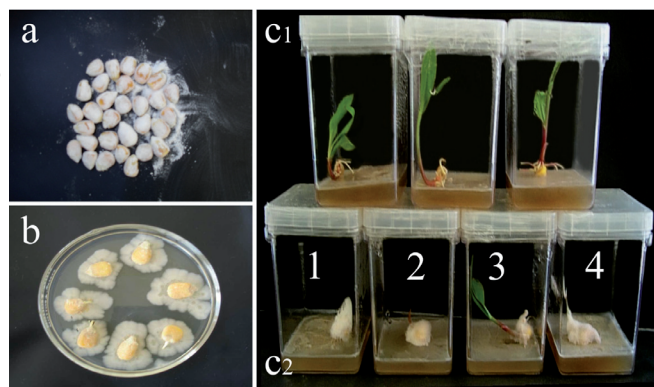


## Avaliação do Potencial Antagonista de Bactéria Endofítica sobre Fungos de Grãos de Milho

José Edson Fontes Figueiredo<sup>1</sup>  
Marta Aparecida Teixeira<sup>2</sup>  
Wellington Bressan<sup>3</sup>  
Nicésio Filadelfo Jansen Pinto<sup>4</sup>  
Carlos Roberto Casela<sup>5</sup>  
Ari Corrêa Junior<sup>6</sup>  
Pablo Lopes Quintão<sup>7</sup>

Foto: José Edson Fontes Figueiredo



A contaminação de grãos por micotoxinas acarreta sérios problemas para a saúde humana e animal, podendo ocorrer tanto no período de pré-colheita (fungos de campo) como durante o armazenamento sob condições inadequadas (fungos de armazenamento) (MANUAL..., 2004). Entre os principais gêneros de fungos do campo destacam-se *Cephalosporium*, *Fusarium*, *Gibberella*, *Nigrospora*, *Helminthosporium*, *Alternaria* e *Cladosporium*. De modo geral, esses fungos não se desenvolvem durante o armazenamento, exceto em milho armazenado com alto teor de umidade (HAGSTRUM; FLINN, 1992; MILLER, 1995; SINHA; SINHA, 1991). Os fungos de armazenamento *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* e *Mucor* spp são encontrados em armazéns, moinhos, silos, moegas, elevadores, equipamentos e lugares onde são armazenados, manuseados e processados produtos agrícolas (MÁRCIA; LÁZZARI, 1998).

Micotoxinas e resíduos de substâncias utilizadas para o controle de fungos em grãos e derivados utilizados na alimentação constituem graves ameaças à saúde humana e animal (SILVEIRA, 2009). Métodos alternativos de controle fúngico têm sido desenvolvidos para minimizar esses riscos. Destacam-se o uso de extratos vegetais no tratamento de sementes (COUTINHO et al., 1999) e de microrganismos antagonistas para controle de fungos fitopatogênicos (STROBEL, 2006). O controle biológico de fungos apresenta uma série de vantagens em relação ao controle químico, pois não contamina e não causa desequilíbrio ambiental e nem deixa resíduos nos alimentos, além de ser uma alternativa barata e de fácil aplicação (SOARES, 2006).

<sup>1</sup>Biólogo, Doutor em Bioquímica e Imunologia, Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, jeff@cnpms.embrapa.br<sup>2</sup>Técnica farmácia, Centro de Formação e Aperfeiçoamento Profissional - CEFAP, martat910@yahoo.com.br<sup>3</sup>Eng.-Agrônomo, Doutor em Fitotecnia, Pesquisador aposentado da Embrapa Milho e Sorgo.<sup>4</sup>Eng.-Agrônomo, Doutor em Fitopatologia, Pesquisador aposentado da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG.<sup>5</sup>Eng.-Agrônomo, Doutor em Fitopatologia, Pesquisador aposentado da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, caselacarlos@hotmail.com<sup>6</sup>Bacharel em Ciências Biológicas, Doutor em <sup>7</sup>Phytopathology, Professor da Universidade Federal de Minas Gerais.<sup>7</sup>Biólogo, Mestre em Microbiologia. Universidade Federal de Minas Gerais.

