



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MONTES CLAROS

**BACTÉRIAS DE NIM NO CONTROLE DO
COMPLEXO *Meloidogyne* x *Fusarium* EM
BANANEIRA**

ISAC PEREIRA SOARES MARTINS

2013

ISAC PEREIRA SOARES MARTINS

**BACTÉRIAS DE NIM NO CONTROLE DO COMPLEXO
Meloidogyne x *Fusarium* EM BANANEIRA**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Montes Claros, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal no Semiárido, área de concentração em Produção Vegetal, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

Orientadora
Prof.^ª Dra. Regina Cássia Ferreira Ribeiro

JANAÚBA
MINAS GERAIS – BRASIL
2013

M386b Soares-Martins, Isac Pereira.
Bactérias de nim no controle do complexo *Meloidogyne*
x Fusarium em bananeira [manuscrito] / Isac Pereira Soares
Martins. – Janaúba, 2013.
87 f.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Montes Claros - Unimontes, Programa de Pós-Graduação
em Produção Vegetal no Semiárido/PPGPVSA, 2013.
Inclui bibliografia por capítulo.

Orientadora: Prof^a. Dra. Regina Cássia Ferreira Ribeiro.
Coorientadora: Prof^a. Dra. Adelica Aparecida Xavier.

1. *Azadiractha indica*. 2. Mal-do-Panamá. 3. *Musa* sp. I.
Ribeiro, Regina Cássia Ferreira. II. Xavier, Adelica
Aparecida. III. Universidade Estadual de Montes Claros. IV.
Título.

Catálogo: Biblioteca Setorial Campus de Janaúba

ISAC PEREIRA SOARES MARTINS

BACTÉRIAS DE NIM NO CONTROLE DO COMPLEXO
Meloidogyne x Fusarium EM BANANEIRA

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Montes Claros, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal no Semiárido, área de concentração em Produção Vegetal, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

APROVADA em 26 de março de 2013.

Prof^a. Dra Regina Cássia Ferreira Ribeiro
(Orientadora)

Prof^a. Dra Adelica Aparecida Xavier
(Coorientadora-DCA-UNIMONTES)

Prof. Dr. Edson Hiydu Mizobutsi
(DCA- UNIMONTES)

Prof^a. Dra Sílvia Niestche
(DCA-UNIMONTES)

Dra Alnusa Maria de Jesus
(EPAMIG-URENM)

JANAÚBA
MINAS GERAIS – BRASIL
2013

*À Deus, Meu Salvador e socorro bem presente na angústia;
Àos meus pais, José Soares e Maria Regina, e a minha querida
irmã, Cintia;
Ao Pr.. Francelino e família, e a todos os irmãos em Cristo;
À minha amada esposa, Elizete, e ao meu filho, João
Guilherme;*

Dedico!!!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela saúde, pela força e pela certeza de que eu nunca estive só, mas Ele sempre foi o meu socorro e o meu escudo;

À Universidade Estadual de Montes Claros – UNIMONTES, pela contribuição na minha formação acadêmica;

À CAPES, pela bolsa concedida, e à FAPEMIG, pelo apoio financeiro, para execução deste trabalho;

Às professoras Dra Adélica Aparecida Xavier e Dra Regina Cássia Ferreira Ribeiro, para as quais a única coisa que posso dizer é: oro e sempre vou orar por vocês, pois com palavras eu não seria capaz de agradecê-las, mas que o Pai do céu lhes conceda muita saúde, paz e paciência;

A todos os amigos do Laboratório de Fitopatologia. Aos meus amigos irmãos, Humberson e Leandro: sem vocês eu não teria conseguido chegar até aqui;

A todos os colegas de trabalho da Nutrivale Agrícola na pessoa do Sr. Farley, pela oportunidade de trabalho e pela compreensão;

Ao Pr. Francelino e sua família, por me acolherem em seu lar com todo amor e carinho;

Aos meus pais, José Soares Rocha e Maria Regina Pereira Soares Fonseca: vocês são os melhores pais do mundo; tudo o que sou foram vocês quem me deram. Essa vitória é nossa. À minha querida irmã, Cíntia, e a todos os meus parentes e familiares.

À minha esposa, Elizete, e ao meu filho, João Guilherme. Até que enfim o papai vai ter mais tempo pra vocês, obrigado pela compreensão e apoio, vocês são a razão da minha vida.

A todos que de forma direta ou indireta participaram dessa conquista, MUITO OBRIGADO!!! QUE DEUS EM CRISTO JESUS VOS ABENÇOE.

MUITO OBRIGADO!!!

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| RESUMO GERAL..... | i |
| 1 INTRODUÇÃO GERAL | 5 |
| 2 REFERENCIAL TEÓRICO | 8 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 15 |
| CAPÍTULO I..... | 24 |
| RESUMO..... | 20 |
| ABSTRACT..... | 21 |
| 1 INTRODUÇÃO..... | 22 |
| 2 MATERIAL E MÉTODOS | 24 |
| 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 28 |
| 4 CONCLUSÕES..... | 39 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 40 |
| CAPÍTULO II..... | 44 |
| RESUMO..... | 45 |
| ABSTRACT..... | 47 |
| 1 INTRODUÇÃO..... | 49 |
| 2 MATERIAL E MÉTODOS | 52 |
| 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 57 |
| 4 CONCLUSÕES..... | 81 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 82 |

RESUMO GERAL

SOARES-MARTINS, Isac Pereira. **Bactérias de nim no controle do complexo *Meloidogyne x Fusarium* em bananeira**. 2013. 87 p. Dissertação (Mestrado Produção Vegetal no Semiárido) - Universidade Estadual de Montes Claros, Janaúba- MG.¹

O Mal-do-Panamá e os fitonematoides são responsáveis por perdas na produtividade da bananeira. Há evidências que efeito nematicida e fungicida do nim pode estar associado aos microrganismos epifíticos e endofíticos associados à planta. Portanto, objetivou-se com este trabalho avaliar: No primeiro capítulo, o efeito de bactérias de folhas de nim sobre a mobilidade e a mortalidade de juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* e sobre a penetração e a reprodução em mudas de bananeira ‘Prata-Anã’ e ‘Maçã’; e no segundo capítulo, o efeito desses isolados bacterianos sobre o antagonismo a *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (*foc*), e avaliar o efeito dos mesmos associados ao extrato esterilizado de nim (EEN) sobre *M. javanica* e *foc* e sobre o complexo *M. javanica* + *foc* em bananeira ‘Maçã’. No primeiro capítulo, observou-se que 57,14 % das bactérias de nim promoveram mortalidade dos J2 de *M. javanica* superior a 50 %. Em torno de 66,66 % dos isolados reduziram entre 72,64 % e 97,13 % a penetração dos J2 de *M. javanica* em raízes de bananeira ‘Prata-Anã’ com efeito sinérgico entre os isolados e o EEN. Em casa de vegetação, o EEN incrementou o comprimento das mudas e reduziu o número de massas de ovos. Os isolados BNF 7 e BNF 2 veiculados no EEN destacaram-se na redução do número de galhas e massas de ovos. No segundo capítulo, observou-se redução de até 35,57 % do crescimento micelial de *foc* na presença de 45,45 % dos isolados bacterianos avaliados. O extrato fermentado de nim causou lise nos microconídios de *foc*. Já o EEN e o extrato centrifugado de nim estimularam a germinação. A redução da germinação de esporos de *foc* foi linear com o aumento da concentração de células bacterianas para 82,85 % dos isolados testados. Em casa de vegetação, o isolado EPI 6 se destacou na promoção de crescimento dentro do complexo *Mj* x *foc*. Já o isolado BNF 9 foi o mais promissor na redução do número de ovos, do fator de reprodução e da severidade do Mal-do-Panamá dentro do complexo *Mj* x *foc*. A associação de bactérias do nim com o EEN tem potencial para o controle do complexo *Mj* x

¹Comitê de Orientação: Prof^ª Regina Cássia Ferreira Ribeiro - DCA/UNIMONTES (Orientadora); Prof^ª Adelica Aparecida Xavier - DCA/UNIMONTES (Coorientadora); Prof^ª Sílvia Niestche-DCA/UNIMONTES; Prof. Edson Hiydu Mizobutsi - DCA/UNIMONTES; Pesquisadora Alniuza Maria de Jesus – EPAMIG-URENM.

foc, e pesquisas devem ser desenvolvidas buscando mais informações dessa associação.

Palavras-chave: Nematóide de galhas, Mal-do-Panamá, *Azadiractha indica*, *Musa* spp., controle biológico.

GENERAL ABSTRACT

SOARES-MARTINS, Isac Pereira. **Bacteria from neem in the controlle of *Meloidogyne x Fusarium* complex in banana plant.** 2013. 87 p. Dissertation (Master in Plant Production in the semiarid) - Universidade Estadual de Montes Claros, MG-Janaúba¹

The Panama disease and plant parasitic nematodes are responsible for losses in banana yield. There is evidence that fungicidal and nematicidal effect of neem may be related to epiphytic and endophytic microorganisms associated with plant. Therefore, this work was carried out in order to evaluate: In the first chapter, the effect of bacteria from neem leaves on mobility and mortality of second stage juveniles (J2) of *Meloidogyne javanica* and on the penetration and reproduction in plantlets of 'Prata-Anã' and 'Maçã' banana; and in the second chapter, the effect of those bacterial isolates on antagonism to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (*foc*), and to evaluate the effect of the same associated with the sterile neem extract (SNE) way on *M. javanica* and *foc*, and on *M. javanica* + *foc* complex in 'Maçã' banana. In the first chapter, it was observed that 57.14 % of bacteria from neem promoted more than 50 % of mortality of J2 of *M. javanica*. About 66.66 % of the isolates reduced from 72.64 % to 97.13 % penetration of J2 of *M. javanica* in 'Prata-Anã' banana roots with synergistic effect between the isolates and the SNE. In the greenhouse, the SNE increased the plantlets length and reduced the number of egg masses. The BNF 7 and BNF 2 isolates in SNE stood out in reducing the number of galls and egg masses. In the second chapter, there was a reduction of up to 35.57 % of the mycelial growth of *foc* in the presence of 45.45 % of the evaluated isolates. The fermented neem extract caused lysis of *foc* microconidia. However, SNE and centrifuged neem extract stimulated germination. The reduction in germination of *foc* was linear with increasing concentration of bacterial cells to 82.85 % of the tested isolates. In the greenhouse, the EPI 6 isolate excelled in promoting growth within the *Mj x foc* complex. Nevertheless, the BNF 9 isolate was the most promising in reducing the number of eggs, reproductive factors and the severity of the Panama disease within the *Mj x foc* complex. The association of bacteria from neem with SNE has the potential to control the *Mj x foc* complex,

¹ Guidance committee: Prof. Regina Cássia Ferreira Ribeiro - DAC/UNIMONTES (Adviser); Prof. Adelica Aparecida Xavier - DAC/UNIMONTES (Co-adviser); Prof. Silvia Niestche-DCA/UNIMONTES; Prof. Edson Hiydu Mizobutsi - DAC/UNIMONTES; Researcher Alniuza Maria de Jesus – EPAMIG-URENM.

and researches should be conducted seeking more information on that association.

Keywords: Root-knot nematode, Panama disease, *Azadiractha indica*, *Musa* spp., biological control.

1 INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é o quarto produtor de banana (*Musa* spp. L.) do mundo (AGRIANUAL, 2012). Dentre os estados brasileiros, Minas Gerais também se destaca com uma área de 41765 ha. Neste estado, os municípios produtores do Norte se sobressaem com uma área plantada de 14,3 mil hectares (SEAPA-MG, 2012). Embora a produtividade média de banana no Norte de Minas (24.184 t ha⁻¹) seja maior que a média estadual (16.456 t ha⁻¹), as doenças constituem-se em fatores determinantes para limitação da produtividade na cultura. Nessa região, o Mal-do-Panamá causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Smith) (*foc*) e os nematoides das galhas (*Meloidogyne* spp. Goeldi) assumem uma importância significativa, devido às perdas causadas aos bananais.

O Mal-do-Panamá ocorre de forma endêmica no Brasil e com maior severidade nas variedades ‘Maçã’ e do subgrupo Prata quando cultivadas em solos arenosos, com pH ácido, desequilíbrio nutricional e baixo teor de matéria orgânica (VENTURA E HINZ, 2002). O fungo é um habitante do solo que pode sobreviver por vários anos na ausência do hospedeiro, por estruturas de resistência ou associados a restos de cultura; no entanto, as espécies de *Meloidogyne* além de sobreviverem na forma de ovos possuem uma grande gama de hospedeiros o que dificulta o manejo (AGRIOS, 2005).

Vários métodos são usados no controle de *foc* e *Meloidogyne* spp. e, dentre esses, a utilização de cultivares resistentes nem sempre é possível para controle de nematoides em função da falta de fontes de resistência para o melhoramento genético e pela quebra resistência em condições de campo. Para o Mal-do-Panamá é a medida mais eficiente; entretanto, as variedades disponíveis não são bem aceitas para o mercado consumidor, o que desestimula seu plantio em regiões afetadas pela doença (RITZINGER e FANCELLI, 2006; VENTURA e HINZ, 2002).

Apesar de existirem produtos químicos registrados para os fitonematoides e *foc*, eles não são efetivos, deixam resíduos nos alimentos e ainda causam a contaminação do ambiente. Logo na implantação do bananal, medidas como elevação do pH para próximo da neutralidade, e preferência por solos férteis e com altos níveis de matéria orgânica são práticas imprescindíveis para o manejo dos fitonematoides do Mal-do-Panamá.

Diante das dificuldades de controle dessas doenças, alternativas que reduzam o inóculo no campo, e apresentem maior viabilidade econômica e menor agressividade ao homem e ao meio ambiente devem ser adotadas. Dentre elas, destacam-se a incorporação de matéria orgânica, de agentes de controle biológico e de extratos de origem vegetal como os de nim. *Azadirachta indica* A. Juss, popularmente conhecida como nim, é uma das plantas mais estudadas no controle de pragas e patógenos. Essa planta tem se mostrado promissora para o controle do complexo *Fusarium x Meloidogyne* (SILVA e PEREIRA, 2008).

O controle biológico tem sido utilizado na cultura da banana para o controle de nematoides e de *foc*. Dentre os agentes antagonistas mais promissores destacam-se os fungos (MENDOZA e SIKORA, 2009; SAMPAIO *et al.*, 2012), as rizobactérias (LOPES, 2011) e os microrganismos endofíticos (CARDOSO *et al.*, 2012).

Estudos desenvolvidos no sentido de avaliar o efeito do nim em associação com microrganismos antagonistas para o controle de nematoides e de *foc* mostram resultados promissores. Javed *et al.* (2008) constataram efeitos significativos na combinação de extratos foliares de nim com *Pasteuria penetrans* Thorne no controle de *Meloidogyne javanica* (Treub) em tomate. Akila *et al.* (2011) verificaram que a combinação de extratos vegetais, dentre eles o nim, com agentes de controle biológico, reduziram de forma efetiva a severidade do Mal-do-Panamá em bananeira. Silva (2010) observou que extratos fermentados de nim apresentaram eficiência na redução da germinação de

microconídios de *foc*, porém, esses mesmos extratos, quando filtrados em membrana milipore e/ou aquecidos, estimularam a germinação dos esporos. Com isso, a autora levantou a hipótese dessa redução na germinação ser de natureza biológica. Essa hipótese tem respaldo na literatura, pois trabalhos mostram vários microrganismos epifíticos e endofíticos associados às folhas de nim (GEORGE *et al.*, 2005; TENGURIA e KHAN, 2011).

A utilização de microrganismos de folhas de nim associados aos seus extratos no controle de doenças pode ser importante pela atuação sinérgica dos efeitos biológicos e químicos, uma vez que esses extratos de nim podem servir de substrato para o desenvolvimento dos microrganismos epifíticos e endofíticos presentes em suas folhas. Dessa forma, objetivou-se neste trabalho avaliar o efeito *in vitro* de bactérias associadas às folhas de nim sobre *M. javanica* e *foc* e avaliar o efeito dessas bactérias associado ao extrato esterilizado de nim de forma isolada sobre *M. javanica* e *foc* e sobre o controle do complexo *M. javanica* x *F. oxysporum* f. sp. *cubense* em mudas de bananeira em casa de vegetação.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

A bananeira (*Musa* spp.), pertencente à família Musaceae, é considerada uma das fruteiras mais produzidas e consumidas no mundo, sendo explorada na maioria dos países tropicais. O Brasil é o quarto maior produtor com 6,8 milhões de toneladas, sendo essa fruteira cultivada em todos os Estados da Federação. Em Minas Gerais, no ano de 2011, a produção foi de aproximadamente 687.293 toneladas e, dentre as regiões produtoras, a região Norte representa um dos polos de produção de banana altamente tecnificada, com uma média de produtividade 46,7 % maior que a média nacional (SEAPA, 2012). Tal atividade é responsável por 60 mil empregos diretos e indiretos o que caracteriza a sua importância socioeconômica regional (ABANORTE, 2008).

Dentre as pragas que afetam o rendimento da cultura, a incidência de patógenos tem sido um dos fatores determinantes para a redução da produtividade (PEREIRA *et al.*, 1999). As doenças sigatoka amarela, sigatoka negra e Mal-do-Panamá constituem, juntamente com os nematoides, os principais problemas fitopatológicos da bananeira (CORDEIRO e KIMATI, 1997). No Brasil, várias áreas de bananeira foram erradicadas após a constatação do Mal-do-Panamá (MATOS e CORDEIRO, 2003).

No Norte de Minas, especialmente no projeto Jaíba, a combinação de características de solos condúctivos e cultivares suscetíveis ao Mal-do-Panamá como a Prata-Anã têm levado à erradicação e à substituição por outras culturas. O controle químico para essa doença não tem sido efetivo no campo. Assim, uma vez detectada a doença na área, as principais medidas de controle preconizadas são baseadas naquelas de convivência com a doença. Dessa forma, técnicas que reduzam a quantidade inóculo ou o desenvolvimento do progresso da doença são uma estratégia importante para o manejo de focos da doença.

As perdas causadas por fitonematoides podem variar de 80 % a 100 % em bananeira ‘Nanicão’ no Brasil (ZEM e ALVES, 1981). Esses patógenos causam lesões radiculares, nanismo na planta, prolongamento do estágio vegetativo, redução de números de raízes ativas, clorose foliar, diminuição de produção e tamanho de frutos, até tombamentos de plantas (RITZINGER e COSTA, 2004). Diversas espécies de *Meloidogyne* são relatadas associadas às raízes de bananeira. Entretanto, as de maior ocorrência e amplamente distribuídas nos estados brasileiros são *Meloidogyne incognita* (Kofoid e White, 1919) e *M. javanica* (ZEM *et al.*, 1980; ZEM *et al.*, 1984).

A utilização de medidas alternativas para o controle de doenças tem sido buscada para integrar as medidas de manejo das doenças de culturas. Neste contexto, produtos extraídos de substratos vegetais têm sido testados para avaliar a sensibilidade de alguns fitopatógenos *in vitro*. Sabe-se que as plantas naturalmente possuem substâncias que atuam na defesa a fitopatógenos. Trabalhos com plantas medicinais e nativas utilizando extrato bruto e óleo essencial têm apresentado resultados interessantes no controle desses microrganismos, seja pela redução do crescimento micelial, germinação ou elicitando reação de resistência na planta (OLIVEIRA, 2004; FERREIRA JÚNIOR, 2003). Extratos de alho, hortelã, mamona e pimenta (RIBEIRO e BEDENDO, 1999) e barbatimão (XAVIER *et al.*, 2005) têm apresentado resultados satisfatórios na redução de germinação e crescimento micelial de fungos.

Espécies cultivadas e nativas no norte de Minas Gerais vêm sendo avaliadas como alternativa de controle de *F. oxysporum* f. sp. *cubense*. Extratos brutos de pinha (*Annona squamosa* L.) (FERREIRA JÚNIOR, 2003), barbatimão (*Stryphnodendron* sp. Mart) (OLIVEIRA, 2004; XAVIER *et al.*, 2005), e, de nim *A. indica* (GOMES *et al.*, 2009) mostraram resultados positivos

na redução da germinação e no crescimento micelial de *F. oxysporum* f. sp. *cubense*.

O nim contém em suas folhas, frutos, sementes e casca uma mistura de constituintes biologicamente ativos, incluindo os triterpenoides, a azadiractina, a solanina e meliantol que estão envolvidos no controle de mais de 100 espécies de ácaros e nematoides (AHMED e GRAINGE, 1986). Possui propriedades não agressivas ao ambiente, como baixa toxicidade a mamíferos, sendo utilizado como antisséptico e medicinal. Outra vantagem é sua rápida degradação no ambiente, com carência de 4 a 10 dias dependendo das condições ambientais (CIOCIOLA JÚNIOR e MARTINEZ, 2002; KOUL *et al*, 1990). Além disso, já foi verificada a translocação sistêmica e translaminar em algumas plantas como, por exemplo, o tomate (SOUZA e VENDRAMIM, 2005). Entretanto, estudos dessa planta como biofungicida são escassos na literatura.

