemunha absoluta, sem fungos endofíticos nem nematóides; testemunha relativa sem fungos endofíticos e com nematóides; a inoculação normal de plantas mediante imersão por 5 minutos e os três tratamentos restantes foram re-inoculações separadas de cada fungo a cada 15 dias. O experimento foi avaliado seis semanas depois da inoculação com nematóides. Os resultados indicaram que *Trichoderma spp* apresentou melhor biocontrole que *Fusarium*. Além disso, tanto para *Fusarium* como para *Trichoderma* o melhor biocontrole foi obtido com três re-inoculações, correspondendo a 69% e 80% de biocontrole respectivamente. Em relação às variáveis de crescimento nenhum fungo afetou o crescimento das plantas.

## RESUMEN

El objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto de reinoculaciones dos hongos endofíticos elite, correspondiente a un aislado de *Trichoderma atroviride* y una cepa no patogénica de *Fusarium oxysporum* sobre el biocontrol de *Radopholus similis* y su efecto sobre la promoción de crecimiento en vitroplantas del cultivar Williams. Plantas con 6 semanas de crecimiento fueron inoculadas separadamente con *Trichoderma* y *Fusarium* respectivamente. La inoculación se realizó inmerciendo las raíces en una suspensión de esporas de  $1.5 \times 10^6$  ufc/ml, por 5 minutos y sembradas en macetas de 1 litro de capacidad. Después de 15 días del transplante, las plantas fueron inoculadas con 500 nematodos por planta. Los tratamientos evaluados fueron: testigo absoluto, sin hongos endofíticos ni nematodos, testigo relativo sin hongos endofíticos con nematodos, la inoculación normal de plantas mediante inmersión por 5 minutos y los tres tratamientos restantes fueron reinoculaciones separadas de los hongos cada 15 días. El experimento fue evaluado 6 semanas después de la inoculación con nematodos. Los resultados indicaron que *Trichoderma* presentó mejor biocontrol que *Fusarium*. Además tanto para *Fusarium* como para *Trichoderma* el mejor biocontrol se obtuvo con 3 reinoculaciones, correspondiendo a 69% y 80% de biocontrol respectivamente. En relación a las variables de crecimiento ningún hongo promovió el crecimiento de las plantas.

## ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effect of re-inoculations of two elite endophytic fungi, one *Trichoderma atroviride* and one non-pathogenic strain of *Fusarium oxysporum*, on biocontrol of *Radopholus similis* and the promotion of growth of micropropagated banana plants, cultivar 'Williams'. Six-week-old plants were inoculated with either *Trichoderma* or *Fusarium* spores. Inoculation was done by dipping roots of plants in a spore suspension of  $1.5 \times 10^6$  cfu/l, for 5 minutes, and planting plants in 1 liter pots. Fifteen days after planting, plants were inoculated with 500 *R. similis* per plant. Evaluated treatments were: absolute control (no endophytic fungi, nor nematodes); relative control (no endophytic fungi, with nematodes); plants inoculated only at planting, and 3 sets of plants re-inoculated once, twice or three times after initial inoculation, at two week intervals. The experiment was evaluated 6 weeks after nematode inoculation. Results indicate that *Trichoderma* has a greater biocontrol effect than *Fusarium*. For both *Trichoderma* and *Fusarium*, the best biocontrol results were obtained with 3 re-inoculations, corresponding to 69% and 80% biocontrol, respectively. None of the fungus affected plant growth.

## 1. INTRODUÇÃO

A Banana (*Musa sp.*) é considerada a fruta símbolo dos países tropicais e de maior cultivo e consumo no mundo, presente na mesa de todas as camadas sociais da população. O Brasil possui a segunda maior produção de banana, sendo responsável por 9,34% da produção mundial. A banana ocupa o segundo lugar em volume de frutas produzidas no Brasil. Em 2004 a produção nacional totalizou 6.593 mil toneladas nos 486 mil hectares cultivados e rendimento médio de 13.571 kg/ha (FAO, 2005).

Os fitonematóides estão entre os principais problemas fitossanitários da bananicultura brasileira. As perdas causadas por tais parasitas podem chegar a 100%, quando o seu controle não é efetuado corretamente. Danos nas raízes e nos rizomas, causados pela invasão de nematóides seguidos por certos fungos e bactérias, são os mais sérios problemas nas variedades do subgrupo Cavendish depois da Sigatoka-negra (COSTA, 2000). Estes nematóides comprometem a absorção e transporte de água e nutrientes pelo sistema radicular, provocam o tombamento de plantas e as predispõem ao ataque de outros microrganismos (DIAS & RIBEIRO JUNIOR, 2001).

Usar variedades resistentes é uma maneira natural e altamente recomendável de controlar pragas e doenças. Contudo, no caso específico de nematóides, são poucas as variedades de banana resistentes disponíveis para os agricultores e, mesmo assim, a resistência geralmente é direcionada a umas poucas espécies de nematóides consideradas mais importantes para determinadas culturas.

O controle químico apresenta vários inconvenientes, como o alto custo dos produtos, os resíduos nos frutos, intoxicação pela exposição aos produtos, contaminações de fontes de água, destruição da microflora do solo (VILAS BOAS *et al.*, 2002) e, em longo prazo, podem favorecer a indução da resistência de nematóides aos nematicidas.

O ambiente do bananal proporciona ótimas condições de umidade, temperatura do solo e fornecimento de nutrientes para o desenvolvimento de fungos, em consequência da manutenção de restos culturais na forma de cobertura morta. Estima-se que a quantidade de matéria depositada em um bananal de 'Prata-Anã' esteja entre 180-200 ton/ha/ano (RODRIGUES *et al.*,

2001), sendo que esse volume tende a permanecer constante durante o período de cultivo, pois à medida que ocorre a decomposição, novos restos culturais são adicionados ao sistema.

Diversos microrganismos têm sido identificados como potenciais agentes de controle biológico, incluindo fungos endofíticos presentes nos tecidos das plantas cultivadas. Fungos endofíticos são aqueles que colonizam o tecido sadio da planta e permanecem ali em uma fase latente ou iniciam infecções mais extensivas, porém assintomáticas (YATES *et al.*, 1997), sem causar problemas à planta.

Pesquisas realizadas no Centro Agronômico Tropical de Investigación y Enseñansa (CATIE) apresentaram ótimos resultados sobre o controle biológico de nematóides com a utilização de fungos endofíticos. Isolados endofíticos foram capazes de reduzir populações de nematóides em plantas de banana avaliadas em casa de vegetação (SOTO, 2003; NIERE 2001). Bioensaios demonstraram que plantas protegidas com cepas de *Fusarium* e *Trichoderma* endofíticos apresentaram reduções de até 88% sobre a população final de *R. similis* (CAÑIZARES, 2003).

Pocasangre *et al.* (2000a) encontraram 132 fungos endofíticos em amostras de raízes e rizomas de bananeira. Fungos endofíticos obtidos de plantações comerciais da Guatemala foram avaliados, observando-se que plântulas de banana que haviam sido inoculadas com esses fungos tiveram uma redução direta em populações de nematóides (ZUM FELDE, 2002). Trabalhos realizados em condições de campo também relataram reduções significativas do número de nematóides e promoveram o crescimento de plantas em cultivos comerciais de banana na Costa Rica (MENJIVAR, 2005).

Atualmente, muitas plantações comerciais utilizam plantas micropropagadas como uma alternativa de proteção ao cultivo. A proteção de plantas micropropagadas mediante a utilização de fungos endofíticos que tenham atividade antagonista contra nematóides consiste em uma ferramenta importante para o melhoramento biológico de mudas de bananeira.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a utilização de fungos endofíticos como potenciais biocontroladores do nematóide *R. similis*.

## **1. 1. Objetivos**

### **1. 1. 1. Geral**

Avaliar a influência de re-inoculações de fungos endofíticos *Fusarium* spp. e *Trichoderma* spp. no biocontrole do nematóide *Radopholus similis* e o crescimento de mudas de bananeira cv. Williams.

### **1. 1. 2. Específicos**

- Determinar a eficácia da utilização destes fungos como agentes para o controle biológico do nematóide *Radopholus similis*;
- Avaliar a influência de re-inoculações dos fungos sobre o desenvolvimento das plantas e sobre o desenvolvimento do nematóide.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os nematóides são um grupo de organismos multicelulares diferenciados dos invertebrados que, em geral, se classificam como uma classe do reino animal e que possuem adaptação a uma grande variedade de ecossistemas (CHRISTIE, 1986). Foram descritas aproximadamente 146 espécies de nematóides parasitas associados às *Musas*, distribuídas em 43 gêneros (ARAYA & CENTENO, 1995; LUC *et al.*, 1990).

Dentre as espécies de nematóides, *Radopholus similis* e *Meloidogyne* spp. se destacam pelos danos causados e pela ampla distribuição nas principais regiões produtoras de banana no mundo. No Brasil, diversas espécies têm sido identificadas. Entretanto, apenas *R. similis* é tida como de maior importância econômica, sendo o nematóide que causa mais prejuízo em bananais no Brasil e no mundo. No território brasileiro, o nematóide cavernícola *R. similis* tem causado prejuízos não somente no estado de São Paulo, como também no Rio de Janeiro e demais regiões do país onde ocorreu a expansão da cultura (COSTA, 2000). No entanto, as espécies de nematóides predominantes diferem nas diferentes regiões produtoras de banana.

Em levantamento realizado no Norte de Minas Gerais, Dias & Ribeiro Junior (2001) detectaram as espécies *Radopholus similis* (Cobb) Thorne, *Helicotylenchus multicinctus* (Cobb) Golden, *Pratylenchus coffear* (Zimmermann) Filipjev & Stekhoven, *Rotylenchukus reniformis* Linford & Oliveira e *Meloidogyne* spp. Goeldi, as quais são citadas na literatura como as principais espécies patogênicas à bananeira.

Em amostras coletadas de bananais nos estados brasileiros de Minas Gerais, São Paulo, Ceará e Pernambuco por Souza *et al.* (1999), foram identificadas 90,7% das amostras infestadas por *Helicotylenchus* spp; 75,9% infestadas por *Meloidogyne* spp e 11,2% infestadas por *R. similis*. Cavalcante *et al.* (2002) identificaram um total de sete fitonematóides nas amostras de solo na área experimental da Embrapa Acre, com destaque para as espécies do nematóide espiralado *Helicotylenchus multicinctus* e *H. dihystra*. O autor informa ainda que na atualidade, *Meloidogyne* spp. é de alto poder destrutivo em relação à bananeira, especialmente no Estado de Pernambuco e Piauí.