Embora os efeitos antagonistas de microrganismos endofíticos sobre fungos fitopatogênicos, in vitro, sejam bastante conhecidos, seu emprego in situ ainda é muito limitado (BACON et al., 2001; PLEBAN et al., 1997). Metabólitos produzidos por microrganismos endofíticos inibem ou matam uma variedade de agentes causadores de doenças e por isso representam importante e inexplorada fonte de agentes para biocontrole de doenças e pragas de plantas (ADHIKARI et al., 2001; BENHAMOU et al., 2000; GUNATILAKA, 2006; KRECHEL et al., 2002; SCHULZ; BOYLE, 2005; SESSITSCH et al., 2004; STROBEL, 2006; STURZ; NOWAK, 2000; REITER et al., 2002). Diferentes linhagens de bactérias endofíticas do gênero *Pseudomonas* sp. (KLOEPPER et al., 1989) e as espécies *Curtobacterium luteum* e *Pantoea agglomerans* (STURZ et al., 1999) inibem o crescimento de *Erwinia carotovora* (INIGUEZ et al., 2005; REITER et al., 2002). *Pseudomonas* isoladas da rizosfera e da endorriza do milho foram efetivas em controlar doenças fúngicas de plantas (BERG et al., 2005). *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas tolaasii*, *Pseudomonas veronii* e *Sphingomonas trueperi* isoladas de arroz inibiram o crescimento in vitro de *Achlya klebsiana* e *Pythium spinosum*, que são os principais patógenos em plântulas do arroz. Essas bactérias também promoveram o crescimento de plantas (ZINNIEL et al., 2002). Outra espécie, *Bacillus cereus*, isolada de *Sinapis*, excreta quitinase e sua aplicação no solo protegeu de forma significativa plântulas de algodão contra doenças causadas por *Rhizoctonia solani* (PLEBAN et al., 1997).

A microbiolização de semente tem sido realizada para controle de vários patógenos e também como promotora de germinação e crescimento de plantas de milho (CHANG; KOMMEDAHL, 1968; CALLAN et al., 1990, 1991; LUZ, 1996a,b, 1997a,b, 2001). *Paenibacillus macerans* (Embr. 144) é um bioprotetor isolado no Brasil e apresenta um amplo espectro de ação contra fungos de cereais que são transmitidos pelas sementes e pelo solo (LUZ, 1996a,b, 2001, 1997a,b). A microbiolização de sementes de milho empregando a bactéria endofítica *Bacillus subtilis* foi capaz de reduzir os níveis de micotoxinas acumuladas nos grãos por *Fusarium moniliforme* (BACON et al., 2001) e impediu o crescimento de *Cryphonectria parasitica* em avelã (WILHELM et al., 1997). Estudos in vitro demonstraram a atividade antagonista da bactéria

endofítica *Bacillus subtilis*, CNPMS-22, contra fungos causadores de doenças em milho e sorgo (*Acremonium striticum*, *Fusarium verticillioides*, *Aspergillus* spp, *Exserohilum turcicum*, *Colletotrichum graminicola* e *Colletotrichum sublineolum*) (FIGUEIREDO et al., dados não publicados). A integração de métodos de proteção de semente de milho (*Zea mays*) poderá reduzir consideravelmente o uso de pesticidas nessa cultura, melhorando a eficiência de controle e diminuindo a poluição do ambiente (LUZ, 2003).

No presente estudo, foram utilizadas sementes de milho da variedade BR 106, coletadas no Campo Experimental da Embrapa Milho e Sorgo. As sementes não receberam qualquer tipo de tratamento antifúngico e foram incubadas durante 1 minuto em cultura líquida da bactéria CNPMS-22. Em seguida o excesso de meio de cultura foi descartado e as sementes foram misturadas em amido e sacarose a 50% e secas por 24 h em estufa a 30 °C (microbiolização). Sementes empregadas como controle foram submetidas ao mesmo processo, exceto pela ausência da bactéria CNPMS-22 no meio LB líquido. Em seguida, as sementes foram incubadas individualmente em frascos plásticos apropriados para a cultura de plântulas ou em grupos de 5-10 sementes por placas de Petri, contendo meio LB ou BDA semisólido. Foram realizadas observações diárias durante 30 dias.