Resultados apresentados na literatura para fungos mostram que muitas vezes tais organismos são sensíveis à presença do extrato na fase de desenvolvimento de biomassa, e outros são afetados na fase de reprodução ou germinação. Silva (2010) obteve redução do crescimento micelial, esporulação e germinação de 61 %, 78 % e 99 %, respectivamente, para *F. oxysporum* f. sp. *cubense* na presença do extrato de folhas frescas. O efeito de extrato de nim foi também avaliado por Mello *et al.* (2005) no crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) De Bary, os autores observaram redução da formação de escleródios na presença de 30 % de óleo de nim.

A literatura sobre a utilização de nim no controle de fitonematoide é muito vasta, e um levantamento feito em fevereiro de 2004 revelou mais de 600 trabalhos publicados, dos quais uma boa parte relata o sucesso no controle de nematoides em trigo (KHAN *et al.*, 1994), chá-preto (NEOG e BORA, 1999), cogumelo (NAGESH e REDDY, 2000), pimenta (KARTHIKEYAN *et al.*,

2000), grão-de-bico (BHARADWAJ *et al.*, 2000), e bananeira (SUNDARARAJU *et al.*, 2002).

Testes de mortalidade foram feitos utilizando-se extratos das folhas de várias plantas, inclusive do nim, contra o nematoide *Pratylenchus coffeae* Zimmermann em bananeira, e quase todas as espécies de plantas exibiram a atividade nematicida, resultando em mortalidade de 20,7% a 96,5 % em 24 h. Um dos três melhores extratos das plantas analisadas foi o de *A. indica*. Estudos com extratos mais diluídos revelaram que a melhor atividade obtida foi com o nim, resultando na mortalidade de grau mais elevado contra os *P. coffeae* (73,4 %) quando o período de exposição era de 20 h (SUNDARARAJU e CANNAYANE, 2002).

Foi avaliado o controle da população de *Radopholus similis* Coob em bananeira Cavendish cv. Dwarf, na Índia, por meio de mistura com vários produtos (nim, *Trichoderma viride* Pers e o nematicida carbofuran) (HARISH e GOWDA, 2001). O crescimento da bananeira aumentou em todos os tratamentos com redução da população do nematoide. Todavia, a mistura torta do nim + o agente de controle biológico + nematicida carbofuran foi a mais eficaz em reduzir a população do nematoide, melhorando o rendimento da cultura, crescimento da planta e o aumento da produção (76,3 t/ha) com uma relação de custo/benefício elevada. O melhor resultado obtido no controle integrado do nematoide *R. similis*, na Índia, foi com o uso da torta de nim + *T. viride* + carbofuran. A mesma combinação de tratamentos foi também a mais eficaz em aumentar a produção da bananeira (RAVI *et al.*, 2000).

Extratos de nim, carbofuran e agentes de biocontrole, tais como *P. penetrans* e *Glomus fasciculatum* Tul. e *C.Tul* separados ou em combinação, foram usados para o controle de *R. similis* em bananeiras na Índia. A integração dos quatro tratamentos foi a mais eficaz para aumentar o crescimento e o rendimento de planta, elevando a relação custo-benefício e reduzindo 95,16 % a

população do nematoide no solo e 89,27 % nas raízes (VIDYA e REDDY, 1998).

Além do efeito químico do nim já relatado, trabalhos têm mostrado um grande número de microrganismos associados às suas folhas (GEORGE *et al.*, 2005; TENGURIA e KHAN, 2011). A literatura apresenta trabalhos que apontam esses microrganismos como agentes promissores para o desenvolvimento de plantas e controle de fitopatógenos. Esses microrganismos que colonizam os tecidos internos das plantas sem causar danos ao hospedeiro são denominados endofíticos, os quais foram encontrados em várias espécies de plantas estudadas até o momento, embora estudos detalhados tenham sido realizados em poucas espécies vegetais (ZINNIEL *et al.*, 2002, STROBEL *et al.*, 2004, BERG *et al.*, 2005, OKUNISHI *et al.*, 2005). Pavlo *et al.* (2011) relataram efeitos positivos de bactérias sobre o desenvolvimento das plantas, produzindo substâncias que favorecem o crescimento e/ou que impedem o desenvolvimento de organismos patogênicos. Algumas espécies dessas bactérias produzem uma diversidade de compostos secundários que agem como antibióticos, fungicidas, antivirais, agentes imunossupressores e anticancerígenos (STURZ e KIMPINSKI 2004, MEKETE, 2009, ARAVIND *et al.*, 2010).

Vários trabalhos têm demonstrado o potencial de bactérias endofíticas na redução de danos causados por fungos, bactérias e vírus (STURZ *et al.*, 2000, PING e BOLAND 2004). As bactérias do gênero *Pseudomonas* produzem substâncias que estimulam o crescimento geral das plantas, incluindo desenvolvimento da raiz, germinação das sementes, melhor aproveitamento dos minerais e da água (NELSON 2004, SIDDIQUI 2006). A inoculação dessa bactéria na rizosfera para o controle de patógenos tem apresentado resultados positivos que a torna promissora como agente de controle biológico (AKHTAR e SIDDIQUI 2008, KAMEL *et al.*, 2010).

Os trabalhos visando à utilização de bactérias endofíticas no controle biológico de nematoides ocorreram de forma mais intensa nas últimas décadas. Muitos deles objetivaram isolar e identificar essas bactérias em diferentes espécies de plantas, algodão (MCINROY e KLOEPPER 1995), pepino (MAHAFEE e KLOEPPER 1997), batata (GARBEVA *et al.*, 2001) e pimenta (ARAVIND *et al.*, 2008, 2010).

As pesquisas sobre o efeito nematicida dessas bactérias envolvem principalmente sua ação contra os nematoides formadores de galhas (*Meloidogyne* spp.). A respeito das bactérias endofíticas facultativas destacam-se os estudos com *Pseudomonas* spp. Migula. A densidade das populações de *M. javanica* foi significativamente reduzida em experimentos com tomateiros, por ação de *P. aeruginosa* Schoeter (SIDDIQUI *et al.*, 2000, SIDDIQUI e EHTESHAMUL-HAQUE, 2001). Pode ser destacada, também, a utilização de outras espécies do gênero *Pseudomonas* no controle de *Meloidogyne* spp. em várias culturas, dentre elas a bananeira (JONATHAN *et al.*, 2006, SIDDIQUI *et al.*, 2007, ASHOUB e AMARA, 2010).

A literatura também apresenta resultados dessas bactérias sobre o desenvolvimento de *F. oxysporum* f. sp. *cubense*. Cardoso *et al.* (2012) observaram redução da germinação dos esporos e do crescimento micelial desse patógeno na presença de bactérias endofíticas de raízes de bananeira, e Gomes *et al.* (2009) verificaram redução de até 100 % da germinação de micrconídios do referido fungo na presença de bactérias associadas às folhas de nim. A ação de bactérias endofíticas sobre os fungos está associada principalmente com a produção de quitinases (SINGH *et al.*, 1999), que são capazes de degradar a parede celular dos mesmos.

Estudos também têm sido desenvolvidos no sentido de avaliar o efeito do nim em associação com microrganismos antagonistas para o controle de nematoides e de *F. oxysporum* f. sp. *cubense*. Javed *et al.* (2008) verificaram

efeitos significativos na combinação de extratos foliares de nim com *P. penetrans* no controle de *M. javanica* em tomateiro. Akila *et al.* (2011) constataram que a combinação de extratos vegetais, dentre eles o de nim, com agentes de controle biológico reduziram de forma efetiva a severidade do Mal-do-Panamá no campo em bananeira.

Silva (2010) observou que extratos de nim não filtrados em membrana Millipore apresentaram uma eficiência na redução da germinação de conídios de *foc* maior que os extratos esterilizados em membrana milipore e os aquecidos. A autora relata que durante as avaliações constatou-se a deformação e lise dos conídios. Para confirmação de a atividade germicida ser biológica, a autora testou os extratos de nim submetidos ao aquecimento de 80 °C por 20 minutos e verificou que houve um estímulo da germinação evidenciando ser a atividade inibitória dos extratos a *foc* microbiológica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABANORTE - ASSOCIAÇÃO CENTRAL DOS FRUTICULTORES DO NORTE DE MINAS. **Produtores de banana querem criar central**. Janaúba, Publicado 28 de out. 2008. Disponível em: <<http://www.abanorte.com.br/noticias/noticias-da-pagina-inicial/produtores-de-banana-querem-criar-central/>>. Acesso em: 10 fev. 2013.

AGRIANUAL- Anuário da Agricultura Brasileira. **Produção de frutas no Brasil**. São Paulo: FNP Consultoria, 2012, p. 183.

AGRIOS, G. N. Plant diseases caused by nematodes. In: _____ **Plant pathology**. 5 ed. Elsevier: Academic Press, 2004. p. 840-841.

AHMED, S.; GRAINGE, M. Potential of the neem tree (*Azadirachta indica*) for pest control and rural development. **Economic Botany**, New York, v. 40, n. 2, p. 201-209. 1986.

AKILA, R. *et al.* Combined application of botanical formulations and biocontrol agents for the management of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) causing Fusarium wilt in banana. **Biological Control**, Amsterdam, v. 57, p. 175–183, 2011.

AKHTAR, M.S.; SIDDIQUI, Z. A. Biocontrol of a root-rot disease complex of chickpea by *Glomus intraradices*, *Rhizobium* sp. and *Pseudomonas straita*. **Crop Protection**, [s.l.], v. 27, p. 410-417, 2008.

ARAVIND, R. *et al.* Screening of endophytic bacteria and evaluation of selected isolates for suppression of burrowing nematode (*Radopholus similis* Thorne) using three varieties of black pepper (*Piper nigrum* L.). **Crop Protection**, [s.l.], v. 29, p. 318-324, 2010.

ARAVIND, R. *et al.* Endophytic bacterial flora in root and stem tissues of black pepper (*Piper nigrum* L.) genotype: isolation, identification and evaluation against *Phytophthora capsici*. **Letters in Applied Microbiology**, Malden, v. 48, p. 58-64, 2008.

ASHOUB, A.H.; AMARA, M.T. Biocontrol Activity of Some Bacterial Genera Against Root-Knot nematode, *Meloidogyne incognita*. **Journal of American Science**, New York, v. 6, p. 321-328. 2010.

BERG, G. *et al.* Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi. **FEMS Microbiology Ecology**, Malden, v. 5, p.215-229, 2005

BHARADWAJ, P.; TRIVEDI, P. C. Assessment of nematophagous fungi and neem cake compatibility against *Heterodera cajani* on cowpea. **Indian Phytopathology**, New Delhi, v. 53, n. 4, p. 478-479, 2000.

CARDOSO, E. B.; LUQUINE, L. S.; SILVA, H. S. Aplicação conjunta de rizobactérias e bactérias endofíticas para o biocontrole do *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. In: JORNADA CIENTÍFICA, 6., 2012, Cruz das Almas. **Anais...** Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e fruticultura, 2006.

CHAKRABORTI, S. Non-synthetic chemical based management approaches for rice stem nematode. **Pest Management and Economic Zoology**, [s.l.], v. 7, n. 2, p. 161-165. 1999.

CIOCIOLA JÚNIOR, A. I.; MARTINEZ, S. S. **Nim**: Alternativa no controle de pragas e Doenças. Belo Horizonte: EPAMIG, 2002. 24 p. (Boletim Técnico, n. 67)

CORDEIRO, Z. J. M; KIMATI, H. Doenças da bananeira – *Musa* spp. **Manual de Fitopatologia** – Doenças das plantas cultivadas. 3ª ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. v. 2. p. 126-129.

FERREIRA JÚNIOR, A. **Atividade antifúngica de anonáceas a *Fusarium oxysporum***. 2003. 29 p. Monografia (Trabalho de conclusão de curso – Agronomia). Universidade Estadual de Montes Claros, Janaúba, 2003.

GARBEVA, P. *et al.* Analysis of endophytic bacterial communities of potato by plating and denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA based PCR fragments. **Microbial Ecology**, Cham, v. 41, p. 369-383. 2001.

GEORGE, K. J. *et al.* Endophytic mycoflora of inner bark of *Azadirachta indica* A. Juss. **Current Science**, Bangalore, v. 88, n. 2, p. 25, 2005.

GOMES, A. A. M. *et al.* Germinação de *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense na presença diferentes componentes de nim (*Azadirachta indica* A. Juss. In: FÓRUM DE GESTÃO PESQUISA ENSINO E EXTENSÃO DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MONTES CLAROS, 3., 2009, Montes Claros. **Anais ...** Montes Claros: UNIMONTES, 2009. Disponível em: <<http://www.fepeg.unimontes.br/index.php/fepeg/fepeg2009>>. Acesso: 22 fev. 2013.

HARISH, M.; GOWDA, D. N. Management of the burrowing nematode, *Radopholus similis* (Cobb, 1893) Thorne, 1949 infesting banana. **Indian Journal of Nematology**, New Delhi, v. 31, n. 1, p. 23-25, 2001.

JAVED, N. *et al.* The potential of combining *Pasteuria penetrans* and neem (*Azadirachta indica*) formulations as a management system for root-knot nematodes on tomato. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 120, p. 53-60, 2008.

JONATHAN, E. I. *et al.* Bioefficacy of *Pseudomonas fluorescens* on *Meloidogyne incognita* in banana. **Nematologia Mediterranea**, Bari, v. 34, p.19-25, 2006.

JONATHAN, E. I.; GAJENDRAN, G.; MANUEL, W. W. Management of *Meloidogyne incognita* and *Helicotylenchus multicinctus* in banana with organic amendments. **Nematologia Mediterranea**, Bari, v. 28, n. 1, p. 103-105, 2000.

KAMEL, M.Z. *et al.* Optimization of microbial biomass production as biocontrol agent against root knot nematode on faba plants. **Journal of American Science**, Washington, v. 6, p. 1122-1132, 2010.

KARTHIKEYAN, G. *et al.* Biological control of *Pythium aphanidermatum*, *Meloidogyne incognita* disease complex in chilli with organic amendments. **Madras Agricultural Journal**, Ghaziabad, v. 86, p. 320-323. 2000.

KOUL, O.; ISMAN, M. B.; KETKAR, C. M. Properties and uses of neem, *Azadirachta indica*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 68, p.1-11. 1990.

LOPES, P. S. **Aplicação de rizobactérias em explantes e plântulas de bananeira ‘Prata-Anã’ no controle de *Meloidogyne javanica* e no desenvolvimento de mudas.** 2011. 125 p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal no Semiárido) – Universidade Estadual de Montes Claros, Janaúba-MG, 2011.

MAHAFEE, W. F.; KLOPPER, J. W. Bacterial communities of the rhizosphere and endorhiza associated with field-grown cucumber plants inoculated with a plant growth promoting rhizobacterium or its genetically modified derivative. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, p. 344-353. 1997.

MATOS, A. P.; CORDEIRO, Z. J. M. Mal-do-Panamá: biologia e ecologia populacional. SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A BNANICULTURA, 5., , E WORKSHOP DO GENOMA *Musa.*, 2003, Paracatu-MG. **Anais...** Paracatu: 2003. p.57

MCINROY, J. A.; KLOPPER, J. W. Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. **Plant and Soil**, Crawley, v. 173, p. 333-342, 1995.

MEKETE, T. *et al.* Endophytic bacteria from Ethiopian coffee plants and their potential to antagonise *Meloidogyne incognita*. **Journal of Nematology**, New Delhi, v. 11, p. 117-127, 2009.

MELLO, A. F. S.; LOURENÇO, S. A.; AMORIM, L. Alternative products in the “in vitro” inhibition of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 62, n. 2, 2005.

MENDOZA, A. R.; SIKORA, R. A. Biological control of *Radopholus similis* in banana by combined application of the mutualistic endophyte *Fusarium oxysporum* strain 162, the egg pathogen *Paecilomyces lilacinus* strain 251 and the antagonistic bacteria *Bacillus firmus*. **BioControl**, [s.l.], v. 54, p. 263-272, 2009.

NAGESH, M.; REDDY, P. P.. Status of mushroom nematodes and their management in India. **Integrated Pest Management Reviews**, Dordrecht, v. 5, n. 3, p. 213-224. 2000.

NEOG, P. P.; BORA, B. C.. Organic amendments for the management of *Meloidogyne incognita* in tea nursery. **Journal of the Agricultural Science Society of North East India**, Ghaziabad, v. 12, n. 2, p. 203-206. 1999.

OKUNISHI, S. *et al.* Bacterial flora of endophytes in the maturing seed of cultivated rice (*Oryza sativa*). **Microbes and Environments**, Tokio, v. 20, p.168-177, 2005.

OLIVEIRA, N. M. **Avaliação do extrato de barbatimão no desenvolvimento de *Fusarium oxysporum***. 28 f. 2004. Monografia (Trabalho de conclusão de curso – Agronomia). Universidade Estadual de Montes Claros. 2004.

PAVLO, A. *et al.* Endophytic bacteria enhancing growth and disease resistance of potato (*Solanum tuberosum* L.). **Biological Control**, Amsterdam, v. 56, p. 43-49, 2011.

PING, L.; BOLAND, W. Signals from the underground: bacterial volatiles promote growth in Arabidopsis. **Trends in Plant Science**, [s.l.], v. 9, p. 263-269, 2004.

RAVI, K.; NANJEGOWDA, D.; REDDY, P. P. Integrated management of the burrowing nematode, *Radopholus similis* (Cobb, 1893) Thorne, 1949 on banana. **Pest Management in Horticultural Ecosystems**, Ghaziabad, v. 6, n. 2, p. 124-129, 2000.

RIBEIRO, L. F.; BEDENDO, I. P. Efeito inibitório de extratos vegetais sobre *Colletotrichum gloesporioides* – agente causal da podridão de frutos de mamoeiro. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.56, n.4, 1999.

RITZINGER, C. H. S.; FANCELLI, M. Manejo integrado de nematoides na cultura da bananeira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28: p.331-338, 2006.

RITZINGER, C. H. S. P.; COSTA, D. da. C. **Nematoide e alternativa de Manejo**, 2004. Disponível em: <http://www.Agencia.Cnptia.Embrapa.br/.../Livro_Banana_Cap 10 ID-gRfpPx 1siR.pdf> Acesso em: 13 abr. 2012.

SAMPAIO, D. B. *et al.* Colonização micorrízica arbuscular e tolerância ao mal-do-Panamá em mudas de banana-maçã. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 43, n. 3, p. 462-469, 2012.

SEAPA-MG-Secretaria de Estado d Agricultura, Pecuária e Abastecimento de Minas Gerais. **Dados do agronegócio**. Belo Horizonte 2013. Disponível em: <<http://www.agricultura.mg.gov.br/dados-do-agronegocio>> Acesso em: 10 mar. 2013.

SIDDIQUI, I.A.; EHTESHAMUL-HAQUE, S. Suppression of the root rot-root knot disease complex by *Pseudomonas aeruginosa* in tomato: The influence of inoculum density, nematode population, moisture and other plant associated bacteria. **Plant and Soil**, Crawley, v. 237, p.81-89, 2001.

SIDDIQUI, I. A. *et al.* Biological control of root rot- root knot disease complex of tomato. **Plant and Soil**, Crawley, v. 227, p.163-169, 2000.

SIDDQUI, Z. A.; BAGHEL, A. G. ;AKHTAR, E. M. S. Biocontrol of *Meloidogyne javanica* by Rhizobium and plant growth-promoting rhizobacteria on lentil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 23, p. 435-441, 2007.

SILVA, L. S. **Efeito de extratos foliares de Nim em *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense e na intensidade do Mal-do-Panamá em mudas de bananeira cv. Maçã.** 2010. 54 p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal no Semiárido) – Universidade Estadual de Montes Claros, Janaúba-MG, 2010.

SILVA, G. S.; PEREIRA, A. L. Efeito da Incorporação de Folhas de Nim ao Solo sobre o Complexo Fusarium x Meloidogyne em Quiabeiro. **Summa phytopathologica**, Botucatu, v. 4, n. 4, p. 368-370, 2008.

SINGH, P. P. *et al.* Biological control of Fusarium wilt of cucumber by chitinolytic bacteria. **Phytopathology**, East Lansing, v. 89, p.92-99, 1999.

SOUZA, A. P.; VENDRAMIM, J. Efeito translaminar, sistêmico e de contato de extrato aquoso de sementes de Nim sobre *Bemisia tabaci* (Genn.) biótipo B em tomateiro. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 34, n.1, p. 83-87, 2005.

STROBEL, G. *et al.* Natural products from endophytic microorganisms. **Journal of Natural Products**, Ohio, v. 67, p. 257-268, 2004.

STURZ, A.V.; CHRISTIE, H. R. NOWAK, J. Bacterial endophytes: Potential role in developing sustainable systems of crop production. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Apopka, v. 19, p. 1-30, 2000.

STURZ, A.V.; KIMPINSKI, J. Endoroot bacteria derived from marigolds (*Tagetes* spp) can decrease soil population densities of root-lesion nematodes in the potato root zone. **Plant and Soil**, Crawley, v. 262, p. 241-249, 2004.

SUNDARARAJU, P.; CANNAYANE, I. Antinemic activity of plant extracts against *Pratylenchus coffeae* infecting banana. **Indian Journal of Nematology**, New Delhi, v. 32, n. 2, p. 121-124. 2002.