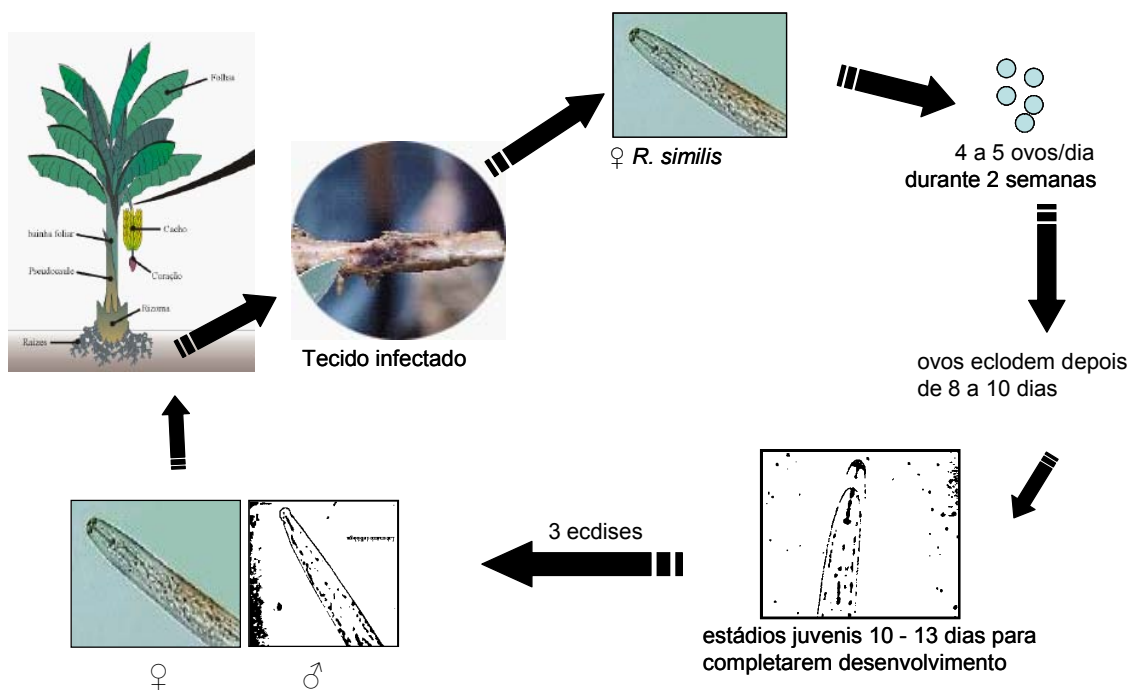
As perdas provocadas por *R. similis* podem ser totais entre as bananeiras do subgrupo Cavendish (COSTA, 2000). *R. similis* causa severos danos especialmente em solos arenosos, onde as perdas em produção atingiram até 100%. Os solos arenosos, associados às altas temperaturas provavelmente favoreceram a rápida multiplicação do nematóide. A monocultura de bananeira cv. Prata-anã mostrou tolerância ao nematóide e substituiu rapidamente as cultivares utilizadas no Vale do Ribeira. Entretanto, em poucos anos, a maioria dos bananais desta cultivar localizados na região encontra-se com níveis altos de infestação sendo necessária, em alguns casos, a eliminação completa dos mesmos (COSTA, 2000).

## **2. 1. Biologia e danos causados pelo nematóide cavernícola da bananeira *Radopholus similis***

*Radopholus similis* é vulgarmente chamado de nematóide cavernícola, devido ao sintoma que ele causa no córtex das raízes e rizoma de bananeiras em virtude da ação do endoparasitismo migratório.

Esta espécie apresenta-se vermiforme tanto no estágio juvenil como no adulto. O ciclo de vida tem duração de três a quatro semanas (Figura 1). No tecido infectado, as fêmeas ovipositam de 4 a 5 vezes por dia durante duas semanas. Os ovos eclodem depois de 8 a 10 dias e os estádios juvenis requerem entre 10 e 13 dias para completarem seu desenvolvimento depois de três ecdises subseqüentes, originando os adultos machos e fêmeas (MARIN *et al.*, 2002). As fêmeas juvenis e adultas possuem formas móveis que podem deixar a raiz em casos de condições adversas. Os nematóides nos estádios migratórios no solo podem facilmente invadir raízes sadias. É marcante o dimorfismo sexual entre essas espécies. O macho apresenta o aparelho digestivo degenerado, estilete atrofiado e não é considerado parasita. As fêmeas são providas de forte estilete e esôfago completo. A reprodução se dá por anfimixia, podendo ocorrer, excepcionalmente, partenogênese (COSTA, 2000).





**Figura 1.** Ciclo de vida do nematóide *Radopholus similis* na bananeira.

Os danos causados nas raízes e no rizoma são atribuídos às formas juvenis e às fêmeas de *R. similis*. A penetração dos nematóides ocorre preferencialmente pelo ápice radicular, entretanto *R. similis* pode invadir qualquer porção da raiz. Ao migrar inter- e intracelularmente, se alimenta do citoplasma de células do parênquima cortical, destruindo paredes celulares, extravasando o conteúdo celular e causando cavidades e túneis que necrosam e podem estender-se por toda a região parenquimática. Este problema é agravado pelo movimento contínuo do nematóide no tecido, cuja consequência é a formação de extensas áreas necróticas de coloração avermelhada infectada com todos os estádios do nematóide. Quando ocorre alta infestação, a espécie *R. similis* provoca rachaduras ao longo das raízes, facilitando a penetração de patógenos secundários (os mais comuns são *Cylindrocarpon musae*, *Acremonium stromaticum* e o agente causal do mal-do-panamá, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*) (SARAH *et al.*, 1996). A presença de fungos nas lesões provavelmente aumenta a deterioração da raiz e contribui para a queda das plantas. Os nematóides microvíboros também são abundantes nos tecidos que estão em processo de desintegração (MARIN *et al.*, 2002). O nematóide migra para os tecidos saudáveis antes que os tecidos

atacados sofram necrose ou simplesmente sai para o solo em busca de outra raiz para infectar e da qual alimentar-se (FERNANDEZ, 1994).

Em consequência do ataque de nematóides, quando a infestação é severa, ocorre a formação de raízes secundárias, resultando num sistema radicular muito raquítico que não suporta o peso do cacho e a planta cai. Além disso, o sistema radicular apodrece facilmente e as plantas não absorvem água e nutrientes do solo de forma adequada, reduzindo o seu tempo de vida; crescem menos, mostrando-se amareladas, com menos produção e frutos pequenos. São freqüentes os casos de tombamento de plantas pela ação do vento ou pelo peso do próprio cacho.

Em geral, os danos de fitonematóides em cultivos de bananeira são diretamente proporcionais ao aumento de suas populações, ocorrendo redução do tamanho, peso e atraso na maturação dos cachos, pouco perfilhamento e morte das plantas. Outro fator endógeno que afeta a dinâmica populacional é a presença de variações patogênicas dentro das espécies (COSTA *et al.*, 1998).

A dispersão do nematóide cavernícola se processa principalmente por meio de material propagativo. Outras formas de disseminação são os implementos agrícolas contaminados, o trânsito de trabalhadores e animais, o escoamento de água em áreas de declive e as águas de irrigação.

## **2. 2. Controle químico de nematóides da bananeira.**

Para redução da população de fitonematóides existem vários métodos de controle, sendo que, durante a condução do bananal, o método mais empregado é o químico, utilizando principalmente nematicidas organofosforados e carbamatos. No entanto, este método apresenta custo alto e uma série de desvantagens com relação à contaminação do meio ambiente e humana.

As diferentes formulações dos nematicidas atuam de maneira diferente sobre o controle das espécies de nematóides presentes no solo. Os nematicidas atuam com maior eficácia sobre nematóides endoparasitas sedentários, como *Meloidogyne* spp, que possuem uma longa fase no solo do que endoparasitas migratórios como *R. similis*, o qual vive e completa seu ciclo

de vida em raízes de banana (ARAYA & LAKHI, 2004). Sendo assim, sua utilização dificilmente alcançará um controle eficiente sobre todas as espécies. À medida que determinada formulação de nematicida controla uma determinada espécie de nematóide, outras espécies encontradas em nível populacional baixo poderão se reproduzir rapidamente passando a causar prejuízos à cultura, efeito que até então não era evidenciado devido à competição entre as diferentes espécies de nematóides.

Depois de aplicações consecutivas dos nematicidas na superfície do solo ocorre um decréscimo no controle de nematóides. No entanto, depois de um curto período de tempo ocorre a retomada da reprodução dos patógenos. A população de *R. similis* voltou a crescer após aplicações sucessivas de nematicidas aldicarb, fenamifos, izazofos, carbofuran e cadusafos (STANTON & PATTISON, 2000), o que pode representar um grande problema ao longo do tempo, já que esta situação pode favorecer a seleção de nematóides resistentes à nematicidas. A perda da eficiência dos nematicidas com o tempo, é devida a aceleração natural da bio degradação dos nematicidas após o uso repetido das mesmas formulações (ARAYA E LAKHI, 2004).

No solo, os nematicidas são degradados por microorganismos lentamente em compostos não nematóxicos (JOHNSON, 1998). No entanto, depois de aplicações repetitivas do nematicida, os microorganismos do solo podem degradá-lo rapidamente, decrescendo a persistência e eficácia do produto. Racke & Coats (1988) encontraram  $0,5 \times 10^5$  microorganismos degradadores de carbofuran.g<sup>-1</sup> de solo sem histórico de aplicação deste produto, enquanto que este número incrementou para  $7,4 \times 10^5$ .g<sup>-1</sup> de solo regularmente exposto a este nematicida. Estes autores sugerem ainda que o aumento da biodegradação de inseticidas exibe um alto grau de especificidade, onde somente um determinado grupo de microorganismos possuem as enzimas específicas responsáveis pela hidrólise de determinado composto químico. Patisson *et al.* (2000), verificaram que os organismos responsáveis pelo aumento da biodegradação de fenamiphos no solo não causou aumento da biodegradação de cadusafos.

O aumento da degradação de terbufos (PATTISON & VERSTEEG, 2000), fenamiphos (MOENS *et al.*, 2004; PATTISON *et al.*, 2000), carbofuran e ethoprop (MOENS *et al.*, 2004) tem sido relatado em plantações de banana.

Moens *et al.* (2004) também verificaram que o efeito do nematicida foi claramente reduzido com a contínua aplicação de Furadan®, Mocap®, Rugby® e Nematicur®, devido ao aumento da biodegradação com a aplicação desses nematicidas. Mas no caso do nematicida Rugby® alto número de nematóides e baixa percentagem de raízes funcionais refletiram na perda do controle dos nematóides. No entanto, nenhum aumento na biodegradação do produto foi detectada.