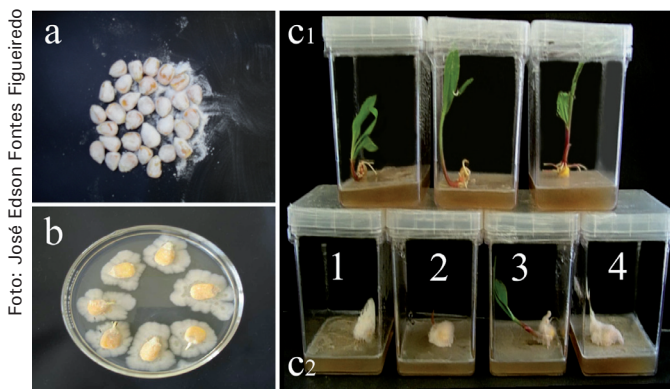
No experimento de laboratório, cada tratamento foi constituído de 1000 sementes microbiolizadas com a bactéria CNPMS-22, distribuídas individualmente em frascos plásticos contendo meio LB semisólido, repetido quatro vezes. Cinco mil sementes foram utilizadas para controle (sem microbiolização). Os frascos com sementes foram colocados em bancadas de laboratório com ampla incidência de luz natural e temperatura ambiente, no verão de 2006. Foram realizadas três medições diárias da temperatura durante todo o período em que foi realizado o experimento. A média de temperatura foi de 30 °C. O arranjo experimental foi o de blocos inteiramente casualizados. A presença dos fungos patogênicos foi determinada entre 5-30 dias após a inoculação com CNPMS-22. Os dados foram expressos em percentagem referente à incidência de cada patógeno nas sementes. A identificação dos fungos foi realizada no Laboratório de Microbiologia,

Departamento de Microbiologia, UFMG e no Laboratório de Fitopatologia de Sementes e Grãos (LAPASEMG) da Embrapa Milho e Sorgo.

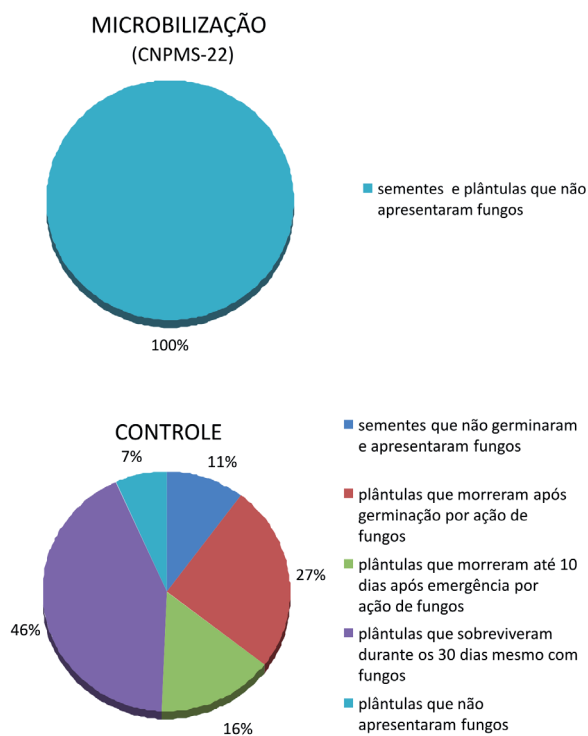
## Resultados e Discussão

Preliminarmente, foi avaliada a capacidade de germinação de 100 sementes coletadas no campo, em papel umedecido, e mantidas em estufa a 30 °C durante 5 dias. O poder de germinação foi estimado em 96%. Os valores para germinação das sementes utilizadas nos experimentos foi de 95% para sementes microbiolizadas e 92% para as sementes incubadas com meio LB. Esses valores indicaram um efeito negativo de componentes presentes na formulação do meio de cultura sobre a germinação de sementes.

Em todos os frascos contendo sementes de milho inoculadas com CNPMS-22 não houve crescimento de fungo (100%), enquanto nos frascos contendo as sementes utilizadas como controle ocorreu o desenvolvimento de pelo menos um tipo de fungo em 93% das sementes (Figura 1, Tabela 1). O efeito da presença de fungos sobre o desenvolvimento das plântulas foi variável (Figura 1). Em alguns casos, o crescimento do fungo foi muito rápido, impedindo a germinação das sementes (11%). Algumas plântulas morreram logo após a germinação (27%), enquanto em outras situações as plântulas morreram 10 dias após a emergência (16%) ou permaneceram vivas durante todo o período em que foi realizado o experimento, mesmo na presença de fungo (46%) (Gráfico 1). A frequência de ocorrência de fungos foi registrada na tabela 1. Fungos que impediram a germinação ou emergência de plântulas foram identificados como pertencentes aos gêneros *Fusarium*, *Diplodia* (*Stenocarpela*), *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. Os fungos *Fusarium moniliformis* e *Diplodia maydis* foram os mais frequentes (23% e 19%, respectivamente) e *Fusarium graminearum* e *Penicillium* spp., menos frequentes (8% e 3%, respectivamente). Além dos fungos identificados, foram observados 48 morfotipos diferentes, cuja identidade não pode ser estabelecida com base na análise morfológica (observações sob lupa, pelo tipo de colônia, ou forma dos esporos, entre outros).