SUNDARARAJU, P.; DEVI, R. L.; MANIMEKALAI, M. Analysis of best treatment and variety based on nematode population on banana using artificial neural networks. **Indian Journal of Nematology**, New Delhi, v. 32, n. 1, p. 84-85, 2002.

TENGURIA R. K.; KHAN, F. N. Distribution of endophytic fungi in leaves of *Azadirachta indica* A. JUSS. (Neem) of Panchmarhi biosphere reserve. **Current Botany**, Noida, v. 2, p. 27-29, 2011.

VENTURA, J. A.; HINZ, R. H. Controle das doenças de bananeira. In: ZAMBOLIM, Laércio *et al.* (Ed). **Controle de Doenças de Plantas: Fruteiras**. Viçosa: [s.n], 2002. v. 2, cap. 1, p. 839-906.

VIDYA, K.; REDDY, B. M. R. Integrated management of *Radopholus similis* infecting banana using plant product, nematicide and biocontrol agents. **Mysore Journal of Agricultural Sciences**, Ghaziabad, v. 32, n. 3, p. 186-190. 1998.

XAVIER, A. A. *et al.* Efeito do barbatimão no desenvolvimento de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* e na microbiota do solo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 38., 2005, Brasília-DF. **Anais...** Brasília: 2004. v. 29, p. S128. Suplemento

ZEM, A. C.; ALVES, E. J. **Observações sobre perdas provocadas por nematóides em bananeira (*Musa acuminata* Simm. e Sherp.) cv. Nanicão**. Cruz das Almas: EMBRAPA/CNPMPF, 1981. 10 p. (Boletim de Pesquisa n. 6)

ZEM, A. C.; BARREIRA, J. G.; TEIXEIRA, L. S. **Nematoides associados a bananeiras do estado do Ceará**. 1980. Disponível em:
<<http://docentes.esalq.usp.br/sbn/nbonline/ol%2004u/119-126%20pb.pdf>>
Acesso em: 10/12/ 2012.

ZEM, A. C.; VENTURA, J. A.; NOBREGA, A. C. Nematoides associados a diferentes cultivares de bananeira em Viana, ES. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 28, p. 11-22, 1984.

ZINNIEL, D. K.; LAMBRECHT, P.; HARRIS, B. N. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 2198-2208, 2002.

CAPÍTULO I

BACTÉRIAS DE NIM NO CONTROLE DE *Meloidogyne javanica* EM BANANEIRA

RESUMO

SOARES-MARTINS, Isac Pereira. **Bactérias de nim no controle de *Meloidogyne javanica* em bananeira**. 2013. Capítulo I. 87 p. Dissertação (Mestrado Produção Vegetal no Semiárido)- Universidade Estadual de Montes Claros, Janaúba- MG.¹

Os fitonematoides são responsáveis por perdas na produtividade da bananeira no Norte de Minas Gerais. O efeito nematocida de nim tem sido associado aos compostos químicos presentes em suas folhas ou torta de sementes. Entretanto, a associação de microrganismo endofíticos e epifíticos podem influenciar esta resposta. Portanto, objetivou-se com esse trabalho avaliar o efeito de bactérias associadas às folhas de nim sobre a mobilidade e a mortalidade de *Meloidogyne javanica in vitro* e o efeito de tais bactérias associadas ao extrato esterilizado de nim (EEN) sobre a penetração e a reprodução deste patógeno em mudas de bananeira ‘Prata-Anã’ e ‘Maçã’ respectivamente. De 28 isolados bacterianos avaliados sobre a mobilidade e a mortalidade de juvenis de segundo estágio (J2) de *M. javanica*, 57,14 % promoveram mortalidade superior a 50 %. Dez isolados bacterianos associados ao EEN reduziram entre 72,64 % e 97,13 % a penetração dos J2 de *M. javanica* nas raízes de mudas de bananeira ‘Prata-Anã’, mostrando que o efeito entre as bactérias de nim e o EEN foi sinérgico. Esse mesmo efeito também foi observado sobre a reprodução de *M. javanica* em casa de vegetação. O EEN promoveu o aumento do comprimento das plantas e reduziu o número de massas de ovos de *M. javanica* por sistema radicular de bananeira ‘Maçã’. Os isolados BNF 7 e BNF 2 associados ao EEN destacaram-se na redução do número de galhas e de massas de ovos. Esses resultados comprovaram o efeito sinérgico das bactérias do nim com o EEN e desponta como uma alternativa promissora para o controle biológico de *M. javanica* na bananeira.

Palavras chave: Controle biológico, nematoides das galhas, *Musa* spp., *Azadiractha indica*.

¹ Comitê de Orientação; Prof^a Regina Cássia Ferreira Ribeiro- DCA/UNIMONTES (Orientadora); Prof^a Adelica Aparecida Xavier- DCA/UNIMONTES (Coorientadora); Prof^a Silvia Niestche - DCA/UNIMONTES; Prof. Edson Hiydu Mizobutsi- DCA/UNIMONTES; Alnusa Maria de Jesus- EPAMIG-URENM

ABSTRACT

SOARES-MARTINS, Isac Pereira. **Bacteria from neem in the control of *Meloidogyne javanica* on plantain.** 2013. Chapter I. 87 p. Dissertation (Master in Plant Production in the semiarid) - Universidade Estadual de Montes Claros, MG-Janaúba¹.

The plant parasitic nematodes are responsible for losses in banana yield in the North of Minas Gerais. The nematicidal effect of neem has been associated with the chemical compounds present in the leaves or seed cake. However, the association of endophytic and epiphytic microorganism may influence that response. Therefore, the aim of this work was to evaluate the effect of bacteria associated with neem leaves on mobility and mortality of *Meloidogyne javanica* *in vitro* and the effect of such bacteria associated with sterilized neem extract (SNE) on the penetration and reproduction of that pathogen in plantlets of 'Prata-Anã' and 'Maçã' banana respectively. From 28 bacterial isolates evaluated on mobility and mortality of second stage juveniles (J2) of *M. javanica*, 57.14 % promoted more than 50 % of mortality. Ten bacterial isolates associated with SNE reduced from 72.64 % to 97.13 % penetration of J2 of *M. javanica* in the roots of 'Prata-Anã' banana plantlets, showing that the effect between bacteria from neem and SNE was synergistic. That same effect was also observed on the *M. javanica* reproduction in greenhouse. The SNE increased plants length and reduced the number of egg masses of *M. javanica* per root of 'Maçã' banana. The BNF7 and BNF 2 isolates associated with SNE stood out in reducing the number of galls and egg masses. These results confirmed the synergistic effect of bacteria from neem with SNE and emerges as a promising alternative for the biological control of *M. javanica* in banana plant.

Keywords: Biological control, root-knot nematodes, *Musa* spp., *Azadiractha indica*.

¹ Guidance committee: Prof. Regina Cássia Ferreira Ribeiro - DAC/UNIMONTES (Adviser); Prof. Adelica Aparecida Xavier - DAC/UNIMONTES (Co-adviser); Prof. Sílvia Niestche-DAC/UNIMONTES; Prof. Edson Hiydu Mizobutsi - DAC/UNIMONTES; Researcher Alniuza Maria de Jesus – EPAMIG-URENM.

1 INTRODUÇÃO

A banana (*Musa* spp. L) é uma das frutas mais consumidas no mundo, sendo explorada na maioria dos países tropicais. No Brasil, onde a bananeira é cultivada em todos os estados (AGRIANUAL, 2012), a região Norte-Mineira constitui-se em um dos polos de produção da cultura, sendo esse, altamente tecnificado e com a maior área de banana ‘Prata’ do mundo.

Trabalhos de pesquisa na região mostram um grande número de fitonematoides, dentre eles os do gênero *Meloidogyne* Goeldi, parasitando o sistema radicular de bananeiras em densidades populacionais crescentes (GUIMARÃES, 2011; NEVES *et al.*, 2009). Em geral os danos de fitonematoides aos bananais são diretamente proporcionais às suas populações, ocorrendo redução do tamanho, massa e atraso na maturação dos cachos, menor perfilhamento e morte das plantas (BORGES e SOUZA, 2004). *Meloidogyne* spp. se destaca pela sua ampla disseminação e por provocar perdas na cultura estimadas em 20 % (MENDOZA e SIKORA, 2009).

No manejo de fitonematoides na cultura da bananeira, o controle químico é o método mais usado no plantio e na condução da cultura. Contudo, esse método apresenta vários inconvenientes como custos elevados, intoxicação pela exposição aos produtos, contaminações de fontes de água e destruição da microflora (RITZINGER e FANCELLI, 2006). Alternativas de controle eficientes e que apresentem menor agressividade ao homem e ao meio ambiente, com viabilidade econômica, são desejáveis dentro do novo paradigma de produção sustentável. Dentre estas, a pesquisa tem investigado a incorporação de matéria orgânica, a adição de agentes de controle biológico e os extratos de origem vegetal. *Azadirachta indica* A. Juss popularmente conhecida como nim, é uma das plantas mais estudadas no controle de pragas e patógenos. Para

fitonematoides, essa planta tem se mostrado promissora quando empregada na forma de torta ou extrato vegetal (LOPES *et al.*, 2008; LYNN *et al.*, 2010). Os efeitos nematicidas do nim avaliados na literatura têm sido associados à presença de terpenoides, entretanto, quando se utilizam extratos vegetais, há diversos microrganismos endofíticos e epifíticos associados a diferentes partes da planta (TENGURIA e KHAN, 2011). É possível que tais microrganismos possam, de forma isolada ou combinada com os componentes químicos, causar alterações no ciclo de vida dos nematoides.

O controle biológico tem sido utilizado com sucesso na cultura da banana. Dentre os agentes antagonistas mais promissores destacam-se os fungos (MENDOZA e SIKORA, 2009), as rizobactérias (LOPES, 2011) e as bactérias endofíticas (JONATHAN *et al.*, 2006).

A associação de extratos de plantas ou compostos orgânicos com microrganismos pode ser uma técnica eficiente e viável no controle de nematoides. Javed *et al.* (2008) verificaram efeitos significativos na combinação de extratos foliares de nim com *P. penetrans* no controle de *M. javanica* em tomate. A combinação de extratos com microrganismos é importante pela atuação sinérgica dos efeitos de ambos e pelo fato do extrato poder servir de substrato para o desenvolvimento dos microrganismos. Logo, utilizar microrganismos endofíticos ou epifíticos de extratos foliares com efeito nematicida pode ser uma alternativa promissora no controle de nematoides. Assim, objetivou-se neste trabalho avaliar o efeito de bactérias isoladas de folhas de nim sobre a mobilidade e a mortalidade de juvenis de segundo estágio (J2) de *M. javanica in vitro* e sobre a penetração e a reprodução desse patógeno isoladamente ou associado ao extrato esterilizado de nim em mudas de bananeira em casa de vegetação.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no laboratório de Fitopatologia e na casa de vegetação do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal do Semiárido da UNIMONTES, *campus* de Janaúba-MG, de janeiro de 2011 a junho de 2012.

O inóculo de *M. javanica* foi obtido a partir da extração de ovos de raízes de tomateiros cv. Kada, cultivadas em casa de vegetação, seguindo a metodologia Hussey e Barker (1973) modificada por Bonetti e Ferraz (1981). A suspensão de ovos foi ajustada em câmaras de Peters em microscópio de objetiva invertida para 1.000 ovos.mL⁻¹. Para a obtenção de juvenis de segundo estágio (J2) de *M. javanica*, a suspensão de ovos foi transferida para câmaras de eclosão e incubadas por 48 horas a 25°C. Após esse período, os J2 de *M. javanica* foram recolhidos em becker e *ajustados* em câmaras de Peters para 1.000 e 100 J2.mL⁻¹ para os ensaios de mobilidade e mortalidade e o de penetração de J2 de *M. javanica*, respectivamente.

Para o ensaio do efeito de bactérias sobre a mobilidade e mortalidade de J2 de *M. javanica in vitro*, foram avaliadas 28 bactérias, sendo 17 provenientes do extrato fermentado de nim (BNF), 10 epifíticas (EPI) e uma endofítica (ENDO). Essas bactérias pertencem à bacterioteca do Laboratório de Fitopatologia da UNIMONTES, *campus* de Janaúba-MG.

Em câmara de fluxo laminar, as bactérias foram repicadas para *erlemeyers* contendo meio TSB ‘Trypic Soy Broth’ e foram acondicionados em agitador orbital ‘Shaker’ a 28 °C e agitados a 150 rpm por 48 horas. Em seguida, foram centrifugados a 10.000 rpm por 10 minutos; o sobrenadante foi descartado e a massa bacteriana obtida denominada ‘pélete’ foi adicionada solução salina (S.S - NaCl 0,85 %). Essa suspensão bacteriana foi ajustada em

espectrofotômetro para densidade ótica de 540 nanômetros ($OD_{540} = 0,5$ de absorbância).

Em poços de 300 μL de placas Elisa, adicionaram-se 20 μL da suspensão de 1000 J2.mL⁻¹ e 100 μL da suspensão bacteriana. Após 24 horas, a avaliação de mobilidade foi realizada pela contagem dos nematoides móveis e imóveis. A mortalidade foi avaliada conforme metodologia descrita por Chen e Dickson (2000) que, fundamentalmente, consiste em adicionar uma duas gotas de NaOH 0,1 M à suspensão de nematoides. A contagem foi realizada logo a seguir, considerando-se mortos os nematoides retos e imóveis, e vivos os retorcidos.

O ensaio foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com seis repetições e, como testemunhas foram utilizados água autoclavada, solução salina (NaCl - 0,85%) e aldicarbe 150 GR a 500 ppm. Os dados foram convertidos em porcentagem e submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de agrupamento de Scott-Knott (1974) a 5 % de probabilidade.

Os isolados que apresentaram percentuais de imobilidade e mortalidade acima de 50 % e que cresceram o suficiente para ajuste das suspensões bacterianas em espectrofotômetro para $OD_{540} = 0,5$ de absorbância com extrato esterilizado de nim (EEN) foram avaliados no ensaio de penetração em raízes de mudas de bananeira 'Prata-Anã'. Além daqueles isolados, avaliaram-se os EPI 4 e EPI 7 posteriormente isolados. Para a realização desse teste utilizou-se o EEN para calibração das bactérias e no ensaio da reprodução de *M. javanica* em casa de vegetação foram utilizados o EEN e extrato fermentado de nim (EFN).

Para o preparo desses extratos, 10 g de folhas frescas de nim (Coletadas nos ramos externos a aproximadamente dois metros do chão, de árvores de nim com oito anos de idade) foram triturados em liquidificador por um minuto com adição de 90 mL de água. A suspensão obtida permaneceu em repouso em um

erlenmeyer totalmente fechado com papel alumínio por 24 horas, sob temperatura ambiente (25-27 °C). Em seguida, filtrou-se em filtro Whatman de celulose obtendo o EFN que foi esterilizado em autoclave a 121°C a 1 atm por 20 minutos obtendo-se o EEN.

As bactérias foram multiplicadas em TSB e após 48 horas de incubação o pélete bacteriano obtido após a centrifugação (10.000 rpm/10 minutos) foi diluído no EEN e incubadas no *shaker* por mais 48 horas a 150 rpm. Em seguida, ajustou-se essa suspensão em espectrofotômetro para OD₅₄₀= 0,5 de absorbância.

Copos plásticos de 500 mL foram preenchidos com solo previamente esterilizado em autoclave a 121 °C/20minutos por três dias consecutivos, e as suspensões bacterianas obtidas foram utilizadas para ajustar a capacidade de campo desse solo em 70 %. O solo mais as suspensões bacterianas foram incubados nas condições de laboratório e, após 48 horas, mudas micropropagadas de bananeira ‘Prata-Anã’, com 15 dias de idade, foram transplantadas para os copos contendo solo mais suspensões bacterianas. Após três dias adicionou-se suspensão de 3 mL contendo 70, 100 e 100 J2 de *M. javanica* em três orifícios abertos ao redor da muda na 1ª, 2ª e 3ª bateria, respectivamente. Dez dias após o transplante das mudas, as raízes foram coletadas, lavadas e submetidas à coloração com fucsina ácida para contagem do número de J2 de nematoides que penetraram (BYRD *et al.*, 1983).

Os experimentos foram conduzidos em DIC com seis repetições, sendo que na primeira e na segunda bateria foram avaliadas 9 BNF e na terceira 5 EPI e 1 ENDO. As testemunhas foram água esterilizada e EEN. Os dados foram transformados em $\sqrt{x+1}$, submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knot (1974) a 5 % de probabilidade.

Os isolados que promoveram imobilidade e mortalidade acima de 50 %, que diferiram da testemunha água na inibição de penetração dos J2 de *M.*

javanica e que cresceram o suficiente para ajuste da suspensões bacterianas em espectrofotômetro para $OD_{540} = 0,5$ de absorbância com EEN, não além do isolado EPI 13, que foi avaliado em outros ensaios (dados não apresentados), foram avaliados em casa de vegetação para verificar o efeito das bactérias de nim isoladamente e associadas ao EEN sobre a reprodução de *M. javanica*.

Mudas de bananeira ‘Maçã’ completamente enraizadas foram transferidas para vasos plásticos de 3 litros de capacidade contendo solo arenoso previamente esterilizado em autoclave a 120 °C, 1 atm por três dias consecutivos. Em seguida, foram adicionados 100 mL das suspensões bacterianas dos isolados (BNFs 1, 2, 6, 7, 8, 9 e 10; EPIs 3, 6, 13, 16 e a ENDO) ao solo, ajustados em espectrofotômetro para $OD_{540} = 0,5$ de absorbância com água esterilizada ou EEN. As mudas foram transplantadas, e inoculadas com três mL contendo 3.000 ovos de *M. javanica* em três orifícios ao redor da muda. As plantas foram mantidas em casa de vegetação, irrigadas diariamente.

Após 60 dias foram avaliados: o número de galhas por sistema radicular, o número de massas de ovos, o número de ovos por sistema radicular, o número de J2 por 200cc de solo, extraídos de acordo com a técnica de Jenkins (1964), o fator de reprodução (População final/população inicial), o comprimento das palntas até a inserção da última folha, o diâmetro do pseudocaule, o número de folhas e a matéria seca da parte aérea.

O ensaio foi montado em casa de vegetação em blocos casualizados em esquema fatorial de 2 x 12 + 4 (dois meios para ajuste, água e EEN, 12 isolados e quatro testemunhas: Água, EEN, Carbofuran 300 SC - Carbofuran e EFN). Foram empregadas seis repetições e cada repetição constituiu-se de uma planta.

Os dados foram transformados em $\sqrt{x+1}$ e submetidos à análise de variância. As médias dos tratamentos foram comparadas pelos testes de Scott-Knott (1974) e as diferenças dos tratamentos para as testemunhas pelo teste de Dunnett, ambos a 5 % de probabilidade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve efeito significativo das bactérias testadas em relação às testemunhas sobre a mobilidade e a mortalidade dos J2 de *M. javanica* ($P \leq 0,01$) (TABELA 1). Dos isolados avaliados, 28,57 % e 57,14 % reduziram acima de 50 % da mobilidade e mortalidade de J2 de *M. javanica*, respectivamente. As bactérias BNF 8, BNF 7, EPI 2, ENDO, EPI 6, BNF 1, EPI 3 e BNF 10 destacaram-se dos demais isolados por proporcionarem índices de mortalidade dos J2 de *M. javanica*, superiores a 98,04 %, em relação à testemunha água. Esses resultados estão de acordo com os encontrados por Naves *et al.* (2004) que também observaram índices de imobilidade e mortalidade de até 100 % em J2 de *M. javanica* tratados com filtrados de bactérias endofíticas. Dawar *et al.* (2008) reportaram a redução da eclosão e aumento da mortalidade dos J2 de *M. javanica* com a utilização de isolados de *Bacillus* sp. Vários trabalhos estão sendo publicados sobre as espécies bacterianas com atividade nematocida (LI *et al.*, 2007; PADGHAM e SIKORA 2007; ARAVIND *et al.*, 2008; ZHENG *et al.*, 2008). Khan *et al.* (2010) observaram que dez isolados de *Bacillus thuringiensis* Berliner reduziram a eclosão e aumentaram a mortalidade dos J2 de *M. javanica* em comparação com a testemunha.