Além disso, Read (1987) observou que fungos também podem degradar nematicida aldicarb, porém com menor eficiência quando comparado à bactérias. Entretanto, em altas concentrações este nematicida atuou como fungicida, inibindo o crescimento dos fungos.

Na procura por métodos não químicos, pesquisas vêm sendo realizadas visando à utilização do controle biológico com o uso de inimigos naturais.

## **2. 3. Utilização de microorganismos para biocontrole de nematóides da bananeira**

### **2. 3. 1. Fungos nematófagos**

Uma alternativa promissora para o controle de nematóides é a utilização de fungos “caçadores” de nematóides pertencentes a diversos gêneros. Estes organismos oferecem várias vantagens para serem empregados visando o controle biológico de nematóides (LOPEZ *et al.*, 2000):

- São capazes de eliminar um amplo número de espécies de nematóides já que desenvolvem estruturas ou órgãos de captura (anéis contráteis ou não, redes, estruturas adesivas, etc) especializados para capturar os parasitas em movimento. Isto resulta em grande vantagem visto que o controle se realiza antes que o nematóide penetre a raiz e provoque dano;
- Possuem duas fases: 1) fase saprofítica em que empregam como fonte de carbono (energia) e aminoácidos (nitrogênio) a matéria orgânica do solo e 2) uma fase parasítica na qual se nutrem somente do corpo dos

nematóides capturados (PERSSON & JANSSON, 1997). Foi comprovado que na presença de nematóides os fungos são capazes de passar rapidamente da fase saprofítica à parasítica. Além disso, a presença de nematóides provoca a germinação dos esporos e o desenvolvimento dos órgãos de captura;

- Produzem substâncias atrativas que aumentam a efetividade do controle dos parasitas;
- Alguns produzem grande quantidade de esporos de resistência.

A grande maioria dos fungos nematófagos isolados e/ou testados para o controle de *Heterodera glycines* Ichinohe e *Meloidogyne* spp. é do tipo oportunista (FREITAS *et al.*, 1999). A habilidade dos fungos nematófagos em colonizar a rizosfera tem sido apontada como uma característica importante de um agente de biocontrole (MAIA *et al.*, 2001).

Ribeiro *et al.* (1999) avaliaram a capacidade predatória de 59 isolados de *Monacrosporium* spp. frente a *M. javanica* e *H. glycines*. Esses autores observaram que a predação de juvenis de *M. javanica* variou de 71 a 100% para 27 isolados, enquanto, para *H. glycines*, 26 isolados não exerceram qualquer predação. Os outros 33 isolados exibiram máxima predação de apenas 1,2% de juvenis desse nematóide.

O fungo *Paecilomyces lilacinus* apresenta bom potencial como agente de controle biológico do nematóide da galha *M. incógnita* em bananeiras (JONATHAN & RAJENDRAN, 2001). O Controle se dá pela penetração do micélio do fundo e seus esporos nos ovos dispostos dentro da matriz de ovos das fêmeas adultas (JATALA *et al.*, 1979). Os filtrados deste fungo possuem efeito tóxico neurotrópico sobre adultos de *Meloidogyne* spp. (DEVRAJAN & SEENIVASAN, 2002). Este fungo também foi eficiente no controle de *R. similis* (DEVRAJAN & RAJENDRAN, 2001). Comparando o efeito do controle químico de nematóides com a utilização de carbofuran (40 g/planta) e o controle biológico com a utilização do fungo *P. lilacinus*, Devrajan & Rajendran (2001) verificaram que o controle químico efetivo foi obtido 150 dias após a aplicação (129 nematóides/5g de raiz). Nesse estágio a efetividade e *P. lilacinus* (30 g/kg de solo aos 60 dias após o plantio) foi muito boa (143,3 nematóides/ 5 g de raiz), quase comparável ao carbofuran.

### **2. 3. 2. Fungos micorrizicos arbusculares**

Estudos mostram que as reduções de crescimento, conseqüentes da infecção por nematóides têm sido menores em plantas colonizadas por fungos micorrizicos arbusculares comparadas às não micorrizadas, afetando a reprodução dos nematóides, reduzindo em muitos casos a ovoposição e o número de indivíduos no sistema radicular de plantas infectadas (COFCEWICZ *et al.*, 2001). No entanto, tem sido observada variabilidade na interação de fungos micorrizicos arbusculares e fitonematóides, indicando que a associação hospedeiro–nematóide-fungo micorrizico arbuscular é bastante específica e que alterações em um dos componentes podem levar à diversidade de resultados.

O efeito dos fungos micorrizicos arbusculares sobre a reprodução de nematóides tem sido apontado como dependente de um elevado percentual de colonização da raiz por esses organismos. Saleh & Sikora (1984) observaram que somente onde a colonização radicular foi maior que 54% se obteve efeito sobre a reprodução de *M. incógnita*. Da mesma forma, tem-se observado que o nível da população do nematóide afeta negativamente a colonização e reprodução de fungos micorrizicos. Redução na colonização radicular e na reprodução de fungos micorrizicos arbusculares causadas por *Pratylenchus vulnus* Allen & Jensen, com possíveis efeitos sobre a absorção de fósforo e outros nutrientes, foram observadas por Pinochet *et al* (1998). Segundo Smith (1987), o aumento da tolerância de fitonematóides verificado em plantas de tomateiro micorrizadas resulta de um aumento na absorção de fósforo. Cofcewicz *et al.* (2001) verificaram que a inoculação de plantas de tomateiro com os fungos micorrizicos arbusculares não foi eficiente, promovendo um incremento no número de ovos e juvenis por grama de raiz. Os autores sugeriram que raízes micorrizadas podem atrair um maior número de juvenis infectivos do que as raízes não micorrizadas, pela maior liberação de exudatos, determinando uma maior eclosão de ovos.

A colonização pelos fungos micorrizicos arbusculares pode aumentar o desenvolvimento do sistema radicular, resultando em um maior número de

sítios de penetração e maior sobrevivência pós-penetração dos juvenis. Além disso, fêmeas adultas podem produzir maior número de ovos sobre plantas micorrizadas, normalmente mais vigorosas.

### **2. 3. 3. Fungos endofíticos**

Fungos endofíticos são aqueles que colonizam o tecido sadio da planta e permanecem ali em uma fase latente ou iniciam infecções mais extensivas, porém assintomáticas (YATES *et al.*, 1997), desenvolvendo-se em tecidos vegetais sem causar problemas à planta. Quando a colonização leva a uma proteção do tecido da planta ao estresse biótico ou abiótico, estes fungos são chamados de mutualistas (LATCH, 1993). Fungos endofíticos isolados das mesmas plantações comerciais de Guatemala foram avaliados em um bioensaio, onde se encontrou que plântulas de banana que haviam sido inoculadas com fungos endofíticos tiveram uma redução direta em populações de nematóides (ZUM FELDE, 2002).

Os fungos endofíticos incidem em condições específicas e se encontram em microclimas e condições fisiológicas distintas. Os seguintes gêneros têm sido identificados em condições tropicais como controladores de patógenos de solo: *Acremonium*, *Anthostomella*, *Chrysosporium*, *Cladoporium*, *Clypeopycni*, *Colletotricum*, *Coniothyrium*, *Cryptocline*, *Lasiodiplodia*, *Libertella*, *Nodilosporium*, *Phaeosphaeria*, *Phialophora*, *Poma*, *Phomatospora*, *Phomopsis filiciana*, *Scopulariopsis*, *Verticillium*, *Xylaria* (PETRINI *et al.*, 1992).

Alguns isolados de *Fusarium* spp. se encontram na bananeira como fungos endofíticos naturais e têm sido detectados em raízes de diferentes cultivares de banana em vários países demonstrando potencial como agentes de controle biológico para o manejo de nematóides parasitas de plantas (SPEIJER, 1993; AMIN, 1994; SCHUSTER *et al.*, 1995). Vu *et al.*, (2004) verificaram que após dois dias da inoculação do fungo endofítico de bananeira *Fusarium oxysporum*, a atividade do nematóide *R. similis* decresceu significativamente (20 a 24%) quando comparado ao controle. Metabólitos tóxicos produzidos por *Fusarium* endofítico não patogênico foram reportados como potencial agente da redução da atividade de *M. incognica* (HALLMANN & SIKORA, 1996).

Da mesma maneira, outros estudos revelaram que isolados endofíticos possuem um papel importante para reduzir populações de nematóides em plantas de banana avaliadas em casa de vegetação (SOTO, 2003; NIERE, 2001).

Pocasangre *et al.* (2000a) encontraram 132 fungos endofíticos em amostras de raízes e rizomas de bananeira. A frequência de ocorrência dos fungos endofíticos foi maior nas raízes (Tabela 1). Os fungos endofíticos encontrados com maior frequência foram cepas de *Fusarium*. Este fungo foi localizado em bananeiras de oito localidades e em diferentes cultivares de banana e apresentaram diferentes graus de controle do nematóide *R. similis*. Esta diferença na habilidade de controle do nematóide foi sugerida por Pocasangre *et al.* (2000a) devido à habilidade dos fungos crescerem extensamente dentro da planta e logo impedir a penetração dos nematóides nas raízes.



**Tabela 1.** Origem dos fungos endofíticos identificados, isolados de diferentes cultivares de banana na América Central.