**Figura 1.** Germinação de sementes de milho da variedade BR 106 microbiolizadas com a bactéria CNPMS-22. (a) Sementes de milho incubadas por 1 minuto em cultura líquida da bactéria CNPMS-22, misturadas com amido e sacarose a 50% e secas em estufa em temperatura de 30 °C por 24 h; (b) germinação, em placa de petri, de sementes de milho inoculadas com a bactéria CNPMS-22; (c1) plântulas de milho originadas de sementes microbiolizadas com CNPMS-22; (c2) sementes-controle (sem microbiolização), mostrando os efeitos da presença de fungos de sementes sobre plântulas. Os números indicam plântulas mortas (1 e 4) e plântulas vivas (2 e 3) em estádios diferentes de desenvolvimento.



**Gráfico 1.** Efeito antifúngico do isolado CNPMS-22 em sementes de milho.

**Tabela 1.** Efeito da microbiolização de sementes da variedade de milho BR 106 com a bactéria CNPMS-22, para controle de fungos patogênicos.

Tratamento	Índice de germinação Antes da microbiolização	Índice de germinação Após microbiolização	Fungos identificados em sementes e plântulas de milho (%)*							
			Ausência de fungo	<i>Diplodia maydis</i>	<i>Fusarium moniliformis</i>	<i>Fusarium graminearum</i>	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>Penicillium</i> spp.	Morfotipos	
microbiolização	96 %	95 %	100	0	0	0	0	0	0	0
Controle	96 %**	92 %**	7	19	23	8	12	3	28	28

\* Os valores das porcentagens foram ajustados para menos (inferior a 0,5%) ou para mais (igual ou superior a 0,5%).

\*\* A diferença não é significativa

Atualmente estão sendo desenvolvidos métodos para inoculação com CNPMS-22 visando a proteção de sementes e plântulas de milho e sorgo. Também serão iniciados testes em casa de vegetação e no campo para utilização de CNPMS-22 em aplicações por aspersão visando testar a atividade antagonista in situ sobre fungos fitopatogênicos da cultura do milho e do sorgo. Etiquetas de DNA para CNPMS-22 foram desenvolvidas visando solicitação de registro e proteção da linhagem.

## Conclusões

Os resultados do presente estudo indicaram a possibilidade de utilização da bactéria CNPMS-22 em processo de microbiolização de sementes e/ou grãos de milho para prevenir o desenvolvimento de fungos durante o armazenamento.

## Agradecimentos

Ao Assistente de Operações, Osni Alves da Silva, responsável pelo Laboratório de Fitopatologia de Sementes da Embrapa Milho e Sorgo

## Referências

- ADHIKARI, T. B.; JOSEPH, C. M.; YANG, G.; PHILLIPS, D. A.; NELSON, L. M. Evaluation of bacteria isolated from rice for plant growth promotion and biological control of seedling disease of rice. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 47, n. 10, p. 916-924, 2001.
- BACON, C. W.; YATES, I. E.; HINTON D. M.; MEREDITH, F. Biological control of *Fusarium moniliforme* in maize. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, p. 325-332, 2001. Suplemento 2.
- BENHAMOU, N.; GAGNE, S.; LE QUERE, D.; DEHBI, L. Bacterial-mediated induced resistance in cucumber: beneficial effect of the endophytic bacterium *Serratia plymuthica*, *Serratia plymuthica* on the protection against infection by *Pythium ultimum*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 90, p. 45-56, 2000.
- BERG, G.; KRECHEL, A.; DITZ, M.; SIKORA, R. A.; ULRICH, A.; HALLMANN, J. Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities



differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 51, n. 2, p. 215-229, 2005.