TABELA 1. Efeito de diferentes isolados de bactérias epifíticas (EPI), endofíticas (ENDO) e do extrato de nim fermentado (BNF) sobre a mortalidade e a mobilidade de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne javanica*.

| Tratamentos | % Imóveis | Tratamentos | % Mortos |
|--------------------|------------------|--------------------|-----------------|
| EPI 8 | 95,61 a | BNF 8 | 100 a |
| BNF 5 | 84,81 b | BNF 7 | 100 a |
| BNF 17 | 84,16 b | EPI 2 | 100 a |
| BNF 15 | 76,95 b | ENDO | 100 a |
| BNF 13 | 64,24 c | EPI 6 | 99,33 a |
| BNF 16 | 64,20 c | BNF 1 | 98,33 a |
| EPI 11 | 60,08 c | EPI 3 | 98,33 a |
| BNF 12 | 52,38 c | EPI 10 | 98,04 a |
| BNF 4 | 36,53 d | EPI 16 | 93,66 b |
| S.Salina | 35,26 d | BNF 2 | 92,43 b |
| EPI 1 | 34,57 d | Aldicarbe | 91,31 b |
| BNF 14 | 11,39 e | BNF 6 | 91,08 b |
| BNF 18 | 11,27 e | BNF 10 | 90,87 b |
| EPI 9 | 11,19 e | BNF 9 | 89,27 b |
| BNF 9 | 10,73 e | EPI 9 | 88,80 b |
| BNF 10 | 9,12 e | BNF 4 | 63,46 c |
| BNF 6 | 8,91 e | EPI 1 | 58,30 c |
| Aldicarbe | 7,93 e | EPI 12 | 40,75 d |
| EPI 12 | 7,88 e | EPI 11 | 39,91 d |
| BNF 2 | 6,28 e | BNF 13 | 35,75 d |
| BNF 11 | 2,5 f | BNF 16 | 34,09 d |
| EPI 10 | 1,96 f | BNF 12 | 27,71 e |
| EPI 3 | 1,66 f | BNF 15 | 23,04 e |
| BNF 1 | 1,66 f | S.S | 17,66 f |
| Água | 1,66 f | BNF 5 | 12,52 f |
| EPI 16 | 0,66 f | BNF 18 | 10,32 f |
| EPI 6 | 0,66 f | BNF 14 | 5,82 g |
| ENDO | 0 f | EPI 8 | 2,63 g |
| EPI 2 | 0 f | BNF 17 | 1,5 g |
| BNF 7 | 0 f | BNF 11 | 0 g |
| BNF 8 | 0 f | Água | 0 g |
| CV(%) | 36,18 | CV(%) | 13,98 |

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott-Knott (1974) ao nível de 5 % de probabilidade.

No experimento de penetração, houve efeito significativo ($P < 0,01$) do EEN e dos isolados avaliados sobre a penetração de J2 de *M. javanica* nas três baterias analisadas. O EEN inibiu a penetração do J2 entre 25,0 % e 87,78 % em comparação com a água (TABELA 2). Vários trabalhos mostram que a torta de nim é rica em diversos compostos nematicidas, como limonoides, fenóis, formaldeídos, entre outros (CIOCIOLA JR. e MARTINEZ, 2002; MARTINEZ, 2002). A presença de compostos tóxicos no EEN ao nematoide pode estar relacionada à inibição da redução da penetração dos J2 de *M. javanica*.

As bactérias BNFs 1, 2, 5 e 10, 7, 9 da primeira e da segunda bateria respectivamente e as EPIs 7, 4, 10 e 8 na terceira bateria reduziram entre 72,64 % e 96,77 % a penetração de J2 de *M. javanica* em comparação à testemunha água. Esse resultado revela o efeito sinérgico entre as bactérias e o EEN (TABELA 2), que ocorre possivelmente pelo fato de que como as bactérias são associadas às folhas do nim, nesse meio elas teriam capacidade de crescer e sintetizar substâncias tóxicas com ação sobre os J2 de *M. javanica*. Jie *et al.* (2013) relataram redução de 44,5 % na penetração de J2 de *M. incognita* em raízes de pepino pré-tratadas com filtrados de três fungos endofíticos isolados de plantas antagônicas.

Os isolados BNF 5, BNF 8, BNF 6, EPI 6 e ENDO não diferiram do EEN, mostrando que não houve sinérgismo entre eles. Já o isolado BNF 4 estimulou a penetração em 19,0 % em relação à testemunha água. Possivelmente este isolado tenha inativado os compostos do EEN tóxicos ao nematoide ou não produziu compostos com efeito nematicida. Rocha *et al.* (2011), avaliando o efeito de rizobactérias na penetração de J2 de *M. javanica* em mudas de bananeira, observaram que todos os isolados testados estimularam a penetração do patógeno.

TABELA 2. Médias de número de juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* presentes no sistema radicular de mudas de bananeira ‘Prata-Anã’, tratadas com suspensões de células de bactérias do extrato fermentado (BNF), epifíticas (EPI) e endofítica (ENDO) de folhas de nim.

| Tratamentos | Número de J2 | P.R.P¹ |
|--------------------|---------------------|--------------------------|
| BNF 1 + EEN | 1,00 a | 92,86 |
| BNF 2 + EEN | 3,83 b | 72,64 |
| BNF 5 + EEN | 7,00 c | 50,00 |
| EEN | 10,50 c | 25,00 |
| Água | 14,00 d | 0,00 |
| BNF 4 + EEN | 16,66 d | -19,00 |
| Média | 8,83 | |
| CV (%) | 25,22 | |
| BNF 10 + EEN | 1,33 a | 97,13 |
| BNF 7 + EEN | 3,00 a | 93,52 |
| BNF 9 + EEN | 3,33 a | 92,81 |
| EEN | 5,66 b | 87,78 |
| BNF 8 + EEN | 5,83 b | 87,42 |
| BNF 6 + EEN | 9,50 b | 79,35 |
| Água | 46,33 c | 0,00 |
| Média | 10,71 | |
| CV (%) | 19,49 | |
| EPI 7 + EEN | 0,83 a | 96,77 |
| EPI 4 + EEN | 3,83 a | 85,07 |
| EPI 10 + EEN | 3,83 a | 85,07 |
| EPI 8 + EEN | 4,00 a | 84,41 |
| EEN | 9,50 b | 62,98 |
| EPI 6 + EEN | 10,50 b | 59,08 |
| ENDO + EEN | 6,83 b | 73,38 |
| Água | 25,66 c | 0,00 |
| Média | 8,12 | |
| CV (%) | 25,72 | |

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Scott-Knott (1974) ao nível de 5 % de probabilidade.

¹ Percentual de redução da penetração (P.R.P) de J2 em relação à testemunha água. Dados transformados em $\sqrt{x + 1}$.

Nas baterias um, dois e três verifica-se uma redução significativa do número de nematoides nas raízes quando as bactérias foram associadas ao EEN em relação a testemunha EEN (TABELA 2).

Nenhuma das bactérias veiculadas em água reduziu o número de galhas em relação as testemunhas. Já a bactéria BNF 7 veiculada no EEN reduziu em 72,33% e 71,33% em relação a água e ao EFN, demonstrando efeito sinérgico da bactéria e do EEN.

Fixando-se os isolados verifica-se que EPI 16, EPI 13, BNF 6, BNF 7 e BNF 8 veiculadas no EEN reduziram o número de galhas quando as mesmas foram veiculadas em água. A eficiência dos extratos ním, verificada neste trabalho, na redução do número de galhas de *M. javanica* está em concordância com os resultados obtidos por outros autores (JAVED *et al.*, 2007; TRIFONOVA e ATANASOV, 2011).

TABELA 3. Médias de número de galhas de *Meloidogyne javanica* por sistema radicular de mudas de bananeira ‘Maçã’ tratadas com suspensões de células de bactérias do extrato fermentado de nim (BNF), epifíticas (EPI) e uma endofítica (ENDO), veiculadas em água e em extrato esterilizado de nim (EEN).

| Tratamentos | Número de galhas | |
|--------------------|--------------------------|-------------------------|
| | Água | EEN |
| ENDO | 506,33 Aa ^C | 301,83 Aa |
| EPI 13 | 1070,66 Bb ^{BC} | 279,66 Aa |
| EPI 16 | 629,00 Ab ^C | 921,00 Aa ^{BC} |
| EPI 3 | 834,33 Bb ^{BC} | 422,50 Aa ^C |
| EPI 6 | 539,00 Aa ^C | 309,83 Aa |
| BNF 1 | 573,66 Aa ^C | 277,33 Aa |
| BNF 10 | 270,83 Aa | 289,66 Aa |
| BNF 2 | 519,25 Aa ^C | 315,16 Aa |
| BNF 6 | 819,16 Bb ^{BC} | 390,83 Aa |
| BNF 7 | 811,50 Bb ^{BC} | 165,66 Aa ^{AD} |
| BNF 8 | 701,83 Bb ^C | 409,83 Aa ^C |
| BNF 9 | 287,33 Aa ^C | 482,33 Aa |
| Testemunhas | | |
| Água | 598,67 ^C | |
| EEN | 341,83 | |
| Carbofuran | 117,33 ^{AD} | |
| EFN | 577,83 ^C | |
| Média | 491,63 | |
| CV(%) | 48,52 | |

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha na diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (1974) a 5 % de probabilidade.

^{ABCD} Significativo pelo teste de Dunnett a 5 % de probabilidade, na coluna, para a testemunhas água, EEN, Carbofuran e EFN respectivamente.

Dados transformados em $\sqrt{x+1}$.

A testemunha EEN diferiu significativamente dos tratamentos EPI 13, EPI 3, BNF 6 e BNF 7 veiculados em água, com inibição do número de galhas entre 68,07 % e 57,87 %. Já para as bactérias veiculadas no EEN, esta testemunha foi superior em relação apenas a EPI 16, com inibição de 62,88 %. Lopes *et al.* (2008) avaliaram o efeito de diferentes doses de torta de nim sobre *M. javanica*. Esses autores constataram redução em comparação com a

testemunha de 18 %, 25 %, 42 % e 83 %, no número de galhas; e de 36 %, 59 %, 79 % e 93 %, no número de ovos, nas doses de 5, 10, 15 e 20 g/vaso, respectivamente.

O Carbofuran reduziu significativamente o número de galhas em 80,40 % e 79,69% em relação às testemunhas água e EFN, respectivamente; no entanto não diferiu significativamente da testemunha EEN (TABELA 3). No meio água, com exceção do isolado BNF 10, o Carbofuran 300 SC diferiu significativamente entre 89,04 % e 59,16 % dos demais isolados. Já para os isolados no meio EEN, verifica-se que ele foi superior estatisticamente apenas para os isolados EPI 16, EPI 3 e BNF 8, com redução de 87,26 %, 72,22 % e 71,37 %.

Para a variável número de massas de ovos por sistema radicular não houve interação significativa entre os fatores avaliados; entretanto, houve efeito isolado de ambos fatores ($P \leq 0,05$). Independente do isolado bacteriano, o meio EEN apresentou uma redução de 52,00 % do número de massas de ovos em relação à água (TABELA 4). O efeito do EEN sobre a redução do número de massas de ovos pode ter ocorrido pela redução da penetração como comentado anteriormente e/ou pela indução de resistência causada pelo EEN.

A literatura apresenta relatos sobre o efeito do nim como indutor de resistência em plantas. Guleria e Kumar (2006) observaram que plantas de gergelim (*Sesamo indicum* L. : Syn. *S. L. orientale*) que receberam a aplicação de extrato de nim tiveram uma redução de 75 % da incidência da mancha de alternaria em relação ao tratamento-controle e apresentaram atividade de fenilalanina amônia liase significativamente maior que a testemunha. Além disso, o nível de peroxidase foi dez vezes maior nas amostras que receberam o extrato. A produção de compostos que induzem a resistência das plantas ativada pelo EEN pode ter dificultado a reprodução de *M. javanica*.

TABELA 4. Efeito do EEN e da água sobre o número de massa de ovos de *Meloidogyne javanica* por sistema radicular de mudas de bananeira ‘Maçã’.

| Meios | Número de massas de ovos |
|--------------|---------------------------------|
| EEN | 26,20* |
| Água | 54,59 |
| CV (%) | 35,61 |
| Média | 40,20 |

*Significativo pelo teste F a 5 % de probabilidade, na coluna. Dados transformados em $\sqrt{x+1}$.

Independente do meio veiculador, os isolados, BNF 10, BNF 2, EPI 6, BNF 1, BNF 9, EPI 3 e BNF 7 apresentaram diferença significativa em comparação aos isolados ENDO, BNF 6, EPI 16, EPI 13 e BNF 8 (TABELA 5). As bactérias ENDO, BNF 6 e BNF 8 foram menos eficientes na redução da formação de massas de ovos. Embora tenham apresentado altos índices de mortalidade, 100 %, 91,08 % e 100 % respectivamente (TABELA 1), todas se comportaram semelhantes à testemunha EEN no teste de penetração (TABELA 2). Portanto, esse resultado confirma a falta de sinergismo destes isolados com o EEN de nim.

Na avaliação conjunta da comparação dos isolados nos meios com as testemunhas, constatou-se efeito significativo para a variável número de massas de ovos ($P \leq 0,05$). O isolado BNF 2 veiculado no EEN destacou-se como o tratamento biológico mais promissor para a redução da formação de massas, diferindo significativamente das testemunhas água e EEN.

Com exceção do isolado BNF 8, todos os isolados quando veiculados no EEN diferiram significativamente da testemunha água, promovendo inibição entre 82,21 % e 65,15 % respectivamente. Já quando veiculados na água, essa diferença só foi observada para os isolados BNF 2, BNF 10 e EPI 6, que reduziram em, respectivamente, 65,52 %, 72,96 % e 65,69 % essa variável.

TABELA 5. Médias de número de massa de ovos de *Meloidogyne javanica* por sistema radicular de mudas de bananeira ‘Maçã’ tratadas com suspensões de células de bactérias do extrato fermentado de nim (BNF), epifíticas (EPI) e uma endofítica (ENDO), veiculadas em água e em extrato esterilizado de nim (EEN).

| Tratamentos | Número de massas de ovos | | |
|-------------|--------------------------|---------------------|---------|
| | Água | EEN | Médias |
| BNF 2 | 31,66 ^A | 16,33 ^{AB} | 24,00 a |
| BNF 7 | 71,00 ^C | 17,83 ^A | 44,41 a |
| BNF6 | 73,66 ^C | 18,33 ^A | 46,00 b |
| BNF 10 | 24,83 ^A | 23,16 ^A | 24,00 a |
| EPI 3 | 44,00 | 25,83 ^A | 34,91 a |
| BNF 9 | 43,00 | 26,00 ^A | 34,50 a |
| EPI 16 | 73,66 ^C | 26,00 ^A | 49,83 b |
| ENDO | 56,33 | 29,83 ^A | 43,08 b |
| EPI 13 | 88,50 ^C | 30,66 ^A | 59,58 b |
| EPI 6 | 31,50 ^A | 32,00 ^A | 31,75 a |
| BNF 1 | 34,16 | 32,00 ^A | 33,08 a |
| BNF 8 | 82,83 ^C | 36,00 | 59,66 b |
| CV (%) | 35,43 | | 35,61 |
| Água | 91,83 ^C | | |
| EEN | 65,16 ^C | | |
| Carbofuran | 11,50 ^{AB} | | |
| EFN | 37,16 | | |

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (1974) a 5 % de probabilidade para a coluna da média.

^{ABCD} Significativo pelo teste de Dunnett a 5 % de probabilidade, na coluna, para as testemunhas água, EEN, Carbofuran e EFN, respectivamente.

Dados transformados em $\sqrt{x+1}$.

A testemunha Furadan diferiu significativamente das testemunhas água e EEN, promovendo redução de 87,47 % e 82,35 %, respectivamente, para a formação das massas de ovos. Ela também diferiu significativamente dos isolados BNF 7, BNF 6, EPI 16, EPI 13 e BNF 8, reduzindo significativamente entre 83,80 % e 87,00 % essa variável.

A literatura mostra que a combinação de extratos vegetais e/ou matéria orgânica com microrganismos potencializam o controle de fitonematoides,

diminuindo a reprodução dos mesmos através da inibição da formação das massas de ovos. Javed *et al.* (2008) testaram o efeito da combinação de folhas frescas de nim com *P. penetrans* sobre o desenvolvimento de *M. javanica* em mudas de tomate em três plantios consecutivos. Os autores verificaram efeito significativo desta combinação sobre a reprodução dos nematoides, atuando diretamente na redução das massas de ovos. Todavia, eles ressaltaram que os resultados não persistiram com o decorrer do tempo, e destacaram que essa combinação deve ser estudada com mais detalhes.

No experimento da combinação dos isolados bacterianos com o EEN sobre a reprodução de *M. javanica*, observou-se efeito independente dos meios de veiculação (água e EEN) apenas para a variável comprimento de plantas ($P \leq 0,05$). Independentemente dos isolados testados, o meio EEN proporcionou um aumento de comprimento das plantas, de 5,97 % quando comparado com o meio água (TABELA 6). Esse resultado corrobora os de Silva (2010), que observou incrementos de 20 e 40 % no comprimento de mudas de bananeira em casa de vegetação com adição de extratos de folhas frescas e desidratadas de nim, respectivamente. O incremento no comprimento de mudas provocado pelo EEN de nim nas plantas deve estar associado à constituição do mesmo. Segundo Padole e Thakkar (2009), a torta de nim é um potencial adubo orgânico, pois é rico em nutrientes como nitrogênio, fósforo e potássio além de um grande número de triterpenoides e aminoácidos.

Os resultados apresentados no trabalho demonstram que a combinação do EEN com as bactérias associadas às folhas de nim pode ser um método alternativo com grande potencial a ser explorado pelos produtores de banana na região Norte de Minas para o controle de *M. javanica*. Logo, outros trabalhos devem ser conduzidos para aprimorar as dosagens, formas de aplicação e o desenvolvimento de métodos que viabilizem o uso dessa prática no campo.

TABELA 6. Efeito da água e do extrato esterilizado de nim (EEN) sobre o comprimento de mudas de bananeira ‘Maçã’.

| Meios | Comprimento de mudas (cm) |
|--------------|----------------------------------|
| Água | 12,72 |
| EEN | 13,48* |
| CV (%) | 15,38 |

*Significativo pelo teste F a 5 % de probabilidade, na coluna.

4 CONCLUSÕES

- Bactérias associadas às folhas de nim causam imobilidade e mortalidade de juvenis de segundo estágio de *M. javanica*.
- O extrato esterilizado de nim reduz a penetração de J2 de *M. javanica* em raízes de mudas de bananeira Prata-Anã.
- As bactérias BNF 1, BNF 2, BNF 10, BNF 7, BNF 9, EPI 7, EPI 4, EPI 10 e EPI 8 agem de forma sinérgica com o EEN na redução da penetração de J2 de *M. javanica* em mudas de bananeira ‘Maçã’.
- Os isolados BNF 10, BNF 2, EPI 6, BNF 1, BNF 9, EPI 3 e BNF 7 são os mais eficientes na redução das massas de ovos em mudas de bananeira ‘Maçã’.
- Os isolados BNF 7 e BNF 2 veiculados no EEN são os tratamentos biológicos mais eficientes na redução da formação de galhas e na redução do número de massas de ovos de *M. javanica*, respectivamente, em mudas de bananeira ‘Maçã’.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIANUAL: Anuário da Agricultura Brasileira. **Produção de frutas no Brasil**. São Paulo: FNP Consultoria, 2012, p.183.

ARAVIND, R. *et al.* Endophytic bacterial flora in root and stem tissues of black pepper (*Piper nigrum* L.) genotype: isolation, identification and evaluation against *Phytophthora capsici*. **Letters in Applied Microbiology**, Malden, v.48, p.58-64, 2008.

BONETI, J. I. S.; FERRAZ, S. Modificação do método de Hussey e Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* em raízes de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 6, n. 3, p. 553, 1981.

BORGES, A. L.; L. S. SOUZA. **O Cultivo da Bananeira**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004. 279 p.

BYRD JR, D.W.; KIRKPATRICK, T.; BARKER, K. R. An improved technique for clearing and staining plant tissues for detection of nematodes. **Journal of Nematology**, New Delhi, v. 15, p. 142-143, 1983.

CHEN, S.Y.; DICKSON, D.W. A technique for determining live second-stage juveniles of *Heterodera glycines*. **Journal of Nematology**, New Delhi, v. 32, p. 117-121, 2000.

CIOCIOLA JÚNIOR, A. I.; MARTINEZ, S. S. **Nim**: Alternativa no controle de pragas e Doenças. Belo Horizonte: EPAMIG, 2002. 24 p. (Boletim Técnico, n. 67)

DAWAR, S.; TARIQ, M.; ZAKI, M. J. Application of *Bacillus* species in control of *Meloidogyne javanica* (TREUB) Chitwood on cowpea and mash bean. **Pakistan Journal of Botany**, Islamabad, v. 40, p. 439-444, 2008.

GUIMARÃES, C. P. **Controle biológico de fitonematoides na cultura da bananeira no Norte de Minas Gerais**. 2011. 90 p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal)- UNIMONTES, Janaúba-MG, 2011.

GULERIA, S.; KUMAR, A. *Azadirachta indica* leaf extract induces resistance in sesame against *Alternaria* leaf spot disease. **Journal of cell and Molecular Biology**, Istambul, v. 5, p. 81-86, 2006.

JAVED, N. *et al.* The potential of combining *Pasteuria penetrans* and neem (*Azadirachta indica*) formulations as a management system for root-knot nematodes on tomato. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 120, p. 53-60, 2008.

JAVED, N. *et al.* Protective and curative effect of neem (*Azadirachta indica*) formulations on the development of root-knot nematode *Meloidogyne javanica* in roots of tomato plants. **Crop Protection**, [s.l.], v. 26, p. 530-534, 2007.

JENKINS, W. R. A rapid centrifugal- flotation technique for separating nematodes from soil. **Plant Disease Reporter**, Saint Paul, v. 48, n. 9, p. 692, 1964.

JIA, C. *et al.* Potential antagonism of cultivated and wild grass–endophyte associations towards *Meloidogyne incognita*. **Biological Control**, [s.l.], v. 64, p. 225–230, 2013.