<b>Código</b>	<b>Gênero do fungo</b>	<b>Cultivar/Genoma</b>	<b>Tecido/ Local encontrado</b>
<b>Honduras (H)</b>			
H-06	<i>Fusarium</i> spp.	Cavendish Gigante (AAA)	cilindro central Coleção de FHIA
H-07	<i>Fusarium</i> spp.	Lacatan (AAA)	raízes Coleção de FHIA
H-12	<i>Fusarium</i> spp.	Cavendish (AAA)	raízes Coleção de FHIA
H-14*	<i>Fusarium</i> spp.	Cavendish (AAA)	raízes Coleção de FHIA
H-15	<i>Trichoderma</i> sp.	Cavendish (AAA)	cilindro central Coleção de FHIA
H-19*	<i>Fusarium</i> spp.	Bluggoe (ABB)	raízes Coleção de FHIA
H-20*	<i>Fusarium</i> spp.	Cavendish Enano (AAA)	raízes Coleção de FHIA
H-26*	<i>Fusarium</i> spp.	Ney Poovan (AB)	raízes Coleção de FHIA
H-31	<i>Verticillium</i> spp.	P.J. Buaya (AA)	córtex Coleção de FHIA
H-35	<i>Fusarium</i> spp.	Gran Enano (AAA)	raízes Dole, Rosario
H-36	<i>Fusarium</i> spp.	Gran Enano (AAA)	córtex Dole, Rosario
H-37	<i>Acremonium</i> spp.	Gran Enano (AAA)	córtex Dole, Rosario
H-39	<i>Fusarium</i> spp.	Gran Enano (AAA)	raízes Dole, La Ceiba
H-42	<i>Fusarium</i> spp.	Gran Enano (AAA)	córtex Dole, La Ceiba
H-43	<i>Fusarium</i> spp.	Gran Enano (AAA)	córtex Dole, La Ceiba
<b>Costa Rica (CR)</b>			
CR-01	<i>Fusarium</i> spp.	Gran Enano (AAA)	raízes CATIE, Turrialba
CR-04	<i>Fusarium</i> spp.	Gran Enano (AAA)	raízes CATIE, Turrialba
CR-09	<i>Fusarium</i> spp.	Gran Enano (AAA)	raízes EARTH, Guacimo
CR-10	<i>Fusarium</i> spp.	Gran Enano (AAA)	raízes EARTH, Guacimo
CR-19	<i>Fusarium</i> spp.	Gran Enano (AAA)	córtex EARTH, Guacimo
CR-21	<i>Acremonium</i> spp.	Gran Enano (AAA)	córtex EARTH, Guacimo
<b>Guatemala (G)</b>			
G-01	<i>Fusarium</i> spp.	Gran Enano (AAA)	raízes Tiquizate
G-05	<i>Verticillium</i> spp.	Gran Enano (AAA)	raízes Tiquizate
G-08	<i>Fusarium</i> spp.	Gran Enano (AAA)	córtex Tiquizate
G-11	<i>Fusarium</i> spp.	Gran Enano (AAA)	córtex Tiquizate
G-12	<i>Fusarium</i> spp.	Gran Enano (AAA)	cortex Tiquizate
<b>Cuba (C)</b>			
C-03	<i>Fusarium</i> spp.	FHIA-01 (AAB)	raízes IBP, Remedios
C-09	<i>Fusarium</i> spp.	FHIA-03 (AABB)	raízes IBP, Antillas
C-13*	<i>Fusarium</i> spp.	FHIA-03 (AABB)	raízes IBP, Antillas
C-20	<i>Fusarium</i> spp.	FHIA-03 (AABB)	raízes IBP, Remedios
C-22	<i>Fusarium</i> spp.	FHIA-03 (AABB)	raízes IBP, Remedios
C-35	<i>Fusarium</i> spp.	FHIA-21 (AAB)	raízes IBP, Remedios
C-39	<i>Fusarium</i> spp.	Gros Michel (AAA)	raízes IBP, Remedios
C-48	<i>Fusarium</i> spp.	FHIA-21 (AAB)	raízes IBP, Remedios
C-49	<i>Fusarium</i> spp.	FHIA-21 (AAB)	raízes IBP, Remedios

\* Fungos endofíticos eficientes, que causaram redução na quantidade de *R. similis*/g de raiz superior a 80 % em relação à testemunha.

Fonte: Pocasangre *et al.*, 2000a.

Os fungos endofíticos podem alterar a fisiologia da planta, em sua morfologia e função, levando-as a aumentar seu crescimento e podem incrementar a resistência ao estresse causado por fatores abióticos (SIKORA, 1992; POCASANGRE, 2004). A infecção por estes fungos estimula a produção de exsudados pela raiz. Estes exsudados podem produzir efeitos alelopáticos

(em condições de estresse biótico) e a quelação de íons metais (em condições de estresse abiótico), afetando assim o seqüestro e disponibilidade iônica (MALINOWSKI & BELESKY, 2000).

Meneses (2003) estudou os mecanismos de parasitismo de fungos endofíticos dos gêneros *Fusarium* e *Trichoderma* sobre o nematóide *R. similis*. No caso de alguns fungos do gênero *Fusarium* observou que muitos isolados produziram substâncias metabólicas que digeriam o tecido do nematóide. No caso de *Trichoderma*, a ação parasítica observada foi unicamente mecânica. Oito horas depois do primeiro contato do fungo endofítico com o nematóides *R. similis* ocorreu a adesão dos esporos no corpo no nematóide, germinando posteriormente e apresentaram um envolvimento do nematóide por uma massa de hifas, fazendo com que nematóides permanecessem íntegros, porém mostrando-se imóveis pelo envolvimento das hifas.

A eficácia limitada dos nematicidas exige uma tomada de medidas diferenciadas para se efetuar um controle satisfatório dos nematóides da bananeira. A utilização de fungos nematófagos tem apresentado bons resultados sobre os nematóides presentes no solo. Entretanto, estes fungos não conseguem atuar sobre os nematóides presentes nas raízes infectadas. Os fungos endofíticos atuam impedindo o desenvolvimento e reprodução dos nematóides nas raízes da bananeira. Desta forma, garantem que, mesmo com a existência de uma determinada população de nematóides no solo, estes não causem danos às raízes, favorecendo o sucesso da cultura.

Atualmente, muitas plantações comerciais utilizam plantas micropropagadas como uma alternativa de proteção ao cultivo, por se tratar de um material livre de doenças e pragas. Ao serem produzidas *in vitro*, estas plantas são isentas também de antagonistas e por isso tem apresentado maior suscetibilidade a nematóides e ao Mal-do-panamá, em comparação com material de propagação convencional que estão colonizados com antagonistas naturais. Assim, a proteção de plantas micropropagadas mediante a utilização de fungos endofíticos que tenham atividade antagonista contra nematóides consiste em uma ferramenta importante para o melhoramento biológico de mudas de bananeira (POCASANGRE *et al.*, 2000b; SCHUSTER *et al.*, 1995).

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

Este experimento foi realizado para determinar a redução da incidência do nematóide cavernícola da bananeira *Radopholus similis* em mudas micropropagadas inoculadas com fungos endofíticos. O experimento foi conduzido no Centro Agronômico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), Turrialba, Costa Rica, no período de Maio à Julho de 2006.

#### **3. 1. Material experimental**

O material vegetativo consiste de mudas de banana cv. Williams (AAA) oriundas de micropropagação, medindo entre 10 e 12 cm de altura. Foram utilizados isolados de fungos endofíticos do gênero *Trichoderma* e *Fusarium* provenientes de solos supressivos de bananais situados na Zona Atlântica da Costa Rica, de atividade biocontroladora conhecida contra *Radopholus similis*.

#### **3. 2. Cultivo de Fungos endofíticos**

Os fungos endofíticos *Fusarium* spp. e *Trichoderma* spp. foram cultivados em meio de cultura "Potato Dextrose agar" (PDA) 100%. As culturas foram armazenadas em incubadora a 27 ° C de temperatura. Após 10 dias de cultivo, as culturas foram utilizadas para preparar a suspensão de esporos para inoculação das plantas. Uma placa de cada fungo foi reservada para multiplicação dos fungos endofíticos utilizados para as re-inoculações posteriores. A multiplicação foi realizada retirando discos de 1 cm de diâmetro submetida às mesmas condições descritas acima.

#### **3. 3. Cultivo de *Radopholus similis***

Os nematóides foram multiplicados em discos de cenoura, sobre placas de Petri, mantidas em câmara de crescimento a 25°C. Após 18 dias de cultivo, foi preparada a suspensão de nematóides utilizada para a inoculação das plantas. Os pedaços de cenoura foram picados e lavados com água destilada, assim como as placas de Petri sobre peneiras nº 500 (25 µm) para extração dos nematóides. O conteúdo da peneira (nematóides) foi vertido em frasco com volume ajustado para 80 mL. Deste volume foram retiradas duas alíquotas de 2

mL que foram inseridas em câmaras de contagem e levadas ao microscópio para a determinação do número de nematóides na suspensão. A concentração de nematóides na suspensão foi ajustado para 100 nematóides por mL de suspensão (como descrito no item 3.7.).

### **3. 4. Descrição dos tratamentos**

Foram avaliados seis tratamentos para cada fungo endofítico utilizado: TA = testemunha absoluta, sem inoculação de nematóides e sem inoculação de fungos endofíticos; TR = Testemunha relativa = com inoculação de nematóides e sem fungos endofíticos; T1 = procedimento normal (inoculação de nematóides e de fungos endofíticos); T2 = procedimento normal mais uma re-inoculação dos fungos endofíticos; T3 = procedimento normal mais duas re-inoculações de fungos endofíticos; T4 = procedimento normal mais três re-inoculações de fungos endofíticos, como mostra o quadro abaixo:

<b>TRATAMENTOS</b>	<b>DESCRIÇÃO</b>
Testemunha absoluto (TA)	Sem fungos endofíticos e sem nematóides
Testemunha relativo (TR)	Sem fungos endofíticos e com nematóides
T1	Inoculação normal
T2	Inoculação normal + 1 re-inoculação
T3	Inoculação normal + 2 re-inoculações
T4	Inoculação normal + 3 re-inoculações

As plantas foram inicialmente mantidas em bandejas plásticas para permitir uma melhor manipulação do material no momento da inoculação com fungos endofíticos.

### **3. 5. Preparo da suspensão de esporos**

Sob condições assépticas, foram adicionados 25 mL de água destilada esterilizada ao meio de cultivo colonizado com os fungos para a remoção dos esporos. Sobre a superfície do meio de cultivo deslizou-se uma espátula de 3 cm de largura de bordos arredondados para facilitar a raspagem do micélio. A solução obtida foi filtrada por uma gase e decantada em um Becker de 250 mL a fim de obter a suspensão de esporos. De cada solução resultante foi efetuado a contagem dos esporos utilizando um hematocímetro de Neubauer

para estimar a concentração de esporos, ajustando a solução final para a concentração de  $1,5 \times 10^6$  esporos.mL<sup>-1</sup>.

### **3. 6. Inoculação das mudas com fungos endofíticos**

As suspensões de  $1,5 \times 10^6$  esporos.mL<sup>-1</sup> de cada isolado dos fungos endofíticos foram acondicionadas em bandejas onde foram submersas as raízes das plantas por cinco minutos. Posteriormente, as plantas foram transplantadas em vasos de polietileno, contendo substrato úmido constituído por uma mistura de areia e terra na proporção 1:1, previamente esterilizado. As plantas foram mantidas em casa de vegetação e irrigadas diariamente.

As re-inoculações foram realizadas a cada 15 dias de cultivo, injetando-se  $1,5 \times 10^6$  esporos.mL<sup>-1</sup> dos fungos endofíticos ao substrato próximo à porção radicular da planta, nos respectivos tratamentos.

### **3. 7. Inoculação do material vegetativo com *Radopholus similis*.**

Após 15 dias de cultivo, foi realizada a inoculação das plantas com 500 nematóides *Radopholus similis* por planta. Foram realizadas cinco perfurações no substrato localizado ao redor da área radicular da planta onde foram inoculados os nematóides, utilizando micropipeta calibrada, através da aplicação de 5 mL por planta de suspensão de nematóides agitada continuamente,.

### **3. 8. Variáveis avaliadas**

O efeito de re-inoculações de fungos endofíticos sobre o desenvolvimento das plantas e sobre o controle de *Radopholus similis* em casa de vegetação foi realizado avaliando-se características de crescimento e de biocontrole, respectivamente. As características de crescimento avaliadas foram: número de raízes, peso radicular, peso foliar e peso total. Enquanto que o biocontrole foi avaliado pela contagem do número de nematóides/planta, obtidas após 8 semanas do início do experimento.

A determinação do número e peso de raízes e peso da parte aérea foi efetuada após uma série de procedimentos. Primeiro foi realizada a lavagem

rigorosa de todas as raízes em água corrente, com muito cuidado para evitar o desprendimento e perda dos pêlos radiculares. Em seguida, as raízes foram mantidas sobre papel toalha para retirar o excesso de umidade. Com a utilização de um bisturi, foram destacadas e contadas as raízes seguindo da pesagem desse material e também da parte aérea. As raízes foram acondicionadas em frascos plásticos devidamente rotulados contendo água, a fim de manter os tecidos túrgidos para garantir a adequada extração dos nematóides.

As raízes de cada planta foram trituradas em liquidificador por 10 segundos em baixa velocidade de rotação e mais cinco segundos em alta velocidade. Em seguida, as raízes maceradas foram vertidas em um jogo de peneiras de Mesch nº50, nº 100 e nº 500 sobrepostas. As raízes maceradas foram lavadas por dois minutos sobre a peneira nº50. O conteúdo resultante na peneira nº 100 foi lavado por mais um minuto e, posteriormente, o conteúdo (nematóides) resultante na peneira nº 500 foi cuidadosamente armazenado em recipientes plásticos adicionados de 150 mL de água. De cada recipiente foram retiradas alíquotas de 2 mL e depositadas em câmara de contagem e levadas ao microscópio para a contagem dos nematóides. Foram contados os nematóides de duas alíquotas de cada frasco e em seguida, calculada a média do número de nematóides para cada frasco, estimando o número total de nematóides por planta. Os resultados da contagem de nematóides foram transformados utilizando  $\ln(x + 1)$  antes de realizar a análise estatística.

### **3. 9. Delineamento experimental e análises estatísticas**

Foram realizados experimentos simultâneos para *Fusarium* spp. e *Trichoderma* spp. endofítico, utilizando tratamentos testemunha absoluto e relativo para cada fungo endofítico.

Os dados de cada variável avaliada foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste Duncan a 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico SAS. Os resultados da contagem de nematóides foram transformados, utilizando  $\ln(x + 1)$ , antes da realização da análise estatística.

## 4. RESULTADOS

### 4. 1. Efeito do fungo endofítico *Fusarium* spp. sobre o biocontrole de *Radopholus similis* em mudas micropropagadas de bananeira cv. Williams.

As plantas inoculadas com o fungo endofítico *Fusarium* spp. não patogênico apresentaram reduções significativas ( $P \leq 0,05$ ) da população final de *R. similis* no sistema radicular das plantas, entre tratamentos (Tabela 2). Os tratamentos T3 e T4 diferiram significativamente em relação ao tratamento testemunha (TR), evidenciando que a partir de duas re-inoculações do nematóide ocorreram reduções significativas na população final.

A percentagem de redução da população de *R. similis* nas plantas protegidas com uma inoculação normal foi de 14%, chegando a 36% e 69% naquelas onde foi realizado mais duas e três re-inoculações de *Fusarium* spp, respectivamente. A taxa média de reprodução do nematóide *R. similis* (TR) nas plantas não protegidas com o fungo endofítico foi de 2,15, o que equivale a uma população duas vezes maior que a inicial. Houve aumento da população de nematóides nas plantas que receberam até duas inoculações do fungo endofítico, onde a relação TR foi de 1,39 (Tabela 2).

O melhor biocontrole do nematóide em plantas inoculadas com *Fusarium* spp. foi obtido com três re-inoculações (T4) do fungo endofítico, diferindo significativamente de todos os demais tratamentos, onde foi verificado menor população de nematóides (338 nematóides/planta), o que equivale a 69% de controle de *R. similis* (Tabela 2). Além disso, este tratamento apresentou uma taxa de reprodução menor que 1, indicando que três re-inoculações a mais do fungo endofítico *Fusarium* spp. podem exercer influência sobre a reprodução dos nematóides.

**Tabela 2.** Efeito do fungo endofítico *Fusarium* spp. sobre o peso radicular e a população de *Radopholus similis* em raízes de mudas micropropagadas de bananeira cv. Williams.

Tratamento	Peso radicular (g)	Total de Nematóides/planta	Redução de nematóides (%)	TR
TR	12,14 c	1076 a	---	2,15
T1	13,69 abc	926 ab	14	1,85
T2	12,73 bc	1001 ab	7	2,00
T3	14,63 abc	694 b	36	1,39
T4	14,15 ab	338 c	69	0,68

Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente ( $p \leq 0,05$ ) de acordo com o teste de separação de médias Duncan.

\*TR = Relação entre a população final de nematóides e quantidade de nematóides inoculados inicialmente (500/planta).

#### 4. 2. Efeito do fungo endofítico *Fusarium* spp. sobre a promoção de crescimento de mudas micropropagadas de bananeira cv. Williams.

De acordo com a análise de variância, não houve diferenças significativas para as variáveis de promoção de crescimento: peso total, radicular, foliar e altura das plantas ( $P = 0,64$ ;  $P = 0,41$ ;  $P = 0,86$ ;  $P = 0,53$ , respectivamente. (Anexos 2 a 5). Entretanto, verificaram-se tendências de menor peso radicular e total entre os tratamentos testemunha relativo (TR) e T2 em relação ao testemunha absoluto (TA) (Tabela 3). Os demais tratamentos não diferiram do tratamento testemunha absoluto (TA) isento de fungo endofítico e nematóide. É importante destacar que os tratamentos T3 e T4 que consistem das maiores quantidades de re-inoculações de *Fusarium* spp. endofítico (T3 e T4) não causaram redução do desenvolvimento das plantas.

**Tabela 3.** Efeito do fungo endofítico *Fusarium* spp. sobre a promoção de crescimento de mudas micropropagadas de bananeira cv. Williams.

Tratamento	Peso total (g)	Peso radicular (g)	Peso foliar (g)	Altura (cm)
TA	34,85 ns	15,61 ns	19,24 ns	8,34 ns
TR	29,97 ns	12,14 ns	17,83 ns	7,78 ns
T1	31,2 ns	13,69 ns	17,51 ns	8,12 ns
T2	29,87 ns	12,73 ns	17,14 ns	7,95 ns
T3	32,39 ns	14,63 ns	17,76 ns	8,50 ns
T4	32,68 ns	14,15 ns	18,53 ns	8,43 ns

Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente ( $p \leq 0,05$ ) de acordo com o teste de separação de médias Duncan.



#### 4. 3. Efeito do fungo endofítico *Trichoderma* spp. sobre o biocontrole de *Radopholus similis* em mudas micropropagadas de bananeira cv. Williams.

Reduções altamente significativas ( $P \leq 0,001$ ) na população final de *Radopholus similis* foram obtidas entre mudas inoculadas com o fungo endofítico *Trichoderma* spp. em relação às mudas não inoculadas. Todas as plantas inoculadas com *Trichoderma* spp. (T1, T2, T3 e T4) não diferiram significativamente entre si (Tabela 4). Sendo assim, uma inoculação normal das plantas com *Trichoderma* spp. foi suficiente para reduzir a população de *Radopholus similis* a 325 nematóides/planta, o que equivale a uma redução de 79,5% com relação ao tratamento testemunha, após 6 semanas da inoculação dos mesmos (Figura 2). Entretanto, duas e três re-inoculações adicionais de *Trichoderma* spp. apresentaram as maiores reduções da população final de nematóides (Tabela 4, Figura 2).

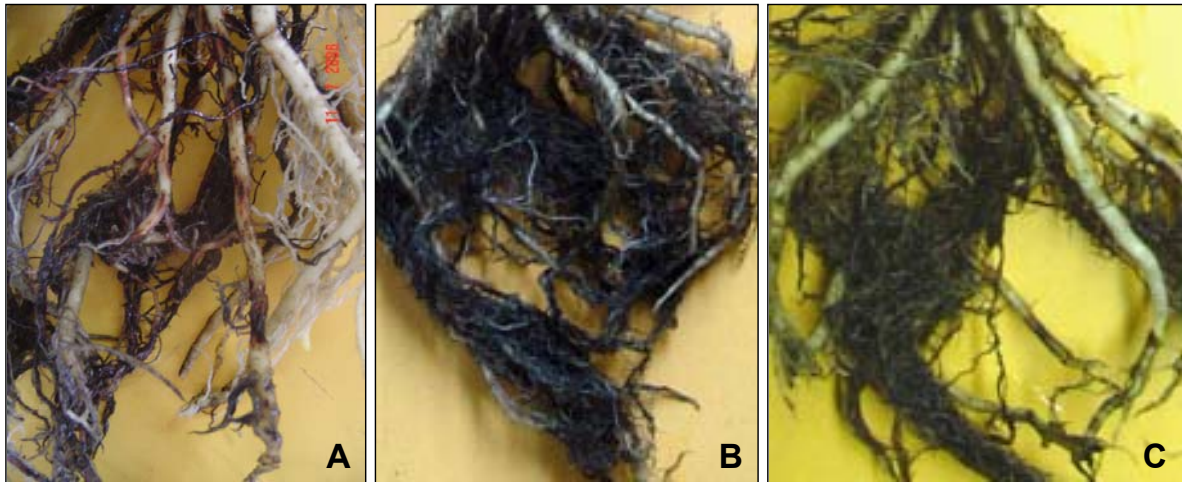
A menor taxa de reprodução de *R. similis* foi observada em resposta aos tratamentos com duas e três re-inoculações de *Trichoderma* spp. Por outro lado, a taxa de reprodução no tratamento testemunha foi superior a 3 (Tabela 4).

**Tabela 4.** Efeito do fungo endofítico *Trichoderma* spp. sobre o peso radicular e a população de *Radopholus similis* em raízes de mudas micropropagadas de bananeira cv. Williams.