JONATHAN, E. I. *et al.* Bioefficacy of *Pseudomonas fluorescens* on *Meloidogyne incognita* in banana. **Nematologia Mediterranea**, Bari, v. 34, p. 19-25, 2006.

KHAN, M. Q. *et al.* Evaluation of *Bacillus thuringiensis* isolates against root-knot nematodes following seed application in orka na mungbean. **Pakistan Journal of Botany**, Islamabad, v. 42, p. 2903-2910, 2010.

LI, X. Q. *et al.* Resistance to root-knot nematode in tomato roots expressing a nematicidal *Bacillus thuringiensis* crystal protein. **Plant Biotechnology Journal**, Malden, v. 5, p. 455-464, 2007.

LOPES, E. A.; FERRAZ, S.; FREITAS, L. G. de; FERREIRA, P. A. Controle de *Meloidogyne javanica* com diferentes quantidades de torta de nim (*Azadirachta indica*). **Revista Trópica**, Chapadinha, v. 2, n. 1, p. 17, 2008.

LYNN, O. M. *et al.* Effects of Azadirachtin and Neem-based Formulations for the Control of Sweetpotato Whitefly and Root-knot Nematode. **Korean Society For Applied Biological Chemistry**, Dordrecht, v. 53, n. 5, p.598-604, 2010.

MARTÍNEZ, S. S. **O nim – *Azadirachta indica***: natureza, usos múltiplos, produção. Londrina: IAPAR, 2002. 142 p.

MENDOZA, A. R.; SIKORA, R. A. Biological control of *Radopholus similis* in banana by combined application of the mutualistic endophyte *Fusarium oxysporum* strain 162, the egg pathogen *Paecilomyces lilacinus* strain 251 and the antagonistic bacteria *Bacillus firmus*. **BioControl**, [s.l.], v. 54, p. 263-272, 2009.

NAVES, R. L.; CAMPOS, V. P.; SOUZA, R. M. Filtrados de culturas bacterianas endofíticas na motilidade, mortalidade e eclosão de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne javanica*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, p. 384-388, 2004.

NEVES, W. S.; DIAS, M. S. C.; BARBOSA, J. G. Flutuação Populacional de Nematoides em Bananais de Minas Gerais e Bahia (Anos 2003 a 2008). **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, p. 281 -286, 2009.

PADOLE, L.; THAKKAR, P. Neem use and potential in agriculture. **Neem Foundation**, Mumbai, 2009. Disponível em:
<<http://www.neemfoundation.org/neem-articles/neem-in-organic-farming/agricultural-usepotential.pdf>>. Acesso em: 15/01/2013

PADGHAM, J. L.; SIKORA, R. A. Biological control potential and modes of action of *Bacillus megaterium* against *Meloidogyne graminicola* on rice. **Crop Protection**, [s.l.], v.26, p. 971-977, 2007.

RITZINGER, C. H. S.; FANCELLI, M. Manejo integrado de nematoides na cultura da bananeira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, p. 331-338, 2006.

ROCHA, L. S. *et al.* Influência de diferentes isolados de rizobactérias na penetração de juvenis de *Meloidogyne javanica* em bananeira Prata-Anã. In: Congresso Brasileiro de Fitopatologia, XLIV. 2011, Bento Gonçalves RS. **Anais...** Tropical Plant Pathology, 2011. p. 685.

SILVA, L. S. Efeito de extratos foliares de nim em *Fusarium oxysporum* f. *sp. cubense* e na intensidade do Mal-do-Panamá em mudas de bananeira cv. **Maçã**. 2011. 54 p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal)-UNIMONTES, 2010.

TENGURIA, R. K.; KHAN F. N. Distribution of endophytic fungi in leaves of *Azadirachta indica* A. JUSS. (Neem) of Panchmarhi biosphere reserve. **Current Botany**, Noida, v. 2, p. 27-29, 2011.

TRIFONOVA, Z.; ATANASOV, A. Control of potato cyst nematode *Globodera rostochiensis* with some plant extracts and neem products. **Bulgarian Journal of Agricultural Science**, Sofia, v. 17, n. 5, p. 623-627, 2011.

ZHENG, L. *et al.* Nematicidal endophytic bacteria obtained from plants. **Annals of Microbiology**, Yunnan, v. 58, n. 4, p. 569-572, 2008.

CAPÍTULO II

**BACTÉRIAS DE NIM SOBRE O COMPLEXO *Meloidogyne javanica* x
Fusarium oxysporum f. sp. *cubense* EM BANANEIRA ‘MAÇÃ’**

RESUMO

SOARES-MARTINS, Isac Pereira. **Bactérias de nim sobre o complexo *Meloidogyne javanica* x *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* em bananeira maçã.** 2013. 87 p. Dissertação (Mestrado Produção Vegetal no Semiárido) - Universidade Estadual de Montes Claros, Janaúba- MG.¹

A interação *Meloidogyne-Fusarium* pode causar grandes perdas na produtividade da banana. O uso de nim e de agentes de controle biológico tem sido investigado para uso no manejo destes patógenos. Assim, objetivou-se nesse trabalho avaliar o efeito *in vitro* de bactérias associadas às folhas de nim sobre o antagonismo a *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (*foc*) e avaliar o efeito dessas bactérias associado ao extrato esterilizado de nim (EEN) de forma isolada sobre *Meloidogyne javanica* e *foc* e sobre o complexo *M. javanica* x *foc* em mudas de bananeira ‘Maçã’ em casa de vegetação. Foram avaliados 35 isolados bacterianos isolados de folhas de nim nos testes de germinação, e 22 nos testes de crescimento micelial (CM). O efeito sobre CM foi realizado pela técnica de pareamento dos microrganismos em placa de Petri contendo BDA, após sete dias de incubação mediu-se o diâmetro da colônia de *foc*. Para o ensaio de germinação de microconídios de *foc*, preparou-se uma mistura de 0,5 mL da suspensão de 10^5 esporos de *foc*/mL mais 0,5 mL das suspensões bacterianas ajustadas na suspensão final em: $DO_{540} = (0,125; 0,25; 0,375$ e $0,5)$ ou 0,5 mL do EEN ajustado em $(0,75 \%, 1,5 \%, 2,25 \%$ e $3 \%)$. Após 20 h em escuro contínuo a 28°C a germinação foi quantificada. As testemunhas constaram de água e solução salina esterilizada. Em casa de vegetação utilizaram-se os seis melhores isolados para avaliação do seu efeito veiculado em extrato de nim. Mudas de bananeira ‘Maçã’ foram plantadas em solo previamente enriquecido com as suspensões bacterianas veiculadas em EEN. Avaliaram-se 4 tratamentos: ausência de patógenos (AP), *M. javanica* (Mj), *foc* e Mj+*foc*. Após 15 dias, as mudas foram transplantadas para solo contendo 3.000 ovos de *M. javanica* e $1,2 \times 10^6$ ufc de *foc*/g de solo. Após 60 dias do transplante, avaliou-se: o comprimento das mudas, o diâmetro do pseudocaule, o número de folhas, a matéria fresca da parte aérea (MFPA), a matéria fresca do sistema radicular (MFR), o número de galhas por sistema radicular, o número de massas de ovos e número de ovos por sistema radicular, o número de J2 por 200cc de solo e a

¹ Comitê de Orientação; Prof^a Regina Cássia Ferreira Ribeiro- DCA/UNIMONTES (Orientadora); Prof^a Adelica Aparecida Xavier- DCA/UNIMONTES (Coorientadora); Prof^a Silvia Niestche - DCA/UNIMONTES; Prof^o Edson Hiydu Mizobutsi- DCA/UNIMONTES; Alnusa Maria de Jesus- EPAMIG-URENM

severidade do Mal-do-Panamá. Houve redução de até 35,57 % do CM de *foc* na presença de 45,45 % dos isolados bacterianos. O extrato fermentado de nim causou lise nos microconídios de *foc*. Já, os extratos de nim, centrifugado e esterilizado estimularam a germinação de *foc*. A redução da germinação de esporos de *foc* foi linear com o aumento da concentração de células bacterianas em 82,85 % dos isolados testados. Em casa de vegetação, o isolado EPI 6 se destacou na promoção de crescimento dentro do complexo *Mj x foc*. Já o isolado BNF 9 foi o mais promissor na redução do número de ovos, do fator de reprodução e na redução da severidade do Mal-do-Panamá dentro do complexo *Mj x foc*.

Palavras chave: Nematóide das galhas, *Azadiractha indica*; *Musa* spp.; controle biológico

ABSTRACT

SOARES-MARTINS, Isac Pereira. **Bacteria from neem on the *Meloidogyne javanica* x *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* complex in 'Maçã' banana plant.** 2013. Chapter II. 87 p. Dissertation (Master in Plant Production in the semiarid) - Universidade Estadual de Montes Claros, MG-Janaúba¹.

The *Meloidogyne-Fusarium* interaction can cause major losses in of banana yield. The use of neem and biological control agents has been investigated for use in the management of these pathogens. Thus, this work aimed to evaluate the *in vitro* effect of bacteria associated with neem leaves on the antagonism to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (*foc*) and to evaluate the effect of the bacteria associated with sterile neem extract (SNE) in isolated way on *Meloidogyne javanica* and *foc* and on the *M. javanica* x *foc* complex of 'Maçã' banana plantlets in greenhouse. They were evaluated 35 bacterial isolates isolated from neem leaves in germination tests, and 22 in tests of mycelial growth (MG). The effect on MG was performed by the technique of microorganisms pairing in Petri dish containing PDA, after seven days incubations the diameter of the *foc* colony was measured. For testing germination of *foc* microconidia, it was prepared a mixture of 0.5 ml of the suspension of 10^5 spore *foc* / ml plus 0.5 ml of bacterial suspensions adjusted in the final suspension: $DO_{540} = (0.125, 0.25; 0.375 \text{ and } 0.5)$ or 0.5 mL of the adjusted SNE (0.75 %, 1.5 %, 2.25 % and 3 %). The germination was quantificada after 20 h in continuous darkness at 28 °C. The control consisted of water and sterile saline solution. In the greenhouse the best six isolates were used to assess their effect in neem extract. 'Maçã' banana plantlets were planted on soil previously enriched with the bacterial suspensions in SNE. They were evaluated 4 treatments: without pathogens, *M. javanica* (*Mj*), *foc* and *Mj* + *foc*. After 15 days, the plantlets were transplanted to soil containing 3.000 eggs of *M. javanica* and 1.2×10^6 cfu *foc* / g soil. After 60 days of transplantation, they were evaluated: the plantlets length, pseudostem diameter, number of leaves, shoot fresh matter, root fresh weight, the number of galls per root, the number of egg masses and number of eggs per root, the number of J2 per 200cc of soil and the Panama disease severity. There was a reduction of up to 35.57 % of MG

¹ Guidance committee: Prof. Regina Cássia Ferreira Ribeiro - DAC/UNIMONTES (Adviser); Prof. Adelica Aparecida Xavier - DAC/UNIMONTES (Co-adviser); Prof. Silvia Niestche-DAC/UNIMONTES; Prof. Edson Hiydu Mizobutsi - DAC/UNIMONTES; Researcher Alniuza Maria de Jesus – EPAMIG-URENM.

of *foc* in the presence of 45.45 % of the bacterial isolates. The fermented extract of neem caused lysis of microconidia of *foc*. Nevertheless, neem extracts, centrifuged and sterilized ones stimulated *foc* germination. The reduction in *foc* germination was linear with increasing concentration of bacterial cells in 82.85 % of the tested isolates. In the greenhouse, the EPI 6 isolate excelled in promoting growth within the complex *Mj* x *foc*. However the BNF 9 isolate was the most promising in reducing the number of eggs, reproductive factors and in reducing the severity of the Panama disease within the complex *Mj* x *foc*.

Key-words: Root-knot nematode, *Azadiractha indica*; *Musa* spp.; Biological control

1 INTRODUÇÃO

Dentre os principais problemas fitossanitários da bananeira estão os fitonematoides e o Mal-do-Panamá, causado pelo fungo de solo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (E.F. Smith) (*foc*). Este fungo está distribuído em diferentes condições edafoclimáticas em todo o mundo. Infecta diversas variedades de bananeira e causa prejuízos aos bananicultores, por seu grande potencial destrutivo e pela dificuldade de aplicação de medidas de controle devido à sua grande capacidade de sobrevivência no solo, sendo realizado, basicamente, através do uso de variedades resistentes (CASTRO *et al.*, 2008). No entanto, essas variedades são pouco apreciadas pelos consumidores.

Além de *foc*, diversas espécies de *Meloidogyne* são relatadas associadas às raízes de bananeira; entretanto, as de maior ocorrência e amplamente distribuídas nos estados brasileiros são *M. incognita* e *M. javanica* (ZEM *et al.*, 1980.; ZEM *et al.*, 1984). Vários estudos revelam que o complexo entre *Meloidogyne* spp. e *Fusarium* spp. aumenta a severidade da fusariose (MOURA *et al.*, 2001, NAJI e ABU-GHARBIH, 2004; SILVA e PEREIRA, 2008; FISHER *et al.*, 2010) e dificulta o controle dessas doenças.

Controle químico, adubação equilibrada, condução adequada do bananal e utilização de mudas micropropagadas são medidas de controle que podem ser empregadas para o controle de *foc* e de fitonematoides. Contudo, as mudas micropropagadas, ao mesmo tempo em que são livres de nematoides e de *foc*, também estão isentas de microrganismos benéficos, o que as torna altamente suscetíveis. Smith *et al.* (1997) relatam que tais mudas são mais suscetíveis a patógenos como *foc* e nematoides. Portanto, como *foc* pode sobreviver vários anos no solo através de clamidósporos, e os nematoides através de ovos ou em hospedeiros alternativos (AGRIOS, 2005), o uso de práticas inadequadas na

implantação do bananal bem como na condução podem proporcionar aumento do inóculo no campo e dificultar o controle dessas doenças. Diante das dificuldades em controlar o Mal-do-Panamá assim como os nematoides pelas características desses patógenos, trabalhos têm sido desenvolvidos com agentes de controle biológico e extratos vegetais como o do nim, de forma isolada ou em associação (JAVED *et al.*, 2008; JONATHAN *et al.*, 2000; MENDOZA; SIKORA, 2009; SAMPAIO *et al.*, 2012).

Dentre os agentes de controle biológico, estudos com microrganismos endofíticos têm-se intensificado graças às suas potencialidades como agente de promoção de crescimento e proteção de plantas. As bactérias do gênero *Pseudomonas*, por exemplo, produzem substâncias que estimulam o crescimento geral das plantas (AKHTAR e SIDDIQUI 2008, KAMEL *et al.*, 2010). Pode ser destacada, também, a utilização dessas bactérias para o controle de *Meloidogyne* spp. em várias culturas, dentre elas a bananeira (JONATHAN *et al.*, 2006, RODRIGUEZ-ROMERO *et al.*, 2007, SIDDIQUI *et al.*, 2007, ASHOUB e AMARA, 2010). A literatura também apresenta resultados dessas bactérias sobre o desenvolvimento de *foc* (GOMES *et al.*, 2009; CARDOSO *et al.*, 2012). Ação de bactérias endofíticas sobre os fungos está associada principalmente com a produção de quitinases (SINGH *et al.*, 1999) que são capazes de degradar a parede celular dos fungos.

Os efeitos do nim sobre os nematoides são bem conhecidos, mas pouco se sabe da sua ação sobre *foc*. Silva (2011) observou redução da germinação de esporos de *foc* na presença de extratos de nim “*in natura*”. Posteriormente, Gomes *et al.* (2009) isolaram bactérias desses extratos e verificaram efeito semelhante ao observado por Silva (2011). Assim, é possível que associação de extratos de nim com bactérias epifíticas e endofíticas de suas folhas possa atuar sobre o desenvolvimento de *foc* e nematoides. Portanto, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito *in vitro* de extratos e de bactérias de nim sobre o

antagonismo a *foc* e avaliar a utilização do enriquecimento do extrato de nim com essas bactérias no complexo *M. javanica* x *F. oxysporum* f. sp. *cubense*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no laboratório e na casa de vegetação de Fitopatologia da Universidade Estadual de Montes Claros, *campus* Janaúba, MG. Utilizaram-se 35 isolados de bactérias associadas às folhas de nim (*Azadiractha indica*), sendo 17 provenientes do extrato foliar fermentado (BNF), 17 epifíticas (EPI) e uma endofítica (ENDO), provenientes da coleção de bactérias do laboratório de Fitopatologia.

Em todos os ensaios *in vitro* utilizou-se o isolado 124 de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* (*foc*). O fungo foi multiplicado em meio SNA (Synthetic Nutrient-poor Agar, 20g de SNA/L água), em BOD sob temperatura de 28°C e fotoperíodo de 12 h por sete dias. Para o teste em casa de vegetação, 60 mL da suspensão de esporos dos isolados de *foc* (106, 124 e 132) foram adicionados ao meio fubá (500 gramas de fubá; 50 gramas de areia; 100 mL de água destilada) previamente autoclavado por três vezes consecutivas a 120 °C/ 20 minutos e, em intervalos de 24 horas. O meio foi incubado por 15 dias em ambiente climatizado (± 25 °C). Para determinação do número de unidades formadoras de colônias (ufc) do inóculo, utilizou-se a técnica de diluição em série. Para isso, um grama do meio fubá foi diluído até 10^{-6} . As suspensões de 10^{-5} e 10^{-6} foram plaqueadas em meio SNA, e a quantificação das ufc foi realizada 48 horas depois. A concentração final obtida após contagem foi de $1,2 \times 10^6$ ufc.

Para o teste de antagonismo, os isolados bacterianos foram cultivados em meio TSA (Tryptic Soy Agar; 20g de TSA/L de água) por 24 horas em BOD sob escuro contínuo a 28 °C. Para isso, um disco de cinco milímetros de meio SNA contendo micélio e conídios de *foc*, cultivado por sete dias, foi transferido para uma placa de Petri contendo meio BDA (200 g de Batata; 20 g de dextrose; 20 g de Ágar/L de água) a uma distância de um centímetro da borda. Na outra

extremidade, foi realizada uma risca contínua com uma alça de platina contendo suspensão de células bacterianas cultivadas em meio TSA (20g.L^{-1}). As colônias foram incubadas em BOD durante sete dias a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ em condição de escuro contínuo. Após esse período, com auxílio de uma régua mediu-se o raio da colônia fúngica no sentido de maior comprimento. No tratamento-controle não houve adição das bactérias. Para o cálculo da porcentagem de inibição do crescimento micelial, foi aplicada a fórmula: % de inibição relativa (IR) ou % de estímulo relativo (ER) = $[(\text{RC}-\text{RX}) / \text{RC}] \times 100$, onde: RC = raio da colônia de *foc* no tratamento controle; RX = raio da colônia de *foc* pareado com os isolados bacterianos.

O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com cinco repetições. Os resultados foram submetidos à análise de variância e ao teste de Scott-Knott (1974) para comparação das médias ($P \leq 0,01$).

O teste de germinação de esporos de *foc* foi realizado na presença de extratos aquosos de folhas de nim e de 35 isolados das bactérias associadas às folhas de nim.

Para o preparo desses extratos, 10 g de folhas frescas de nim (coletadas em novembro de 2012 nos ramos externos, a aproximadamente dois metros do chão, de árvores de nim com oito anos de idade) foram trituradas em liquidificador por um minuto com adição de 90 mL de água. A suspensão obtida permaneceu em repouso em um erlenmeyer totalmente fechado com papel alumínio por 24 horas, sob temperatura ambiente ($25-27\text{ }^{\circ}\text{C}$). Após esse período, realizou-se filtração em filtro Whatman de celulose. Utilizaram-se três formas de extrato: 1) Extrato fermentado de nim filtrado em papel Whatman de celulose (EFN); 2) Extrato esterilizado nim (EEN), que consistiu em esterilizar o EFN em autoclave a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ a 1 atm por 20 minutos; 3) Extrato centrifugado, 10.000

rpm/10 minutos (EC). Os extratos EFN, EEN e EC foram ajustados para as concentrações de 0,75 %, 1,5 %, 2,25 % e 3 %, respectivamente.

A germinação de microconídios de *foc* na presença dos isolados bacterianos de folhas de nim foi avaliada em três ensaios, com nove BNFs no primeiro, oito no segundo e 17 EPs e um ENDO no terceiro. Os isolados foram cultivados em meio TSB 'Trypic Soy Broth' por 48 horas e ajustados em espectrofotômetro para densidade ótica (DO)₅₄₀, em quatro níveis de absorvância (0,25; 0,5; 0,75 e 1) com solução salina (NaOH 0,85 %).

Em eppendorf de 2 mL adicionou-se 0,5 mL das suspensões bacterianas ou das concentrações dos extratos mais 0,5 mL da suspensão de 2×10^5 esporos de *foc*/mL, de forma que a suspensão final atingisse: DO₅₄₀= (0,125; 0,25; 0,375 e 0,5) para os isolados bacterianos e (0,375 %, 0,75 %, 1,125 % e 1,5 %). Os *eppendorfs* foram incubados em escuro contínuo a 28 °C. As testemunhas constaram de água ou solução salina esterilizada. Após 20 h a germinação foi paralisada com lactofenol, e em câmara de Newbaeur quantificaram-se os primeiros 100 esporos bem individualizados. Consideraram-se esporos germinados aqueles com tubo germinativo maior ou igual ao maior comprimento do esporo.