Tratamento	Peso Radicular (g)	Total de Nematóides/planta	Redução de nematóides (%)	TR
TR	15,01 a	1584 a	---	3,17
T1	14,52 a	483 b	69,5	0,97
T2	11,84 a	375 b	76,3	0,75
T3	11,81 b	328 b	79,3	0,66
T4	12,14 b	325 b	80	0,65

Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente ( $p \leq 0,05$ ) de acordo com o teste de separação de médias Duncan.

\*TR = Relação entre a população final de nematóides e quantidade de nematóides inoculados inicialmente (500/planta).



**Figura 2.** Efeito do biocontrole de *Trichoderma* spp. em raízes de bananeira sobre o nematóide *Radopholus similis*. A) TR= Testemunha; B) T1= inoculação normal; C) T3 = inoculação normal + três re-inoculações.

#### **4. 4. Efeito do fungo endofítico *Trichoderma* spp. no crescimento de mudas micropropagadas de bananeira cv. Williams**

Depois de oito semanas de cultivo foram encontradas diferenças significativas entre tratamentos para todas as variáveis de crescimento avaliadas: peso total ( $P \leq 0,005$ ), peso radicular ( $P \leq 0,005$ ), peso foliar ( $P \leq 0,005$ ) e altura ( $P \leq 0,01$ ). As maiores médias de peso total, foliar, radicular e altura das plantas foram obtidas no tratamento testemunha absoluta (Tabela 5). As plantas que receberam uma inoculação normal de *Trichoderma* spp. não diferiram significativamente dos tratamentos testemunha absoluto e relativo em relação ao peso total, radicular e foliar.

De maneira geral, as plantas re-inoculadas (T2, T3 e T4) apresentaram médias significativamente menores de peso total, peso radicular e peso foliar com relação ao tratamento testemunha relativo. Provavelmente o método de re-inoculação utilizado pode ter ferido o sistema radicular das plantas, afetando seu desenvolvimento.

**Tabela 5.** Efeito do fungo endofítico *Trichoderma* spp. sobre a promoção de crescimento de mudas micropropagadas de bananeira cv. Williams.

<b>Tratamento</b>	<b>Peso total (g)</b>	<b>Peso radicular (g)</b>	<b>Peso foliar (g)</b>	<b>Altura (cm)</b>
TA	36,04 a	15,41 a	20,62 a	9,77 a
TR	33,36 ab	15,01 a	18,35 b	9,24 ab
T1	31,22 bc	14,52 a	16,70 bc	8,45 cd
T2	25,90 d	11,84 b	14,06 d	7,72 d
T3	27,07 d	11,81 b	15,26 cd	8,50 bcd
T4	27,44 cd	12,14 b	15,30 cd	8,52 bc

Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente ( $p \leq 0,05$ ) de acordo com o teste de separação de médias Duncan.

## 5. DISCUSSÃO

As plantas inoculadas com cepa não patogênica de *Fusarium* spp endofítico somente apresentaram redução eficiente da população final de *R. similis* (69%) quando foram realizadas três re-inoculações adicionais à inoculação normal do fungo. O aumento da população do fungo endofítico no tecido das plantas com as re-inoculações adicionais podem aumentar o efeito biocontrolador deste fungo sobre *R. similis*. Foram reportadas reduções de 46% a 94% na população final de *R. similis*, utilizando alta concentração de esporos ( $5 \times 10^6$  esporos/planta) de cepas não patogênicas de *F. oxysporum*, após 14 semanas de cultivo de mudas de bananeiras em casa de vegetação (VU, 2005).

Entretanto, outros trabalhos apresentam reduções significativas da população de *R. similis* em plantas onde foi realizada apenas uma inoculação de  $1,5 \times 10^6$  esporos.mL<sup>-1</sup> normal de cepas não patogênicas de *Fusarium* endofítico. Menezes (2003) verificou reduções de até 72% da população final de *Radopholus similis*, após 8 semanas de cultivo de mudas micropropagadas de bananeira “Grand enano” e foi verificado também 77% de redução em plantas “Valery” (NIERE, 2001).

A capacidade biocontroladora pode diferir de acordo com as cepas utilizadas. Pocasangre *et al.* (2000a) verificaram diferentes graus de atividade de 28 isolados de *Fusarium* spp. Deste total, nove isolados apresentaram apenas 30% de redução do número de nematóides/g de raiz, enquanto que 11 isolados apresentaram mais de 70% de redução.

O efeito biocontrolador dos fungos endofíticos sobre *R. similis* ainda não foi claramente elucidado. Pode ser causado de forma mecânica, onde o emaranhado de micélios atua impedindo a penetração do nematóide (POCASANGRE *et al.*, 2000a); pela produção de compostos pela planta resultante de alterações fisiológicas ou bioquímicas ao reconhecer a invasão dos seus tecidos por um organismo estranho (HARMAN *et al.*, 2004) ou pela presença de compostos ativos nematicidas ou nematostáticos nos metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos (AMIN, 1994). Pouco se conhece sobre o modo de ação de *Fusarium* spp endofítico sobre o biocontrole

de *R. similis*. Entretanto, Ciancio (1995) demonstrou que micotoxinas produzidas por *Fusarium* spp. Como T2-toxin, monilliformin, verrucarín A, cytochalasin B and Enniatin B, causaram significativa morte do nematóide *Meloidogyne javanica* nos estádios juvenis *in vitro*. Também foi observada ação tóxica de metabólitos produzidos por isolados não patogênicos de *Fusarium oxysporum* endofítico *in vitro*, reduzindo o número de massas de ovos bem como de galhas nas raízes de tomate causado por *Meloidogyne incognita* (HALLMAN & SIKORA, 1994).

Meneses (2003) reportou atividade biocontroladora de cepas não patogênicas de *Fusarium* spp, sob condições *in vitro*, por parasitismo mediante o recobrimento e imobilização do corpo do nematóide pelo crescimento do micélio e digestão do corpo do nematóide. A autora sugeriu que as hifas de *Fusarium* spp produziram substâncias que ajudaram a digerir o nematóide. Entretanto, demais estudos devem ser realizados para verificar se este efeito também ocorre sob condições de campo.

A atividade biocontroladora de cepas de *Fusarium* endofítico não patogênico também foi observada sobre outras espécies de nematóides em bananeira. Verificou-se que filtrados deste fungo causaram mortalidade de *Pratylenchus coffeae* e *Meloidogyne incognita* (SUNDARARAJU *et al.*, 2002)

De maneira geral, no presente trabalho verificou-se que *Trichoderma* spp. foi mais eficiente para o biocontrole de *R. similis* quando comparado ao fungo endofítico *Fusarium* spp. Uma única inoculação normal de *Trichoderma* spp. foi suficiente para reduzir a população final de nematóides ao mesmo nível que foi observado nas mudas que receberam três re-inoculações a mais de *Fusarium* spp, sem afetar significativamente o desenvolvimento das plantas.

Estas diferenças de atividade biocontroladora apresentada pelos diferentes isolados sob condições controladas em casa de vegetação pode ser explicada pela diferente habilidade exercida por cada isolado do fungo em crescer extensivamente dentro das raízes, impedindo a penetração do nematóide (POCASANGRE *et al.*, 2000a). Durante a execução do presente trabalho, verificou-se que sob condições *in vitro* cepas de *Trichoderma* spp. se desenvolveram mais rapidamente que cepas de *Fusarium* spp. (dados não apresentados).

No presente trabalho, a redução da população de *R. similis* em mudas inoculadas com *Trichoderma* spp. variou de 69,5% a 80%, de acordo com a quantidade de re-inoculações. Outros trabalhos também reportam os fungos endofíticos do gênero *Trichoderma* como excelentes agentes biocontroladores de *R. similis* em mudas micropropagadas de bananeira. Estes fungos apresentaram reduções de 74% (ZUM FELDE, 2002) e de 84% (SOTO, 2003) da população final de *R. similis*. *Trichoderma* também tem apresentado bom efeito biocontrolador em outras espécies de nematóides. Speijel y Chet (1998) verificaram atividade antagonista de *Trichoderma harzianum* sobre *Meloidogyne javanica*, reduzindo o índice de galhas nas raízes e o número de ovos/g de raiz.

Diversas são as propostas sobre o modo de ação de cepas de *Trichoderma* spp. sobre o biocontrole de nematóides. Meneses (2003) verificou que a ação parasítica de *Trichoderma* spp. foi unicamente mecânica, pela adesão dos esporos no corpo do nematóide, seguido da germinação e envolvimento do nematóide por uma massa de hifas, permanecendo íntegros e imóveis devido ao envolvimento das hifas. Entretanto, a autora verificou que sob condições *in vitro*, os extratos metabólicos extraídos de *Trichoderma* spp. apresentaram efeito nematocida de 100%.

A maioria das cepas de *Trichoderma* produz metabólitos tóxicos voláteis e não voláteis que impedem a colonização por microrganismos antagonistas. Associado a estes metabólitos podem ser produzidos outros componentes como ácido harzianico, alamethicinas, tricholina, peptaibols, antibióticos, 6-penthy-a-pyrone, massoilactona, viridina, gliovirina, glisopreninas, ácido heptelidico, entre outros (VEY *et al.*, 2001). Sendo assim, a grande gama de compostos produzidos permite que *Trichoderma* exerça um antagonismo mais eficiente uma maior quantidade de espécies de microrganismos quando comparado a outros fungos utilizados em controle biológico.

Mesmo assim, se considera que estes fungos também possam atuar ativando mecanismos de resistência na planta. A penetração do tecido radicular é geralmente limitada à primeira ou segunda camada de células e somente nos espaços intercelulares. As cepas de *Trichoderma* são capazes de se estabelecer de tal modo que induz interações de trocas metabólicas nas plantas (HARMAN *et al.*, 2004). A planta responde, então, com aumento da

atividade da peroxidase (geralmente associada à produção de compostos fungitóxicos), incremento na atividade da quitinase e com deposição de calose na superfície interna da parede celular, o que incrementa a resistência de amplo espectro a microrganismos patogênicos e vírus (HOWELL, 2003).

*Trichoderma* também foi descrito como capaz de incrementar o crescimento, produtividade das plantas hospedeiras, além de incrementar a absorção e concentração de nutrientes nas raízes das plantas (HARMAN *et al.*, 2004). No presente trabalho este efeito não foi verificado. O aumento de re-inoculações de *Trichoderma* spp. afetou negativamente o desenvolvimento das mudas, enquanto que as re-inoculações de *Fusarium* spp. não causaram reduções significativas. Este efeito pode ser devido à maior eficiência de *Trichoderma* spp. em se desenvolver no tecido das mudas. A densidade excessiva deste fungo endofítico pode ter induzido alterações metabólicas nas mudas, prejudicando seu desenvolvimento. Além disso, o método utilizado para re-inocular as plantas, pode ter causado ferimentos no sistema radicular, o que pode ter agravado o efeito negativo sobre a promoção de crescimento das plantas em contraste com a encontrada por outros autores.

Vu (2005) verificou que depois de duas inoculações com *F. oxysporum* endofítico em bananeira, em casa de vegetação, não houve diferença significativa para peso fresco foliar e radicular entre tratamentos. No entanto, foi verificado aumento significativo no peso fresco foliar em 16,7% a 28% quando comparado ao controle depois de 14 semanas da segunda inoculação do fungo endofítico. Alguns isolados endofíticos não-patogênicos de *F. oxysporum* reduzem a capacidade reprodutiva de *R. similis* no sistema radicular e não afetam o crescimento de bananeiras (NIERE, 2001).

Em condições de campo, considerando a grande diversidade de microrganismos presentes no solo e as interações que ocorrem entre demais microrganismos – fungos endofíticos – planta – ambiente, diversos são os fatores que podem influenciar a eficiência do biocontrole exercido pelos fungos endofíticos. É necessário que o fungo endofítico seja eficiente em aderir e reconhecer a raiz, penetrar, resistir aos metabólitos tóxicos produzidos pela planta em resposta à invasão por um organismo externo patogênico ou não e sobreviver diante da competição entre microrganismos. Cepas de *Trichoderma* são geralmente mais resistentes a estes componentes que a maioria dos

fungos. Estas propriedades fazem com que *Trichoderma* se adapte facilmente a diferentes condições, cresça muito rapidamente e seja encontrado em densidades populacionais muito mais altas (BENITEZ *et al.*, 2004).

Os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que *Trichoderma* spp. e *Fusarium* spp. são capazes de reduzir a densidade de *R. similis* no sistema radicular de mudas de bananeiras. Além disso, duas e três re-inoculações adicionais apresentaram o melhor biocontrole. No entanto, estes resultados devem ser corroborados por pesquisas posteriores para comprovar a consistência ou inconsistência destes resultados.



## 6. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

### 6. 1. Conclusões

Uma inoculação normal das plantas com cepa de *Trichoderma* spp. é suficiente para reduzir significativamente a população de *Radopholus similis* no sistema radicular das mudas micropropagadas.

As cepas não patogênicas de *Fusarium* spp. são mais eficientes para o biocontrole de *Radopholus similis* quando são realizadas três re-inoculações adicionais à inoculação normal das plantas.

As cepas de *Trichoderma* spp prejudicam o desenvolvimento das mudas micropropagadas quando re-inoculadas três vezes.

As cepas de *Fusarium* spp. não afetam significativamente o desenvolvimento das plantas inoculadas com até três re-inoculações adicionais à inoculação normal.

## **6. 2. Recomendações**

Repetir o experimento para determinar a consistência dos resultados obtidos;

Estudo de métodos de re-inoculações mais adequadas para reduzir/evitar danos às mudas;

Conduzir estudos para verificar a colonização do fungo endofítico no interior da planta, ao realizar re-inoculações periódicas do fungo.

Realizar estudos sobre os mecanismos de ação dos fungos endofíticos sobre o biocontrole de *R. similis*.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMIN N. Untersuchungen über die bedeutung endophytischer pilze für die biologische bekämpfung des wandernden endoparasiten *Radopholus similis* (Cobb) Thorne an Bananen. Ph.D. Thesis, University of Bonn, 112 pp. 1994.

ARAYA, M; CENTENO, M. Recuperación de *Radopholus similis*, *Helicopylenchus spp.*, *Meloidogyne spp.*, y *Pratylenchus spp* de raíz de banano funcional, no funcional y combinada. **Corbana**. V.20. n. 43. p. 11-17. 1995

ARAYA, M. & LAKHI, A. Response to consecutive nematicide applications using the same preproduct in *Musa* AAA cv. Grande Naine originated from in vitro propagative material and cultivated in virgin soil. **Nematologia Brasileira**. V.28, n.1, p. 55-61. 2004.

BENITEZ, T.; RINCON, A.M.; LIMON, M.C.; CODON, A.C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**. V.7, p.249-260. 2004.

CAÑIZARES MONTEROS, C. A. Estudio sobre poblaciones de hongos endofíticos provenientes de suelos supresitos al nematodo barrenador *Radopholus similis* (Cobb) Thorne en plantaciones de plátano en la zona de Talamanca, Costa Rica. Tesis M. Sc. Turrialba, CR. CATIE. 75 pp. 2003.

CAVALCANTE, M.J.B.; SHARMA, R.D.; VALENTIM, J.F.; GONDIM, T.M.S. Nematóides associados ao amendoim forrageiro e a bananeira no estado do Acre. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, n. 1, P. 107. 2002.

CHRISTIE, J. Nematodos de los vegetales; su ecología y control. Mexico, D.F., Limusa, S.A. 275 p. 1986.

CIANCIO, A. Observations on the nematicidal properties of some mycotoxins. **Fundamental and Applied Nematology**. V. 18, P. 451-454. 1995

COFCEWICZ, E.T.; MEDEIROS, A.B.; CARNEIRO, R.M.D.G.; PIEROBOM, C.R. Interação dos fungos micorrízicos arbusculares *Glomus etunicatum* e *Gigaspora margarita* e o nematóide das galhas *Meloidogyne javanica* em tomateiro. **Fitopatologia brasileira**, v.26, p. 65-70. 2001.

COSTA, D.C. Doenças causadas por nematóides. In: CORDEIRO, Z.J.M. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia. P. 66-77. 2000.

COSTA, M.J.N.; CAMPOS, V.P.; PFENNING, L.H.; OLIVEIRA, D.F. Patogenicidade e reprodução de *Meloidogyne incógnita* em tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) com aplicação de filtrados fúngicos ou extratos de plantas e de esterco animais. **Nematologia Brasileira**, v.24, p.219-226. 2000.

DEVRAJAN, K.; RAJENDRAN, G. Effect of the fungus, *Paecilomyces lilacinus* (Thom.) Sanson on the burrowing nematode, *Radopholus similis* (Cobb) Thorne in Banana. **Pest Management in Horticultural Ecosystems**. V.7, n.2, p.171-173, 2001.

DEVRAJAN, K.; SEENIVASAN, N. Biochemical changes in banana roots due to meloidogyne incógnita infected with *Paecilomyces lilacinus*. **Current Nematology**. V.13, n.1. p.1-5.2002.

DIAS, M.S.C.; RIBEIRO JUNIOR, P.M. Nematóides na bananicultura In: Simpósio Norte Mineiro sobre a Cultura da Banana. Anais... Montes Claros: Ed. Unimontes, p. 168-179, 2001.

FAO. Base de Datos Estadísticos. Disponível em: <http://www.fao.org> . Acesso em Julho de 2005.

FERNANDEZ, A. El banano em Ecuador; cultivo-plagas-enfermedades. Guayaquil, Ecuador, C&C. 303p. 1994.

FREITAS, L.G.; FERRAZ, S.; ALMEIDA, A.M.S. Controle de *Meloidogyne javanica* em tomateiro pela produção de mudas em substrato infestado com *Paecilomyces*. **Nematologia Brasileira**, v.23, p.65-73. 1999.

HALLMANN, J.; SIKORA, R.A. Occurrence of plant parasitic nematodes and nonpathogenic species of *Fusarium* in tomato plants in Kenya and their role as mutualistic synergist for biological control of root knot nematodes. **International Journal of Pest Management**. V.40, p. 321-325. 1994.

HALLMANN, J.; SIKORA, R.A. Toxicity of fungal endophyte secondary metabolites to plant parasitic nematodes and soil-borne plant pathogenic fungi. **European Journal of Plant Pathology**. V.102, p. 155-162. 1996.

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

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, n.1, p. 4-10. 2003.

JATALA, P.; KALTENBACH, R.; BOWNGEL, M. Biological control of *Meloidogyne incognita* acrita and *Globodera pallida* on potatoes. **J. Nematol.** V. 11, p. 303, 1979.

JOHNSON, A.W. Degradation of fenamiphos in agricultural production soil. **Supplement to the Journal of Nematology**. C. 30, p.40-44. 1998.

JONATHAN, E.I.; RAJENDRAN, G. Biocontrol potential of the parasitic fungus *Paecilomyces lilacinus* against the root knot nematode *Meloidogyne incognita* in banana. **J. Biol. Control**. V.14, p. 67-69. 2001.

LATCH, G.C.M. Physiological interactions of endophytic fungi and their hosts. Biotic stress tolerance imparted to grasses by endophytes. **Agriculture, Ecosystems and Environments**. V. 44 p. 143-156. 1993.

LOPEZ, L.L C., TORREZ, J.L.; RODRIGUEZ, J.G.; MORALES, S.R.; MARTIN, J.C.V. Uso de un nuevo nematocida biológico para la protección de las raíces del plátano vianda (*Musa AAB*) micropropagado. **Infomusa**, v.9,n.2, p.8-9. 2000.

LUC, M.; SIKORA, R.A.; BRIDGE, J. Plan parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture. C.A.B. 629p. 1990.

MAIA, A.S.; SANTOS, J.M.; DI MAURO, A.O. Estudo *in vitro* da habilidade predatória de *Minacrosporium robustum* sobre *Heterodera glycines*. **Fitopatologia brasileira**, v.24, n.4, p.732-736, 2001.

MALINOWSKI, D.P.; BELESKY, D.P. Adaptations of endophyte-infected cool-season grasses to environmental stresses: mechanisms of drought and mineral stress tolerance. **Crop Science** v.40, n.4, p. 923-940. 2000.

MARIN, D.H.; SUTTON, T.B.; BARKER, K.R. Diseminación del banano em Latinoamérica y el Caribe y su relación con la presencia de *Radopholus similis*. **Manejo Integrado de Plagas y Agroecología**. N. 66. p. 62-75. 2002

MENJIVAR BARAHONA, R.C. Estudio del potencial antagonista de hongos endofíticos para el biocontrol del nematodo barrenador *Radopholus similis* en plantaciones de banano en Costa Rica. Thesis. M. Sc. Turrialba, Costa Rica, 2005. 69p.

MENESES, A.M. Utilización de hongos endofíticos provenientes de banano orgánico para el control biológico del nematodo barrenador *Radopholus similis* (Cobb) Thorne. Thesis. M.Sc. Turrialba, Costa Rica. 2003. 66p.

MOENS, T.; ARAYA, M.; SWENNEN, R.; DE WAELE, D. Enhanced biodegradation of nematicides after repetitive applications and its effect on root and yield parameters in commercial banana plantations. **Biology and Fertility of Soils**, v.39, n. 6, p. 407-4014, 2004.