O experimento foi conduzido em DIC em esquema fatorial 3 x 4 + 2, sendo três extratos, quatro concentrações e duas testemunhas. No ensaio com isolados bacterianos utilizou-se delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial de 9, 8 e 18 x 4 +2 para as baterias 1, 2 e 3, sendo 9, 8 e 18 o número de isolados, quatro as concentrações das suspensões bacterianas e duas testemunhas (água e solução salina). Os dados foram submetidos à análise de variância, as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott (1974) e as concentrações submetidas à análise de regressão.

Selecionaram-se, para ensaio em casa de vegetação, os isolados que apresentaram as menores médias das variáveis nematológicas no capítulo 1;

causaram maior antagonismo nos ensaios *in vitro* para *foc*, e que apresentaram crescimento em meio TSB suficiente para calibração das suspensões bacterianas em espectrofotômetro para $OD_{540} = 0,350$ de absorvância com EEN.

O experimento foi instalado em casa de vegetação em esquema fatorial de $6 \times 4 + 4$ sendo: seis isolados de bactérias (BNFs 1, 2, 9 e 10; EPI 6 e ENDO), quatro tratamentos (ausência de patógenos - AP, apenas *M. javanica* - *Mj*, apenas *F. oxysporum* f. sp. *cubense* - *foc*, a interação de *M. javanica* + *F. oxysporum* f. sp. *cubense* - *Mj+foc* e quatro testemunhas: EEN, EEN+*Mj*, EEN+*foc* e EEN+*Mj+foc*).

Mudas de bananeira ‘Maçã’ completamente enraizadas, com aproximadamente 5 cm de comprimento, foram transferidas para copos plásticos de 500 mL de capacidade contendo solo arenoso previamente esterilizado em autoclave a 120°C a 1 atm por três dias consecutivos. Ao solo, adicionaram-se 100 mL das suspensões bacterianas dos isolados avaliadas, ajustados em EEN para $OD_{540} = 0,350$ de absorvância. Após 15 dias de incubação em casa de vegetação, as mudas dos tratamentos *Mj* e *Mj+foc* foram inoculadas com cinco mililitros contendo 3.000 ovos de *M. javanica* em três orifícios ao redor da planta nos copos plásticos. Para os tratamentos *foc* e *Mj+foc*, adicionaram-se 3g do meio com fubá em vasos com 3 litros de solo previamente esterilizado nas mesmas condições descritas, de forma que a concentração final no solo atingisse $1,2 \times 10^6$ ufc de *foc*/g de solo. As mudas que estavam nos copos foram transplantadas para os vasos e mantidas em casa de vegetação. Os tratamentos AP e *Mj* foram transplantados para os vasos nas mesmas condições descritas anteriormente, porém sem a presença de *foc*.

Após 60 dias do transplantio para os vasos avaliaram-se: comprimento das mudas (do colo até a inserção da última folha), diâmetro do pseudocaule, número de folhas, matéria fresca da parte aérea (MFPA), matéria fresca do sistema radicular (MFR), número de galhas por sistema radicular, número de

massas de ovos e número de ovos por sistema radicular, número de J2 por 200cc de solo, extraídos de acordo com a técnica de Jenkins (1964), fator de reprodução (População final/população inicial). A severidade do Mal-do-Panamá foi avaliada por meio de corte transversal na base do pseudocaule de acordo com a escala de notas de severidade do INIBAP desenvolvida por Charlier *et al.* (2003). Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelos testes de Scott-Knott e de Dunnett, ambos a 5 % de probabilidade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 22 isolados submetidos ao teste de antagonismo *in vitro*, verificou-se que 45,45 % foram estatisticamente superiores na redução do crescimento micelial de *foc* e 13,65 % estimularam o crescimento do fungo (TABELA 1). O isolado BNF 11 foi o mais eficiente, reduzindo o crescimento micelial em 35,57 %. Shiomi *et al.* (2008) realizaram uma seleção de isolados endofíticos do milho com potencial de uso no biocontrole de *Rhizoctonia solani*, *Fusarium moniliforme*, *Sclerotium rolfsii* e *Exserohilum turcicum*, fitopatógenos em testes de antagonismo *in vitro*. Os autores verificaram que as bactérias endofíticas mais eficazes apresentaram ação antagonônica aos patógenos com inibição relativa entre 32 % e 53,8 % em relação à testemunha.

A redução observada no crescimento micelial de *foc* pode estar associada à competição por espaço e nutrientes (FIGURA 1A) e/ou pela produção de metabólitos com ação antifúngica (FIGURA 1B). Ting *et al.* (2011) demonstraram que dois isolados de *Herbaspirillum* spp. e *Pseudomonas* spp. produziram compostos voláteis capazes de inibir o crescimento de *foc* raça 4.

TABELA 1. Raio de colônia, inibição relativa (IR) e estímulo relativo (ER) do crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* na presença de bactérias associadas às folhas de nim *in vitro*.

| Isolados | Raio da colônia (cm) | IR (%) | ER (%) |
|-----------------|-----------------------------|---------------|---------------|
| NF 11 | 2,98 a | 35,57 | -- |
| EPI 4 | 3,48 b | 21,26 | -- |
| BNF 17 | 3,60 b | 18,55 | -- |
| BNF 5 | 3,64 b | 17,64 | -- |
| BNF 4 | 3,82 c | 13,57 | -- |
| BNF 13 | 3,96 c | 10,40 | -- |
| BNF 9 | 4,00 c | 9,50 | -- |
| EPI 13 | 4,00 c | 9,50 | -- |
| BNF 18 | 4,08 c | 7,69 | -- |
| BNF 15 | 4,18 c | 5,42 | -- |
| BNF 8 | 4,34 d | 1,80 | -- |
| Testemunha | 4,42 d | 0 | -- |
| BNF 16 | 4,44 d | -- | 0,45 |
| BNF 12 | 4,56 d | -- | 3,16 |
| BNF 1 | 4,58 d | -- | 3,61 |
| BNF 7 | 4,64 d | -- | 4,97 |
| BNF 10 | 4,64 d | -- | 4,97 |
| BNF 3 | 4,68 d | -- | 5,88 |
| ENDO | 4,72 d | -- | 6,78 |
| BNF 6 | 4,82 d | -- | 9,04 |
| BNF 2 | 4,86 e | -- | 9,95 |
| BNF 14 | 4,96 e | -- | 12,21 |
| EPI 12 | 5,02 e | -- | 13,57 |
| Média | 4,27 | | |
| CV (%) | 6,00 | | |

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5 % de probabilidade.

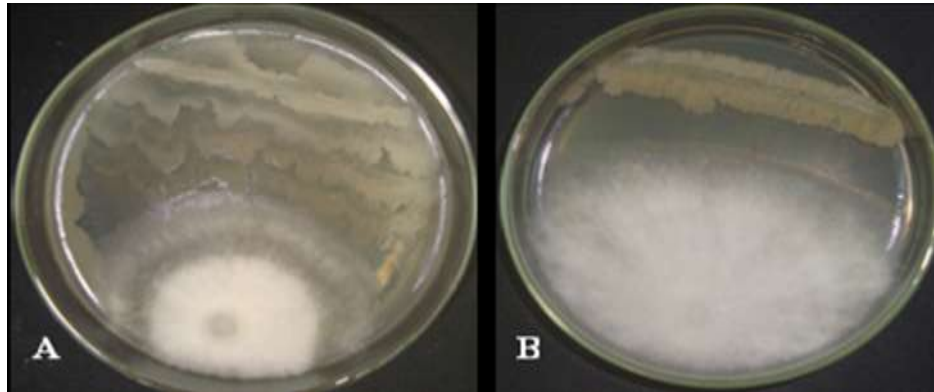


FIGURA 1. Crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (*foc*) em placa. Competição do isolado BNF 11 com *foc* (A). Antibiose do isolado EPI 13 sobre *foc* (B).

Sun *et al.* (2011) avaliaram, *in vitro*, o isolado de *Bacillus* (KY-21) obtido de rizosfera de bananeira contra *foc*. Os autores observaram que na presença do filtrado do meio de crescimento de KY-21, o crescimento micelial do patógeno foi inibido e as extremidades da hifa apresentaram deformação na sua constituição.

Os isolados BNF 2, BNF 14 e EPI 12 promoveram estímulo relativo entre 9,95 % e 13,57 % para o crescimento micelial de *foc* em relação à testemunha. Esse resultado evidencia que os compostos produzidos por esses isolados não são tóxicos a *foc*, ou então serviram para nutrição e desenvolvimento do micélio do fungo.

Os extratos EEN e EC e as bactérias epifíticas EPIs 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 16 e 17 estimularam a germinação dos esporos em todas as doses testadas, e no extrato EFN não houve presença de esporos suficientes para contagem. Esses dois eventos estão associados à presença e quantidade de células microbianas associadas a eles (FIGURA 2C).

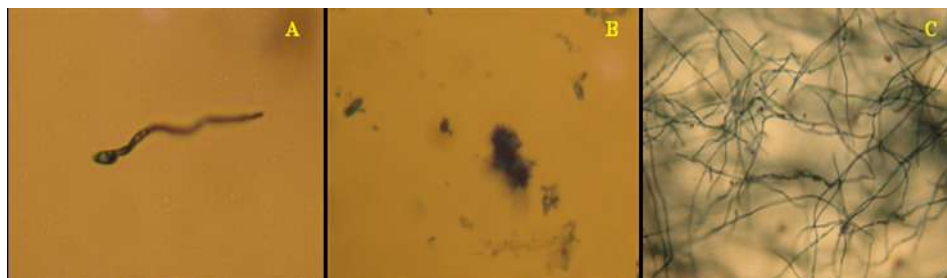


FIGURA 2. Microconídio de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (*foc*) germinado em água (A). Processo de lise do micronídio de *foc* no EFN (B). Germinação de micronídios de *foc* no EEN (C).

O estímulo observado no EEN e EC está possivelmente relacionado com a redução e/ou inativação dos compostos antimicrobianos e de microrganismos presentes nos extratos, promovidos pelos processos de esterilização e centrifugação. Nos extratos de EFN a redução na quantidade de esporos ocorreu possivelmente porque as bactérias associadas ao extrato promoveram a lise dos esporos (FIGURA 2B). Os esporos observados sob microscópio apresentavam-se inicialmente entumescidos, com tempo aumentavam de volume e finalmente se desintegravam. Tanto o estímulo quanto a lise de esporos foram também observados por Silva (2010), usando extrato fermentado de nim. A autora constatou que o estímulo foi de 244,9 % em relação à testemunha na concentração de 1,19 % do extrato fermentado. A redução na germinação de fungos na presença de nim também foi verificada para *C. gloeosporioides* por Alam *et al.* (2002). Os autores registraram 100 % e 90 % de inibição da germinação de conídios do fungo na presença do extrato da casca de nim e de folhas de nim, respectivamente. Os efeitos de redução na presença do extrato *in natura* deste e de outros trabalhos na literatura levantam a hipótese que além da composição química do extrato, a microbiota associada aos extratos possa justificar estes resultados. Diversos trabalhos têm mostrado o isolamento de

fungos e bactérias associadas à planta de nim (GEORGE *et al.*, 2005; TENGURIA e KHAN, 2011). Os resultados de germinação deste trabalho fortalecem a hipótese de que o EEN enriquecido com bactérias associadas às folhas de nim exerce antagonismo a *foc*.

Na presença de células bacterianas isoladas do nim houve redução da germinação dos esporos. Houve interação significativa ($P \leq 0,01$) entre os isolados e as concentrações testadas nos ensaio de germinação. Para todos os isolados testados observou-se redução da germinação com aumento da concentração de células bacterianas na suspensão ($P \leq 0,01$) (FIGURAS 3,4 e 5), com exceção do isolado EPI 13 (FIGURA 4A) e EPIs 3, 7 e 12 e a ENDO (TABELA 2).

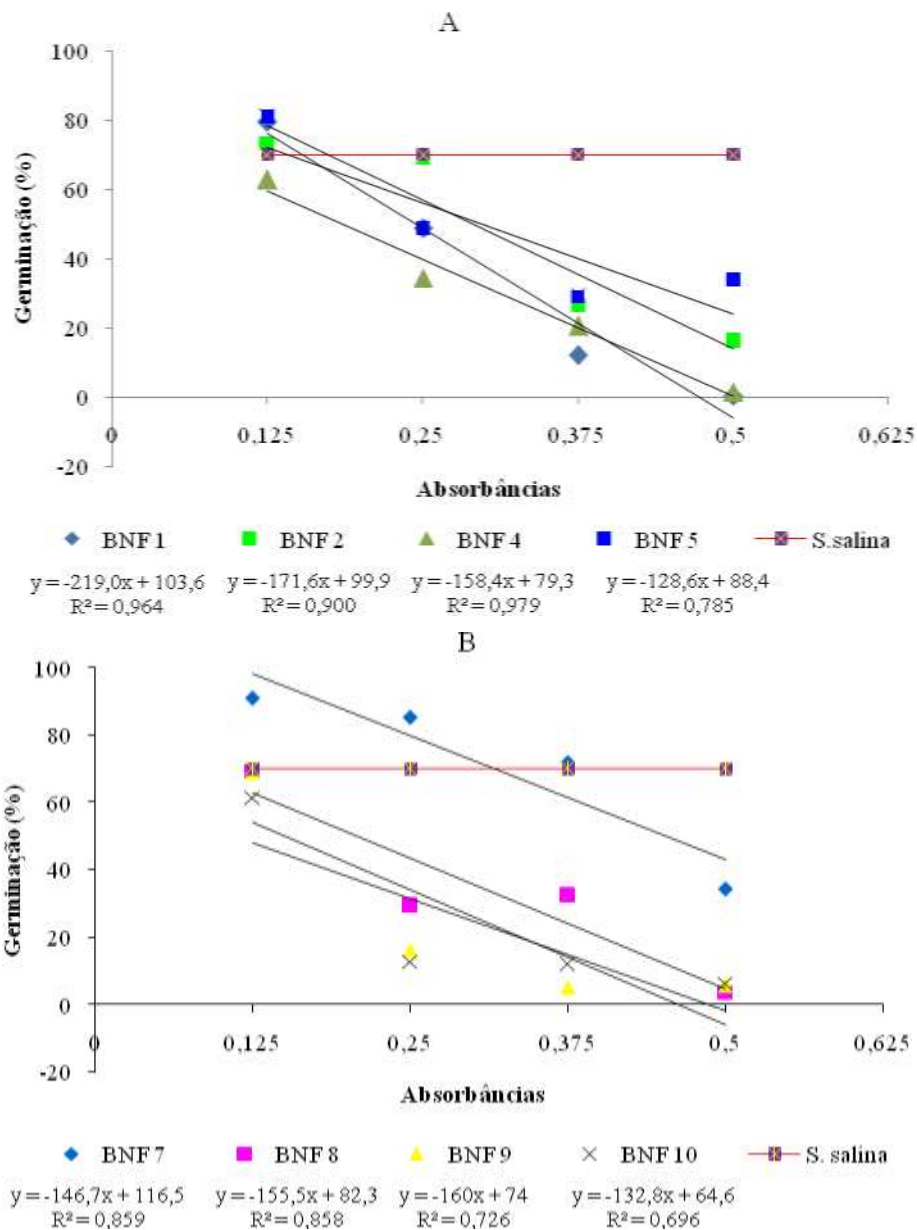


FIGURA 3. Porcentagem de esporos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* germinados na presença de diferentes níveis de absorbâncias dos isolados BNFs 1, 2 4 e 5 (A) e BNFs 7, 8, 9 e 10 (B).

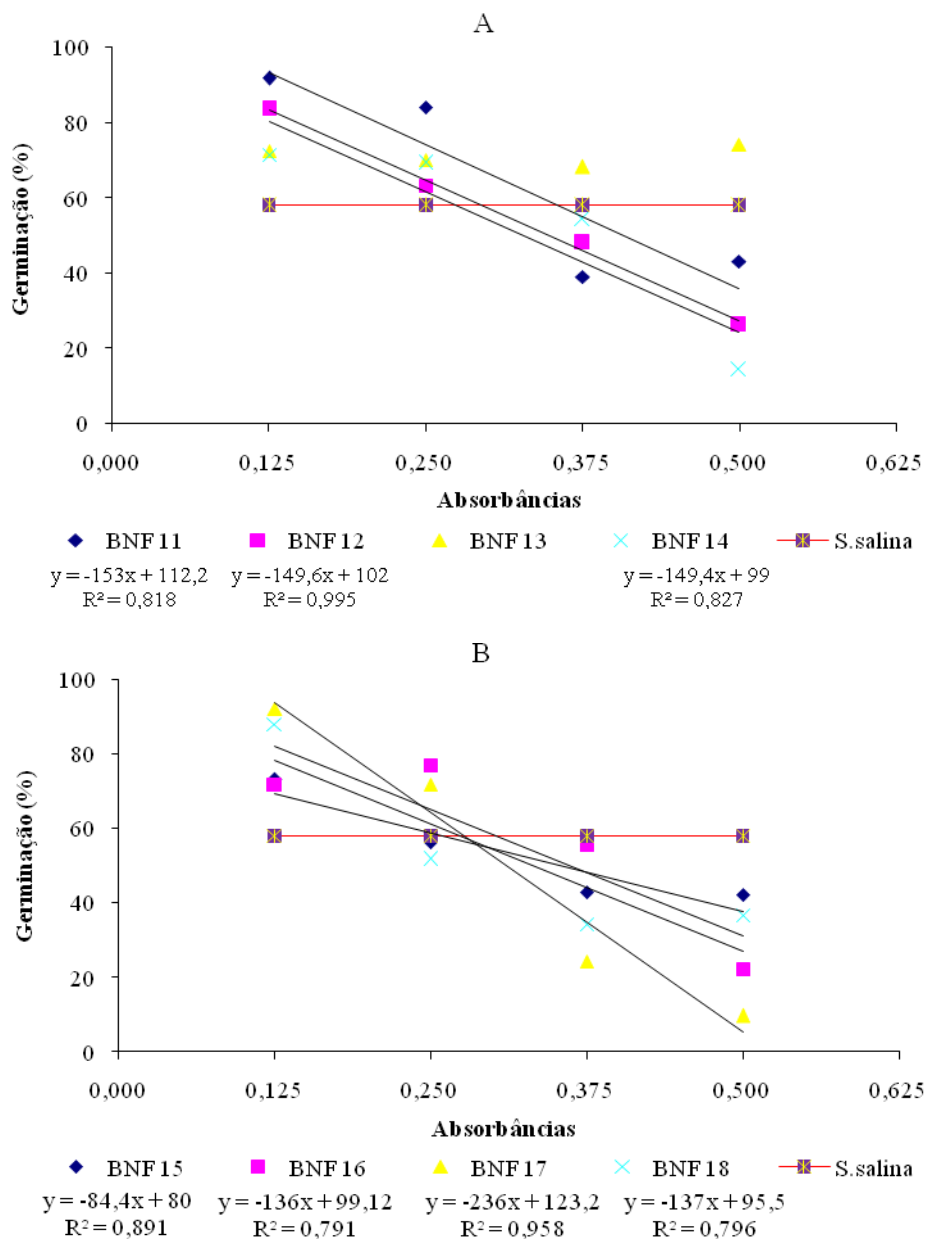


FIGURA 4. Porcentagem de esporos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* germinados na presença de diferentes níveis de absorbâncias dos isolados BNFs 11, 12, 13 e 14 (A) e BNFs 15, 16, 17 e 18 (B).

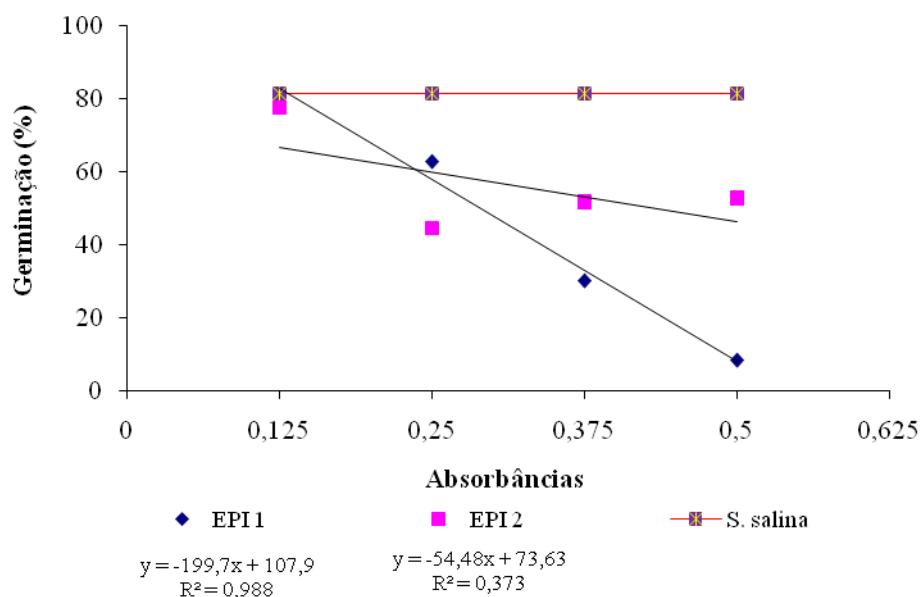


FIGURA 5. Porcentagem de esporos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* germinados na presença de diferentes níveis de absorbâncias dos isolados EPI 1 e EPI 2 .