NIERE, B.I. Significance of non-pathogenic isolates of non-pathogenic isolates of *Fusarium oxysporum* Schlecht.: Fries for the biological control of the burrowing nematode *Radopholus similis* (Cobb) Thorne on tissue cultured banana. Ph.D. Thesis. Germany. Bonn Universitat. 118p. 2001.

PATTISON, A.B.; STANTON, J.M.; COBON, J.A. Bioassay for enhanced biodegradation of nematicides in soil. **Australasian Plant Pathology**, v.29, p.52-58, 2000.

PATTISON, T.; VERSTEEG, C. Enhanced biodegradation of terbufos. **Bananatopics**, v.29, p. 16-17, 2000.

PETRINI, O., SIEBER, T.N. TOTI, L. VIRET, O. Ecology, metabolite production and substrate utilization in endophytic fungi. *Natural toxins* v.1, p. 185-196. 1992.

PERSSON C & H.B. JANSSON. Colonization of soil by nematophagous fungi. Tercer Seminario Científico Internacional sobre Sanidad Vegetal. Ciudad Habana. Resúmenes. 127 pp 1997.

PINOCHET, J.; CAMPRUBI, C.; CALVET, C.; FERNANDEZ, C. Inducing tolerance to the root-lesion nematode *Pratylenchus vulnus* by early mycorrhizal inoculation of micropropagated Myrobalan 29 plum rootstock. **Journal of American Society of Horticultural Science**. V.123, p.342-341, 1998.

POCASANGRE, L.; SIKORA, R.A.; VILICH, V. SCHUSTER, R.P. Encuesta sobre los hongos endofíticos del banano de América Central y el cribado para el control biológico del nematodo barrenador (*Radopholus similis*). **Infomusa**, v.9, n.1, p. 3-5, 2000a.

POCASANGRE, L.; SIKORA, R.A.; VILICH, V.; SCHUTER, P. Survey of banana endophytic fungi from Central America and screening for biological control of *Radopholus similis*. In M. Blanke; J. Pohlan. 2000. Eds. **ISHS Conference on Fruit Production in the Tropics and Subtropics** V. 2. Bonn. P. 283-289. 2000b.

POCASANGRE, L. Nuevas estrategias para el manejo de nematodos en musáceas. In: Sikora, R.A. 2004. Manejo alternativo de fitonematoides en banano y plátano. P.106-112. In: Memorias, XVI reunion internacional de ACORBAT, Oaxaca, México.

RACKE, K.D.; COATS, J.. Comparative degradation of organophosphorus insecticides in soil: specificity of enhanced microbial degradation. **Journal of Agricultural Food Chemistry**. V.36. p.193-199. 1988.

READ, D.C. Greatly Accelerated Microbial Degradation of Aldicarb in Re-treated Field Soil, in flooded soil, and in water. **Journal of Economic Entomology**. V.80. p. 156-163. 1987.

RIBEIRO, R.C.F.; FERRAZ, S.; MIZOBUTSI, E.F. Avaliação da eficiência de isolados de *Minacrosporium* spp. No controle de *Meloidogyne javanica* e *Heterodera glycines*. **Nematologia Brasileira**. V. 23, p. 48-61, 1999.

RODRIGUES, M.G.V.; SOUTO, R.F.; DIAS, M.S.; SILVA, E.B. **Manejo do bananal de Prata-Anã cultivado no norte de Minas Gerais**. In: I Simpósio Norte Mineiro sobre a cultura da banana. Anais... Montes Claros: Editora Unimontes, p. 154-167. 2001.

- SALEH, H.; MSIKORA, R.A. Relationship between *Glomus fasciculatum* root colonization of cotton and its effect on *Meloidogyne incognita*. **Nematologica**. V.30, p.230-237. 1984.
- SARAH, J.L.; PINOCHET, J.; STANTON, J.M. The burrowing of bananas, *Radopholus similis* Cobb. Musa pest Fact Sheet No. 1; INIBAP Montpellier, France. 1996.
- SCHUSTER, R.P. ; SIKORA, R.A.; AMIN, N. Potential of endophytic fungi for the biological control of plant parasitic nematodes. **Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent**, V. 60, N.3, P. 1047-1052. 1995.
- SMITH, G.S. Interaction of nematodes with mycorrhizal fungi. In: VEECH, J.A.; DICKSON, D.W. (Eds.) *Vistas on Nematology*. Hyattsville. Society of Nematologists. P. 292-300. 1987.
- SIKORA, R.A. Management of the antagonistic potential in agricultural ecosystems for biological control of plant parasitic nematodes. *Annual Review of Phytopathology*. V.30, p.245-270. 1992.
- SOTO, J.C. Evaluación de cuatro hongos endofíticos elite provenientes de suelos supresivos para el control biológico del nematodo barrenador del banano, *Radopholus similis*. Tesis. Lic. Universidad de Tolima, Colombia. 120 p. 2003.
- SOUZA, J.T.; MAXIMINIANO, C.; CAMPOS, V.P. Nematóides associados a plantas frutíferas em alguns estados brasileiros. **Ciência e Agrotecnologia**, v.23, n.2, p. 353-357, 1999.
- SPEIJER P.R. Interrelationships between *Pratylenchus goodeyi* Sher & Allen and strains of non-pathogenic *Fusarium oxysporum* Schl. Emd. Snyder & Hans. in roots of two banana cultivars. Ph. D. Thesis, University of Bonn, 200 pp. 1993.
- SPEIJEL, Y.; CHET, I. Evaluation of *Trichoderma* spp. As a biocontrol agent against soilborne fungi and plant parasitic nematodes in Israel. **Integrated Pest Management Reviews**. V.3, p. 169-175. 1998.
- STANTON, J.M.; PATTISON, A.B. Implementing strategic control of nematodes on banana. Final Report. Horticultural Research and Development Corporation, Queensland Department of Primary Industries, Queensland Government. March, 2000. Project FR96016. 98p. 2000.
- SUNDARARAJU, P. THANGAVELU, R. CANNAYANE, I. Management of *Pratylenchus coffeae* and *Meloidogyne incognita* on banana by using endophytic fungi. **Current Nematology**, V. 13, N. 1/2, p. 77-8, 2002
- VEY, A.; HOAGLAND, R.E.; BUTT, T.M. Toxic metabolites of fungal biocontrol agents. In: Butt, T.M.; Jackson, C.; Magan, N. (eds). *Fungi as biocontrol agents: Progress, problems and potential*. CAB International, Bristol, p.311-346. 2001.
- VILAS BOAS, L.C.; TENENTE, R.C.V.; GONZAGA, V.; SILVA NETO, S.P.; ROCHA, H.S. Reação de clones de bananeira (*Musa* spp.) ao nematóide *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood, 1949, Raça 2. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.24, n. 3, p. 690-693, 2002.
- VU, T.T.T. Modes of action of non-pathogenic *Fusarium oxysporum* endophytes for bio-enhancement of banana toward *Radopholus similis*. Ph. D. Thesis, University of Bonn, Germany. 102 pp. 2005.
- VU, T.T.T.; SIKORA, R.A.; GAUSCHILD, R. Effects of endophytic *Fusarium oxysporum* towards *Radopholus similis* activity in absence of banana. **Comm. Appl. Biol. Sci. Ghent University**, v.69, n. 3, p. 381-385. 2004.
- YATES I.E., C.W. BACON & D.M. HINTON. Effects of endophytic infection by *Fusarium moniliforme* on corn growth and cellular morphology. **Plant Diseases** 81 : 723-728. 1997.

ZUM FELDE, A. Screening of the endophytic fungi from banana (*Musa*) for antagonistic effects towards the burrowing nematode, *Radopholus similis* (Cobb) Thorne. Thesis MSc. Bonn, Universität. 53 p. 2002.

# **ANEXOS**



**Anexo 1.** Análise da variância para a variável de biocontrole “Número total de nematóides” utilizando cepa de *Fusarium spp* endofítico não-patogênico.

Source	DF	F Value	Pr > F
Model	13	2,22	0,0292
Error	36		
Total	49		
CV = 15,55			

**Anexo 2.** Análise da variância para a variável de promoção de crescimento “Peso Foliar” utilizando cepa de *Fusarium spp* endofítico não-patogênico.

Source	DF	F Value	Pr > F
Model	14	0,59	0,8614
Error	45		
Total	59		
CV = 13,79			

**Anexo 3.** Análise da variância para a variável de promoção de crescimento “Peso Radicular” utilizando cepa de *Fusarium spp* endofítico não-patogênico.

Source	DF	F Value	Pr > F
Model	14	1,07	0,4103
Error	45		
Total	59		
CV = 19,13			

**Anexo 4.** Análise da variância para a variável de promoção de crescimento “Peso Total” utilizando cepa de *Fusarium spp* endofítico não-patogênico.

Source	DF	F Value	Pr > F
Model	14	0,82	0,6423
Error	45		
Total	59		
CV = 14,82			

**Anexo 5.** Análise da variância para a variável de promoção de crescimento “Altura” utilizando cepa de *Fusarium spp* endofítico não-patogênico.

Source	DF	F Value	Pr > F
Model	14	0,93	0,5366
Error	45		
Total	59		
CV = 10,22			

**Anexo 6.** Análise da variância para a variável de biocontrole “Número total de nematóides” utilizando cepa de *Trichoderma spp* endofítico.

Source	DF	F Value	Pr > F
Model	11	5,34	0,0002
Error	28		
Total	39		
CV = 8,76			

**Anexo 7.** Análise da variância para a variável de promoção de crescimento “Peso Foliar” utilizando cepa de *Trichoderma spp* endofítico.

Source	DF	F Value	Pr > F
Model	14	4,31	0,0003
Error	33		
Total	47		
CV = 12,33			

**Anexo 8.** Análise da variância para a variável de promoção de crescimento “Peso Radicular” utilizando cepa de *Trichoderma spp* endofítico.

Source	DF	F Value	Pr > F
Model	14	2,46	0,0166
Error	33		
Total	47		
CV = 16,78			

**Anexo 9.** Análise da variância para a variável de promoção de crescimento “Peso Total” utilizando cepa de *Trichoderma spp* endofítico.

Source	DF	F Value	Pr > F
Model	14	3,68	0,001
Error	33		
Total	47		
CV = 12,75			

**Anexo 10.** Análise da variância para a variável de promoção de crescimento “Altura” utilizando cepa de *Trichoderma spp* endofítico.

Source	DF	F Value	Pr > F
Model	14	2,73	0,0087
Error	33		
Total	47		
CV = 9,03			