As bactérias produzem diversos compostos antifúngicos e enzimas extracelulares como a glucanase, a protease e a quitinase (LORENTZ, 2005; PAZ, 2009). A lise dos esporos de *foc* pode estar associada à produção da enzima quitinase, que pode degradar a parede celular de fungos. Hariprasad *et al.* (2011) isolaram e caracterizaram diversas bactérias associadas às raízes de tomateiro e verificaram que aquelas mais eficientes para redução da murcha dessa cultura causada por *Fusarium oxysporum* foram também as maiores produtoras de quitinases. Cardoso *et al.* (2012) trabalharam na seleção de rizobactérias e bactérias endofíticas como agentes de biocontrole de *foc*. Os autores verificaram que 19 isolados formaram halos transparentes circundando as colônias, indicando serem capazes de degradar a quitina; entretanto, eles

destacam que os mecanismos associados a esse fenômeno devem ser melhor investigados. O efeito da concentração das células bacterianas sobre a germinação foi determinante para sua efetividade.

No desdobramento da interação de isolados dentro das concentrações, nota-se que o isolado BNF 6 foi o mais eficiente na inibição da germinação de esporos de *foc* (TABELA 2). Não houve diferença significativa entre as testemunhas solução salina e água. No último nível de absorvância (0,5) todos os isolados, com exceção das bactérias EPIs 3, 7 e 12 e a ENDO, diferiram de ambas as testemunhas.

TABELA 2. Porcentagem de esporos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* germinados na presença de diferentes níveis de absorvância de células bacterianas obtidas do extrato fermentado (BNF), epifíticas (EPI) e endofítica (ENDO) de nim.

| Isolados | Germinação (%) | | | |
|-----------|-----------------------|------------|------------|------------|
| | Níveis de absorvância | | | |
| | 0,125 | 0,250 | 0,375 | 0,50 |
| BNF 6 | 2,00 a*** | 0,00 a*** | 0,00 a*** | 0,00 a*** |
| BNF 10 | 61,40 b** | 12,80 b*** | 11,80 b*** | 6,40 a*** |
| BNF 4 | 62,80 b** | 34,40 c*** | 20,60 c*** | 1,40 a*** |
| BNF 9 | 68,80 c | 16,20 b*** | 5,20 a*** | 5,80 a*** |
| BN F 8 | 69,40 c | 29,40 c*** | 32,40 c*** | 3,60 a*** |
| BNF 2 | 73,40 c | 69,00 e | 26,60 c*** | 16,00 b*** |
| BNF 1 | 79,40 d | 48,80 d*** | 12,00 b*** | 0,40 a*** |
| BNF 5 | 81,00 d | 48,80 d*** | 29,00 c*** | 34,00 c*** |
| BNF 7 | 91,00 e* | 85,20 f* | 72,00 d | 34,20 c*** |
| CV (%) | 15,03 | | | |
| S. salina | 70,00 | | | |
| Água | 80,00 | | | |
| BNF 11 | 91,75 b*** | 84,00 c* | 39,00 b*** | 43,00 c*** |
| BNF 12 | 83,50 b* | 63,25 a | 48,00 c** | 26,25 b*** |
| BNF 13 | 72,50 a | 70,00 b | 68,25 d | 74,75 d* |
| BNF 14 | 71,50 a | 69,25 b | 54,25 c** | 14,25 a*** |
| BNF 15 | 73,00 a | 56,25 a** | 43,00 b*** | 42,25 c*** |
| BNF 16 | 71,75 b | 77,00 c* | 55,50 c** | 22,25 b*** |
| BNF 17 | 92,25 a*** | 71,75 b** | 24,25 a*** | 9,75 a*** |
| BNF 18 | 88,00 a*** | 51,75 a** | 34,25 b*** | 36,75 c*** |
| CV (%) | 11,75 | | | |
| S. salina | 58,00 | | | |
| Água | 72,00 | | | |

Continuação...

Contiunuação...

| | | | | |
|-----------|---------|------------|------------|------------|
| EPI 1 | 80,75 a | 62,83 b** | 30,11 a*** | 8,41 a*** |
| EPI 2 | 77,54 a | 44,74 a*** | 51,59 b*** | 52,56 b*** |
| EPI 3 | 95,55 b | 91,62 c | 88,90 c | 95,64 c |
| EPI 7 | 70,29 a | 92,96 c | 97,70 c | 96,87 c |
| EPI 12 | 93,09 b | 92,27 c | 93,38 c | 91,22 c |
| ENDO | 98,35 b | 95,54 c | 97,06 c | 93,02 c |
| CV (%) | 15,03 | | | |
| S. salina | 81,53 | | | |
| Água | 88,05 | | | |

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5 % de probabilidade.

*Significativo pelo teste Dunnett a 5 % de probabilidade para a testemunha solução salina.

** Significativo pelo teste Dunnett a 5 % de probabilidade para a testemunha água.

*** Significativo pelo teste Dunnett a 5 % de probabilidade para as testemunhas solução salina e água.

Para o experimento em casa de vegetação, houve interação significativa ($P \leq 0,05$) entre os fatores, isolados bacterianos do nim e os tratamentos (A.P, *foc*, *Mj* e *Mj+foc*) para as variáveis: comprimento das mudas, diâmetro do pseudocaule, número de folhas, matéria fresca da parte aérea (MFPA) e matéria fresca de raiz (MFR) (TABELAS 1, 2, 3, 4 e 5).

Na interação *Mj+foc* os isolados BNF 10 e EPI 6 foram superiores aos demais em relação ao comprimento das mudas, e este último destacou-se por diferir da testemunha EEN+*Mj+foc* tanto para essa variável como para o diâmetro (TABELAS 3 e 4).

No desdobramento dos isolados dentro dos tratamentos, observou-se que dentro de *foc* as bactérias ENDO e BNF 10 foram superiores às demais para a variável comprimento das mudas (TABELA 3).

TABELA 3. Médias da variável comprimento de mudas de bananeira ‘Maçã’ tratadas com isolados de bactérias do nim fermentado (BNF), epifíticas (EPI) e endofítica (ENDO) veiculadas no EEN, na ausência de patógenos (AP) e nas presenças de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (*foc*) *Meloidogyne javanica* (*Mj*) e ambos os patógenos (*Mj+foc*).

| Tratamentos | Comprimento de mudas (cm) | | | |
|--------------|---------------------------|------------|-----------|-----------------------|
| | AP | <i>foc</i> | <i>Mj</i> | <i>Mj+foc</i> |
| ENDO + EEN | 12,08 aB | 14,58 aA | 10,91 aB | 10,58 bB |
| EPI 6 + EEN | 13,41 aA | 12,25 bA | 11,75 aA | 13,08 aA ^A |
| BNF 1 + EEN | 14,08 aA | 13,33 bA | 12,08 aA | 10,00 bB |
| BNF 10 + EEN | 14,08 aA | 15,25 aA | 11,00 aB | 12,75 aB |
| BNF 2 + EEN | 12,08 aA | 12,33 bA | 12,08 aA | 10,91 bA |
| BNF 9 + EEN | 13,16 aA | 12,33 bA | 9,75 aB | 10,83 bB |
| Média | | | 12,31 | |
| CV (%) | | | 15,72 | |
| EEN | 12,58 | 13,33 | 11,75 | 9,33 ^A |

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste Scott-Knott (1974) ao nível de 5 % de probabilidade.

^ASignificativo pelo teste de Dunnett a 5 % de probabilidade, na coluna, para a testemunha EEN+*Mj+foc*.

Para a variável diâmetro, no desdobramento dos isolados dentro dos tratamentos, nota-se que na presença de *foc* as bactérias BNF 10 e BNF 9 foram superiores às demais. Já na presença de *Mj+foc* diâmetro maior ocorreu para os isolados ENDO, EPI 6, BNF 10 e BNF 2 (TABELA 4).

Fixando os isolados e variando os tratamentos, para a bactéria EPI 6 verificou-se que a presença de *foc* reduziu em até 21,15 % o diâmetro das plantas em comparação aos tratamentos AP, *Mj* e *Mj+foc*. No isolado BNF 9 a inoculação de *Mj+foc* provocou uma redução dessa variável de de 25,31 % em relação ao tratamento AP. Da mesma forma, para a bactéria BNF 1 as presenças de *foc* e *Mj+foc* reduziram tal variável (TABELA 4).

TABELA 4. Médias do diâmetro de mudas de bananeira ‘Maçã’ tratadas com isolados de bactérias do nim fermentado (BNF), epifíticas (EPI) e endofítica (ENDO) veiculadas no EEN, na ausência de patógenos (AP) e nas presenças de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (*foc*), *Meloidogyne javanica* (*Mj*) e ambos os patógenos (*Mj+foc*).

| Tratamentos | Diâmetro (cm) | | | |
|--------------|---------------|------------|-----------|----------------------|
| | AP | <i>foc</i> | <i>Mj</i> | <i>Mj+foc</i> |
| ENDO + EEN | 1,50 aA | 1,30 bA | 1,36 aA | 1,43 aA |
| EPI 6 + EEN | 1,50 aA | 1,23 bB | 1,56 aA | 1,55 aA ^A |
| BNF 1 + EEN | 1,63 aA | 1,36 bB | 1,63 aA | 1,15 bB |
| BNF 10 + EEN | 1,48 aA | 1,68 aA | 1,58 aA | 1,40 aA |
| BNF 2 + EEN | 1,45 aA | 1,31 bA | 1,58 aA | 1,31 bA |
| BNF 9 + EEN | 1,58 aA | 1,53 aA | 1,48 aA | 1,18 bB |
| Média | 1,45 | | | |
| CV (%) | 16,71 | | | |
| EEN | 1,41 | 1,26 | 1,28 | 1,10 ^A |

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste Scott-Knott (1974) ao nível de 5 % de probabilidade.

^ASignificativo pelo teste de Dunnett a 5 % de probabilidade, na coluna, para a testemunha *Mj+foc*.

Nenhum dos isolados associados às plantas inoculadas com *foc* influenciou o número de folhas; contudo, para plantas infectadas por *M. javanica* houve redução nas plantas tratadas com os isolados ENDO e BNF 9.

Os isolados ENDO, EPI 6, BNF 10 e BNF 2 inoculados com *Mj+foc* aumentaram o número de folhas das plantas em relação às bactérias BNF1 e BNF 9 e em relação à testemunha *Mj+foc*. É importante ressaltar a presença da bactéria EPI 6, visto que a mesma também diferiu da testemunha *Mj+foc* para as variáveis comprimento de mudas e diâmetro (TABELA 5).

TABELA 5. Médias do número de folhas de mudas de bananeira ‘Maçã’ tratadas com isolados de bactérias do nim fermentado (BNF), epifíticas (EPI) e endofítica (ENDO) veiculadas no EEN, na ausência de patógenos (AP) e nas presenças de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (*foc*), *Meloidogyne javanica* (*Mj*) e ambos os patógenos (*Mj+foc*).

| Tratamentos | Número de folhas | | | |
|--------------|------------------|------------|-----------|----------------------|
| | AP | <i>foc</i> | <i>Mj</i> | <i>Mj+foc</i> |
| ENDO + EEN | 4,66 aA | 4,16 aA | 3,33 aB | 3,66 aB ^A |
| EPI 6 + EEN | 5,16 aA | 4,66 aA | 4,16 aA | 4,33 aA ^A |
| BNF 1 + EEN | 4,33 aA | 4,83 aA | 4,50 aA | 2,66 bB |
| BNF 10 + EEN | 4,16 aA | 4,33 aA | 4,50 aA | 4,33 aA ^A |
| BNF 2 + EEN | 4,50 aA | 4,33 aA | 4,50 aA | 4,16 aA ^A |
| BNF 9 + EEN | 4,83 aA | 4,83 aA | 4,00 aB | 3,33 bB |
| Média | 4,26 | | | |
| CV (%) | 18,14 | | | |
| EEN.AP | 5,16 | 3,50 | 4,66 | 2,16 ^A |

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste Scott-Knott (1974) ao nível de 5 % de probabilidade.

^ASignificativo pelo teste de Dunnett a 5 % de probabilidade, na coluna, para a testemunha EEN+*Mj+foc*.

Para a variável matéria fresca da parte aérea (MFPA), nota-se que na ausência de patógenos (AP) os isolados EPI 6, BNF 1 e BNF 9 aumentaram essa variável em relação aos demais, mostrando mais uma vez o potencial, principalmente das bactéria EPI 6 como promotora de crescimento de plantas. Já dentro de *foc*, os melhores isolados para essa variável foram BNF 1 e BNF 10. E dentro de *Mj* a bactéria BNF 9 foi inferior às demais (TABELA 6)

TABELA 6. Médias da matéria fresca da parte aérea (MFPA) de mudas de bananeira ‘Maçã’ tratadas com isolados de bactérias do nim fermentado (BNF), epifíticas (EPI) e endofítica (ENDO) veiculadas no EEN, na ausência de patógenos (AP) e nas presenças de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* (*foc*), *Meloidogyne javanica* (*Mj*) e ambos os patógenos (*Mj+foc*).

| Tratamentos | MFPA | | | |
|--------------|----------|------------|-----------|---------------|
| | AP | <i>foc</i> | <i>Mj</i> | <i>Mj+foc</i> |
| ENDO + EEN | 17,51 bA | 19,33 bA | 14,95 aA | 15,96 aA |
| EPI 6 + EEN | 22,80 aA | 16,46 bB | 16,11 aB | 17,76 aB |
| BNF 1 + EEN | 21,30 aA | 24,08 aA | 16,18 aB | 13,50 aB |
| BNF 10 + EEN | 18,50 bB | 22,08 aA | 14,83 aB | 16,00 aB |
| BNF 2 + EEN | 16,88 bA | 17,66 bA | 17,46 aA | 16,31 aA |
| BNF 9 + EEN | 23,78 aA | 18,95 bB | 10,01 bC | 14,66 aC |
| Média | 17,63 | | | |
| CV (%) | 23,32 | | | |

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste Scott-Knott (1974) ao nível de 5 % de probabilidade.

Para o isolado ENDO o tratamento *foc* reduziu em 31,67 % a MFR das plantas em comparação ao tratamento AP. Já para a bactéria BNF 2 os tratamentos *foc*, *Mj* e *Mj+foc* aumentaram esta variável entre 33,76 %, e 47,90 % em relação ao tratamento AP.

A bactéria ENDO mesmo na presença de *Mj+foc* aumentou 32,82 % a MFPA, efeito superior ao observado na testemunha EEN+ *Mj+foc* (TABELA 7).

TABELA 7. Médias da matéria fresca de raiz (MFR) de mudas de bananeira ‘Maçã’ tratadas com isolados de bactérias do nim fermentado (BNF), epifíticas (EPI) e endofítica (ENDO) veiculadas no EEN, na ausência de patógenos (AP) e nas presenças de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* (*foc*), *Meloidogyne javanica* (*Mj*) e ambos os patógenos (*Mj+foc*).

| Tratamentos | MFR | | | |
|--------------|-----------------------|------------|-----------|-----------------------|
| | AP | <i>foc</i> | <i>Mj</i> | <i>Mj+foc</i> |
| ENDO + EEN | 15,85 bA | 10,83 aB | 20,23 aA | 19,56 aA ^A |
| EPI 6 + EEN | 21,18 aA | 14,86 aA | 16,61 aA | 14,73 aA |
| BNF 1 + EEN | 22,10 aA | 14,28 aA | 17,71 aA | 16,71 aA |
| BNF 10 + EEN | 16,73 bA | 18,31 aA | 18,01 aA | 22,10 aA |
| BNF 2 + EEN | 9,81 bB | 14,81 aA | 18,73 aA | 18,83 aA |
| BNF 9 + EEN | 23,46 aA ^A | 11,91 aB | 12,36 aB | 20,60 aA |
| Média | 17,33 | | | |
| CV (%) | 36,42 | | | |
| EEN | 15,21 | 14,08 | 15,36 | 9,31 ^A |

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste Scott-Knott (1974) ao nível de 5 % de probabilidade.

^ASignificativo pelo teste de Dunnett a 5 % de probabilidade, na coluna, para a testemunha EEN+*Mj+foc*.

Observou-se que, nas diferentes interações apresentadas, os isolados ENDO, BNF1, BNF 9, BNF 10 e, principalmente o EPI 6, apresentaram efeitos positivos sobre a promoção de crescimento das plantas de bananeira ‘Maçã’.

Há vários mecanismos descritos sobre a ação dos microrganismos endofíticos na promoção de vegetais. Dentre eles, efeitos positivos provocados por bactérias em plantas podem ser devido, em parte, à produção de fitorreguladores vegetais (ARAÚJO *et al.*, 2005; ZHANG e REDDY, 2001). Algumas bactérias são capazes de sintetizar substâncias como as giberelinas e ácido indol-acético (AIA) *in vitro* e na rizosfera de plantas (FREITAS e GERMIDA, 1992). Vonderwell *et al.* (2001) observaram o aumento da concentração de ácido indol-acético (AIA) em plântulas de *Pinus taeda*

inoculadas com *B. subtilis* isolado INR7. Outro mecanismo de promoção de crescimento é a solubilização de fósforo, descrito na literatura como um efeito dos endofíticos nas plantas (GLICK e BASHAN, 1997). Além desses efeitos, Mariano e Kloepper (2000) ainda citam a fixação de nitrogênio, oxidação do enxofre, aumento da permeabilidade das raízes e produção de sideróforos.

De modo geral, verificou-se que o tratamento *Mj+foc* foi mais agressivo em relação aos demais, reduzindo as variáveis agronômicas avaliadas. Esse resultado está de acordo com trabalhos da literatura em outros complexos de *Fusarium x Meloidogyne* no tomate (MOURA *et al.*, 2001) e no melão (NAJI e ABU-GHARBIEH, 2004)..

Houve interação significativa ($P \leq 0,05$) entre os isolados avaliados e os tratamentos (*Mj* e *Mj+foc*) para o número de galhas e o número de massas de ovos de *M. javanica* por sistema radicular de mudas de bananeira ‘Maçã’ (TABELA 8).

Na presença de *Mj* e na presença de *Mj+foc*, com exceção das bactérias BNF 2 e BNF 1 que aumentaram o número de galhas, nenhuma das outras diferiu significativamente do EEN. Para massa de ovos, a bactéria BNF2 apresentou comportamento semelhante.

TABELA 8. Médias do número de galhas e número de massas de ovos por sistema radicular em mudas de banana ‘Maçã’ tratadas com isolados de bactérias do nim fermentado (BNF), epifíticas (EPI) e endofítica (ENDO) veiculadas no EEN, na ausência de patógenos (AP) e nas presenças de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* (*foc*), *Meloidogyne javanica* (*Mj*) e ambos os patógenos (*Mj+foc*).

| Tratamentos | Número de galhas | | Número de massas de ovos | |
|--------------|------------------------|------------------------|--------------------------|---------------|
| | <i>Mj</i> | <i>Mj+foc</i> | <i>Mj</i> | <i>Mj+foc</i> |
| ENDO + EEN | 99,16 aA | 180,16 aB | 55,33 aA | 35,83 aA |
| EPI 6 + EEN | 91,66 aA | 121,00 aA | 39,83 aA | 57,33 aA |
| BNF 1 + EEN | 79,16 aA | 310,66 bB ^B | 48,16 aB | 12,66 aA |
| BNF 10 + EEN | 75,00 aA | 130,83 aA | 32,83 aA | 22,50 aA |
| BNF 2 + EEN | 217,16 bB ^A | 85,00 aA | 96,50 bB | 34,00 aA |
| BNF 9 + EEN | 118,33 aA | 101,83 aA | 42,66 aA | 22,66 Aa |
| Média | 134,16 | | 41,69 | |
| CV (%) | 41,20 | | 68,05 | |
| EEN | 100,66 ^A | 56,33 ^B | 60,16 | 18,66 |

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste Scott-Knott (1974) ao nível de 5 % de probabilidade.

^{AB}Significativo pelo teste de Dunnett a 5 % de probabilidade, na coluna, para as testemunhas EEN+*Mj* e EEN+*Mj+foc* respectivamente.

Com relação ao número de ovos e o fator de reprodução (FR) de *M. javanica* por sistema radicular, verificou-se efeito independente dos isolados avaliados ($P \leq 0,05$). Para ambas as variáveis, as bactérias BNF 1 e BNF 9 mostraram-se superiores às demais deste ensaio, de modo que, em relação ao isolado ENDO, essas bactérias reduziram em respectivamente 42,67 % e 40,41 % o número de ovos por sistema radicular e 57,18 % e 40,40 % o FR. Freitas (2001) cita que as rizobactérias ou seus metabólitos desencadeiam reações de hipersensibilidade nas células vegetais, impedindo que as fêmeas dos nematoides consigam energia suficiente para produzir ovos (TABELA 9). Esse resultado está de acordo com os encontrados por Ribeiro *et al.* (2012).

TABELA 9. Médias do número de ovos e do fator de reprodução (FR) em mudas de banana ‘Maçã’ tratadas com isolados de bactérias do nim fermentado (BNF), epifíticas (EPI) e endofítica (ENDO) veiculadas no EEN.

| Tratamentos | Número de ovos | FR |
|--------------------|-----------------------|-----------|
| BNF 1 + EEN | 12804,50 a | 4,26 a |
| BNF 9 + EEN | 13326,25 a | 4,44 a |
| BNF 10 + EEN | 18135,75 b | 6,04 b |
| EPI 6 + EEN | 18932,50 b | 6,31 b |
| BNF 2 + EEN | 19431,75 b | 6,47 b |
| ENDO + EEN | 22366,08 b | 7,45 b |
| Média | 17499,47 | 5,83 |
| CV (%) | 37,20 | 37,20 |

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste Scott-Knott (1974) ao nível de 5 % de probabilidade.

Na comparação com a testemunha EEN, constatou-se que os isolados BNF 1 e BNF 9 na presença de *Mj* reduziu em respectivamente 40,16 % e 60,26 % o número de ovos por sistema radicular de mudas de bananeira ‘Maçã’. Já para o fator de reprodução, o isolado BNF 1 foi o mais promissor, reduziu em 40,13 % essa variável em relação à testemunha EEN+*Mj* (TABELA 10).

TABELA 10. Médias do número de ovos e do fator de reprodução (FR) em mudas de banana ‘Maçã’ tratadas com isolados de bactérias do nim fermentado (BNF), epifíticas (EPI) e endofítica (ENDO) veiculadas no EEN, na ausência de patógenos (AP) e nas presenças de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* (*foc*), *Meloidogyne javanica* (*Mj*) e ambos os patógenos (*Mj+foc*).

| Tratamentos | Número de ovos | | FR | |
|--------------|-----------------------|----------------------|-------------------|-------------------|
| | <i>Mj</i> | <i>Mj+foc</i> | <i>Mj</i> | <i>Mj+foc</i> |
| ENDO + EEN | 24539,16 | 20193,00 | 8,17 | 6,73 |
| EPI 6 + EEN | 20251,66 | 17613,33 | 6,75 | 5,87 |
| BNF 1 + EEN | 15848,38 ^A | 9760,66 | 5,28 ^A | 3,25 |
| BNF 10 + EEN | 20957,66 | 15313,83 | 6,98 | 5,10 |
| BNF 2 + EEN | 19230,00 | 19633,50 | 6,41 | 6,54 |
| BNF 9 + EEN | 10524,16 ^A | 16128,33 | 3,50 ^A | 5,37 |
| Média | 17499,00 | | 5,83 | |
| CV (%) | 37,20 | | 37,20 | |
| EEN | 26487,33 ^A | 9949,00 ^B | 8,82 ^A | 3,31 ^B |

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste Scott-Knott (1974) ao nível de 5 % de probabilidade.

^{AB}Significativo pelo teste de Dunnett a 5 % de probabilidade, na coluna, para as testemunhas EEN+*Mj* e EEN+*Mj+foc* respectivamente.

A presença de *foc* no tratamento *Mj+foc* reduziu em 35,23 % o número de J2 de *M. javanica* em comparação ao tratamento *Mj* (TABELA 11).

As reduções promovidas por *foc* nas variáveis nematológicas apresentadas podem ter ocorrido pela interação entre os patógenos *Mj+foc*. Rocha (2010) trabalhou com a interação de *Mj+foc* em banana ‘Prata’ e obteve resultados semelhantes. O autor levantou a hipótese de que na presença do fungo, as plantas ficaram mais vulneráveis pela obstrução do sistema vascular, disponibilizaram menos nutrientes para nutrição das fêmeas e consequentemente reduziram a produção de massas de ovos.

TABELA 11. Médias do número de juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* por 200cc de solo, em mudas de bananeira ‘Maçã’ tratadas com isolados de bactérias do nim fermentado (BNF), epifíticas (EPI) e endofítica (ENDO) veiculadas no EEN.

| Tratamentos | Número de J2 | |
|--------------|--------------|---------------|
| | <i>Mj</i> | <i>Mj+foc</i> |
| Médias | 349,14 | 226,11* |
| ENDO + EEN | 451,8 | 210,83 |
| EPI 6 + EEN | 394,00 | 214,33 |
| BNF 1 + EEN | 194,50 | 237,83 |
| BNF 10 + EEN | 200,00 | 166,83 |
| BNF 2 + EEN | 468,83 | 237,66 |
| BNF 9 + EEN | 385,16 | 289,16 |
| CV (%) | 62,10 | |

*Significativo pelo teste F a 5 % de probabilidade para médias de J2 nos patógenos *Mj* e *Mj+foc*.

Independente dos isolados avaliados, a presença de *Mj* aumentou a severidade do Mal-do-Panamá em 52,52 % em relação ao tratamento *foc* (TABELA 12). No entanto, o isolado BNF 9 tratado com *Mj+foc* diferiu da testemunha EEN+*Mj+foc*, evidenciando que essa bactéria controlou a ação de *M. javanica*, de modo que esse tratamento ficasse com a média igual aos tratamentos inoculados apenas com *foc* (TABELA 12).

Os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo com os relatados por outros autores. Silva e Pereira (2008) observaram que a interação entre *Fusarium* e *Meloidogyne* no quiabo intensifica a severidade da doença. Fisher *et al.* (2010) constataram que a variedade de maracujá Afruvec, na presença de *Meloidogyne incognita* raça 3, apresentou maior índice de fusariose.

TABELA 12. Comparação das médias de severidade do Mal-do-Panamá em mudas de bananeira ‘Maçã’ tratadas com isolados bacterianos do extrato fermentado de nim (BNF), epifíticas (EPI) e endofítica (ENDO) e inoculadas com *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (*foc*) e *Meloidogyne javanica* + *foc* (*Mj+foc*).

| Tratamentos | <i>Foc</i> | <i>Mj+foc</i> |
|--------------------|-------------------|----------------------|
| Médias | 1,41* | 2,97 |
| ENDO + EEN | 1,66 | 3,00 |
| EPI 6 + EEN | 1,16 | 2,83 |
| BNF 1 + EEN | 2,00 | 4,00 |
| BNF 10 + EEN | 1,33 | 3,33 |
| BNF 2 + EEN | 1,00 | 3,00 |
| BNF 9 + EEN | 1,33 | 1,66 ^A |
| CV (%) | | 60,43 |
| EEN | 1,16 | 4,33 ^A |

*Significativo pelo teste F a 5 % de probabilidade para notas do INIBAP nos tratamentos *foc* e *Mj+foc*.

^ASignificativo pelo teste de Dunnett a 5 % de probabilidade, na coluna, para a testemunha EEN+*Mj+foc*.

De modo geral, os isolados apresentaram resultados incostantes nos dois capítulos para as variáveis agrônômicas e nematológicas avaliadas. Possivelmente, um conjunto de variáveis pode ter contribuído para a inconstância dos resultados apresentados. A primeira a ser destacada é a diferença na concentração das células do segundo capítulo ($OD_{540}=350$) em relação ao primeiro ($OD_{540}=500$). Naves *et al.* (2004) reportaram que filtrados de culturas bacterianas endofíticas submetidos a diluições provocaram reduções sucessivas e significantes na imobilidade e mortalidade bem como aumentos significantes na eclosão dos ovos de *M. javanica*. Os autores afirmam que com as diluições os filtrados perdem gradualmente a atividade tóxica, e que as reduções na imobilidade e na mortalidade indicam a capacidade do J2 em se desintoxicar quando a concentração do principio tóxico absorvido é baixa, e

talvez altere a natureza da molécula nos centros oxidativos do pseudoceloma. Logo, a redução na concentração das suspensões bacterianas do primeiro para o segundo ensaio pode ter contribuído para os resultados apresentados.

Outro fator a ser considerado é a possibilidade de diferença da composição das folhas dos dois ensaios por se tratar de épocas distintas de coleta. Estudos realizados na Embrapa Milho e Sorgo por Viana *et al.* (2006) indicam que o teor de azadiractina nas folhas de Nim varia de acordo com a época do ano. Para as condições de Sete Lagoas, MG, os autores observaram que a maior concentração dessa substância ocorre nos meses de março e abril, logo após o final do período chuvoso, e decresce acentuadamente no período de baixa precipitação pluviométrica (junho a setembro).

A inconstância dos resultados está de acordo com outros autores que trabalham com bactérias endofíticas no controle de nematoides. Medeiros *et al.* (2009) verificaram que 3 isolados endofíticos, ENM7, ENM10 e ENM51, todos pertencentes ao gênero *Bacillus*, reduziram significativamente a massa de ovos e/ou o índice de galhas de *Meloidogyne incógnita* raça 2 em melão. Contudo, quando testados novamente, separadamente ou em misturas, esses isolados não mantiveram a eficiência na redução dessas variáveis e, *in vitro*, não afetaram a eclosão dos juvenis. Os autores também ressaltaram que esses resultados evidenciam a inconstância da ação das bactérias endofíticas. Freitas *et al.* (2003) também destacam que um dos grandes problemas nas pesquisas com rizobactérias e um assunto bastante citado por diversos autores é a inconstância dos resultados.

Logo, diante do exposto uma série de indagações pode ser sugerida: Houve diferença na concentração de azadiractina entre os extratos do primeiro e do segundo ensaio? O teor de azadiractina pode influenciar as bactérias associadas às folhas do nim? Qual dos fatores mais contribui para a redução da eficiência, o extrato ou o isolado? Diante dessas e de outras perguntas que

podem e devem ser levantadas, nota-se a necessidade de continuidade dos estudos.

Um ponto a ressaltar é que, as empresas privadas têm investido em produtos biológicos, pela grande demanda apresentada pelo mercado. No entanto, dentre as exigências dos produtores está a estabilidade dos produtos. Logo, trabalhos futuros com esses isolados em associação ao extrato de nim devem buscar métodos que garantam estabilidade.

Atualmente, encontra-se no mercado o produto BioNem WP, à base de *Bacillus firmus*, indicado para o controle de fitonematoides. Estudos *in vitro* mostraram que BioNem inibe a eclosão de ovos de *M. incognita*, reduzindo em 91 % a formação de galhas em raízes de tomate (TEREFE *et al.*, 2009). Portanto, após identificação dos isolados, a busca de parcerias com empresas privadas pode ser estudada, a fim de se tentar estabilizar a associação de isolados promissores com o extrato de nim ou produtos similares. Todavia, o uso de extratos vegetais como o do nim associado a microrganismos é uma alternativa de grande importância para a agricultura orgânica e familiar.

4 CONCLUSÕES

- Bactérias de nim exercem antagonismo *in vitro* a *F. oxysporum* f. sp *cubense*.
- Os extratos de nim centrifugado e esterilizado e algumas bactérias do nim estimulam a germinação de microconídios de *foc*.
- Os isolados EPI 6 e BNF 9 são promissores no controle do complexo *Meloidogyne javanica* x *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIOS, G. N. Plant diseases caused by nematodes. In: _____ **Plant pathology**. 5 ed. Elsevier: Academic Press, 2004. p. 840-841.
- ALAM, S. *et al.* *In vitro* inhibition of conidial germination of *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. by fungicides, plant extracts and phytohormones. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 5, n. 3, p. 303-306, 2002.
Disponível em: < <http://scialert.net/pdfs/pjbs/2002/303-306.pdf>> Acesso em: 10 mar. 2013.
- AKHTAR, M.S.; SIDDIQUI, Z.A. Biocontrol of a root-rot disease complex of chickpea by *Glomus intraradices*, *Rhizobium* sp. and *Pseudomonas straita*. **Crop Protection**, [s.l.], v. 27, p. 410-417, 2008.
- ARAÚJO, F. F.; HENNING, A.; HUNGRIA, M. Phytohormones and antibiotics produced by *Bacillus subtilis* and their effects on seed pathogenic fungi and on soybean root development. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [s.l.], v. 21, p. 1639-1645, 2005.
- ASHOUB, A.H.; AMARA, M.T. Biocontrol Activity of Some Bacterial Genera Against Root-Knot nematode, *Meloidogyne incognita*. **Journal of American Science**, New York, v. 6, p. 321-328, 2010.
- CARLIER, J.; WAELE, D. de; ESCALANT, J. Global evaluation of *Musa* germplasm for resistance to *Fusarium* wilt, *Mycosphaerella* leaf spot diseases and nematodes. **INIBAP Technical Guidelines**, Montpellier, v.7. p. 27- 62, 2003.
- CARDOSO, E. B.; LUQUINE, L. S.; SILVA, H. S. Aplicação conjunta de rizobactérias e bactérias endofíticas para o biocontrole do *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. In: JORNADA CIENTÍFICA, 6., 2012, Cruz das Almas. **Anais...** Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e fruticultura, 2006.

CASTRO, N. R. *et al.* Ocorrência, métodos de inoculação e agressividade de *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense em Heliconia spp. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 34, n. 02, p. 127-130, 2008.

FISCHER, I. H. *et al.* Reação de maracujazeiro-amarelo ao complexo fusariose-nematoide de galha. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 32, n. 2, p. 223-227, 2010.

FREITAS, J. R.; GERMIDA, J. J. Growth promotion of winter wheat by fluorescent pseudomonads under growth chamber conditions. **Soil Biology and Biochemistry**, [s.l.], v. 24, p. 1127-1135, 1992.

FREITAS, L. G. Rizobactérias versus nematoides. In: REUNIÃO DE CONTROLE BIOLÓGICO DE FITOPATÓGENOS, 2001, Bento Gonçalves. **Anais...** Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2001. p. 25-35.

FREITAS, S. S.; DE MELO, A. M. T.; DONZELI, V. P. Promoção de crescimento de alface por rizobactérias. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa-MG, v. 27, p. 61-70, 2003.

GEORGE, K. J. *et al.* Endophytic mycoflora of inner bark of *Azadirachta indica* A. Juss. **Current science**, Bangalore, v. 88, n. 2, p. 25, 2005.

GOMES, A. A. M. *et al.* Germinação de *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense na presença diferentes componentes de nim (*Azadiracta indica* A. Juss. In: FÓRUM DE GESTÃO PESQUISA ENSINO E EXTENSÃO DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MONTES CLAROS, 3., 2009, Montes Claros. **Anais ...** Montes Claros: UNIMONTES, 2009. Disponível em: <http://www.fepeg.unimontes.br/index.php/fepeg/fepeg2009>. Acesso em: 22 fev. 2013.

GLICK, B. R.; BASHAN, Y. Genetic manipulation of plant growth-promoting bacteria to enhance biocontrol of phytopathogens. **Biotechnology Advances**, [s.l.], v. 15, n. 2, p. 353-378, 1997.

JAVED, N. *et al.* The potential of combining *Pasteuria penetrans* and neem (*Azadirachta indica*) formulations as a management system for root-knot nematodes on tomato. **European Journal of Plant Pathology**. Dordrecht, v. 120, n. 120, p. 53-60, 2008.

JONATHAN, E. I. *et al.* Biological control of *Meloidogyne incognita* on tomato and banana with rhizobacteria, actinomycetes and *Pasteuria penetrans*. **Nematropica**, Piracicaba, v. 30, p. 231-240, 2000.

JONATHAN, E. I. *et al.* Bioefficacy of *Pseudomonas fluorescens* on *Meloidogyne incognita* in banana. **Nematologia Mediterranea**, Bari, v. 34, p. 19-25, 2006.

KAMEL M.Z. *et al.* Optimization of microbial biomass production as biocontrol agent against root knot nematode on faba plants. **Journal of American Science**, Washington, v. 6, p. 1122-1132, 2010.

MARIANO, R. L. R.; KLOEPPER, J. W. Método alternativo de biocontrole: resistência sistêmica induzida por rizobactérias. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 8, p. 121-137, 2000.

MEDEIROS, J.E. *et al.* Inconsistency of the biological control of *Meloidogyne incognita* race 2 in melon by endophytic and rhizosphere bacteria. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 319-324, 2009.

MENDOZA, A. R.; SIKORA, R. A. Biological control of *Radopholus similis* in banana by combined application of the mutualistic endophyte *Fusarium oxysporum* strain 162, the egg pathogen *Paecilomyces lilacinus* strain 251 and the antagonistic bacteria *Bacillus firmus*. **BioControl**, [s.l.], v. 54, p. 263-272, 2009.

MOURA, R. M.; ROSA, R. C. T.; PEDROSA, E. M. R. Estudo da interação *Meloidogyne-Fusarium* em tomateiro portador do gene MI em condições de temperaturas altas no solo. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 25, n. 2, p. 229-233, 2001.

NAJI, IHSSAN; ABU-GHARBIEH, W. Effect of *Meloidogyne javanica* and *M. incognita* on resistance of muskmelon cultivars to *Fusarium* wilt. **Phytopathologia Mediterranea**, Firenze, v. 43, p. 360-368, 2004.

NAVES, R. L.; CAMPOS, V.P.; SOUZA, R. M. Filtrados de culturas bacterianas endofíticas na motilidade, mortalidade e eclosão de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne javanica*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, p. 384-388, 2004.

ROCHA, L. S. **Efeito da aplicação de rizobactérias sobre *meloidogyne javanica* e mal-do-panamá em bananeira Prata-Anã**. 2010. 48 p. Monografia (Trabalho de conclusão de curso – Agronomia). Universidade Estadual de Montes Claros, Janaúba, 2010.

RODRÍGUEZ-ROMERO, A. S. *et al.* Growth promotion and biological control of root-knot nematodes in micropropagated banana during the nursery stage by treatment with specific bacterial strains. **Annals of Applied Biology**, [s.l.], v. 152, p. 41-48, 2007.

SAMPAIO, D. B. *et al.* Colonização micorrízica arbuscular e tolerância ao mal-do-Panamá em mudas de banana-maçã. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 43, n. 3, p. 462-469, 2012.

SIDDIQI, Z. A.; BAGHEL, A. G.; AKHTAR, E. M. S. Biocontrol of *Meloidogyne javanica* by *Rhizobium* and plant growth-promoting rhizobacteria on lentil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 23, p. 435-441, 2007.

SILVA, G. S.; PEREIRA, A. L. Efeito da incorporação de folhas de nim ao solo sobre o complexo *Fusarium x Meloidogyne* em quiabeiro. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.34, n.4, p.368-370, 2008.

SILVA, L. S. **Efeito de extratos foliares de Nim em *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense e na intensidade do Mal-do-Panamá em mudas de bananeira cv. Maçã**. 2010. 54 p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal no Semiárido) – Universidade Estadual de Montes Claros, Janaúba, MG, 2010.

SMITH, M. *et al.* Micropropagated bananas and *fusarium wilt*: What is the future for micropropagated planting material? In: **Tissue Culture**: Towards the next century. Arinidale, NSW: University of England, 1997, p. 133-140.

SUN, J. B. *et al.* Isolation and characterization of antagonistic bacteria against *Fusarium* wilt and induction of defense related enzymes in banana. **African Journal of Microbiology Research, Nairobi**, v. 5, p. 509-515. 2011.

TENGURIA R. K.; KHAN, F. N. Distribution of endophytic fungi in leaves of *Azadirachta indica* A. JUSS. (Neem) of Panchmarhi biosphere reserve. **Current Botany**, Noida, v. 2, p. 27-29, 2011.

TEREFE, M.; TEFERA, T.; SAKHUJA, P. K. Effect of a formulation of *Bacillus firmus* on root-knot nematode *Meloidogyne incognita* infestation and the growth of tomato plants in the greenhouse and nursery. **Journal of Invertebrate Pathology**, [s.l.], v.100, p. 94-99, 2009.

TING, A. S. Y.; MAH, S.W.; TEE, C. S. Detection of potential volatile inhibitory compounds produced by endobacteria with biocontrol properties towards *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4. **World Journal Microbiol Biotechnol**, v.27,p. 229–235. 2011. Disponível em:
<<http://link.springer.com/article/10.1007/s11274-010-0447-y?no-access=true#page-2>> Acesso em: 10/03/2013.

VIANA, P. A.; PRATES, H. T.; RIBEIRO, E. de A. **Uso do extrato aquoso de Nim para o controle de *Spodoptera frugiperda* na cultura do milho**. Sete Lagos: Embrapa Milho e sorgo, 2006. 5 p. (Circular Técnica 88)

VONDERWELL, J. D.; ENEBAK, S. A.; SAMUELSON, L. J. Influence of two growth promoting rhizobacteria on loblolly pine root respiration and AIA activity. **Forest Science**, Bethesda, v. 47, p. 197-202, 2001.

ZEM, A. C.; BARREIRA, J. G.; TEIXEIRA, L. S. **Nematoides associados a bananeiras do estado do Ceará**, 1980. Disponível em:
<[http://docentes.esalq.usp.br/sbn/nbonline/ol %2004u/119-126 %20pb.pdf](http://docentes.esalq.usp.br/sbn/nbonline/ol%2004u/119-126%20pb.pdf)>
Acesso em: 20/12/12.

ZEM, A. C.; VENTURA, J. A; NOBREGA, A. C. Nematoides associados a diferentes cultivares de bananeira em Viana, ES. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 28, p. 11-22, 1984.

ZHANG, S.; REDDY, M.S. Lack of induced systemic resistance in peanut to late leaf spot disease by plant growth- promoting rhizobacteria and chemical elicitors. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 85, p. 879-884, 2001.