CALLAN, N. W.; MATHRE, D. E.; MILLER, J. B. Bio-priming seed treatment for biological control of *Pythium ultimum* preemergence damping-off in sh2 sweet corn. **Plant Disease**, St. Paul, v. 74, p. 368-372, 1990.

CALLAN, N. W.; MATHRE, D. E. ; MILLER, J. B. Field performance of sweet corn seed bio-primed and coated with *Pseudomonas fluorescens* AB254. **HortScience**, Alexandria, v. 26, p. 1163-1169, 1991.

CHANG, I.; KOMMEDAHL, T. Biological control of seedling blight of corn by coating kernels with antagonistic microorganisms. **Phytopathology**, St. Paul, v. 58, p. 1395-1401, 1968.

COUTINHO, W. M.; ARAÚJO, E.; MAGALHÃES, F. H. L. Efeitos de extratos de plantas anacardiáceas e dos fungicidas químicos benomyl e captan sobre a micoflora e qualidade fisiológica de sementes de feijoeiro (*phaseolus vulgaris* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 23, n. 3, p. 560-568, 1999.

GUNATILAKA, A. A. L. Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 69, p. 509-526, 2006.

HAGSTRUM, D. W.; FLINN, P. W. Integrated pest management of stored-grain insects. In: SAUER, D. B. (Ed.). **Storage of cereal grains and their products**. St. Paul: American Association of Cereal Chemists, 1992. p. 535-562.

INIGUEZ, A. L.; DONG, Y.; CARTER, H. D.; AHMER, B. M.; STONE, J. M.; TRIPLETT, E. D. W. Regulation of enteric endophytic bacterial colonization by plant defenses. **Molecular Plant Microbe Interactions**, St. Paul, v. 18, n. 2, p. 169-178, 2005.

KLOPPER, J. W.; LIFSHITZ, R.; ZABLOTOWICZ, R. M. Free-living bacteria for enhancing crop productivity. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 7, p. 39-43, 1989.

KRECHEL, A.; FAUPEL, A.; HALLMANN, J.; ULRICH, A.; BERG, G. Potato-associated bacteria and their antagonistic potential towards plant-pathogenic fungi and the plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 48, n. 9, p. 772-786, 2002.

LUZ, W. C. Combinação dos tratamentos biológico e químico de semente de milho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 1, p. 93-95, 2003.

LUZ, W. C. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas e bioproteção. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 4, p. 1-47, 1996a.

LUZ, W. C. Efeito de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas de trigo e de milho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 21, p. 434, 1996b.

LUZ, W. C. Evaluation of seed treatment fungicides for emergence and yield of corn. **Fungicide and Nematicide Tests**, Ithaca, v. 52, p. 303, 1997a.

LUZ, W. C. Effect of seed treatment on corn pathogen control, stand, and yield. **Fungicide and Nematicide Tests**, Ithaca, v. 52, p. 303, 1997b.

LUZ, W. C. Efeito de bioprotetores em patógenos de sementes e na emergência e rendimento de grãos de milho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, p. 16-20, 2001a.

MÁRCIA, B. A.; LÁZZARI, F. A. Monitoramento de fungos em milho em grão, grits e fubá. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 18, n. 4, p. 363-367, 1998.

MILLER, J. D. Fungi and mycotoxins in grain: implications for stored product research. **Journal of Stored Products Research**, Oxford, v. 31, n. 1, p. 1-16, 1995.

MANUAL de segurança e qualidade para a cultura do milho. Brasília, DF: CampoPAS, 2004. 77 p. (Qualidade e Segurança dos Alimentos).

PLEBAN, S.; CHERNIN, L.; CHET, I. Chitinolytic activity of an endophytic strain of *Bacillus cereus*. **Letters of Applied Microbiology**, v. 25, n. 4, p. 284-288, 1997.

REITER, B.; PFEIFER, U.; SCHWAB, H.; SESSITSCH, A. Response of endophytic bacterial communities in potato plants to infection with *Erwinia carotovora* subsp. *Atroseptica*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 5, p. 2261-2268, 2002.

SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycology Research**, v. 109, n. 6, p. 661-686, 2005.

SESSITSCH, A.; REITER, B.; BERG, G. Endophytic bacterial communities of field-grown potato plants and their plant-growth-promoting and antagonistic abilities. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 50, n. 4, p. 239-249, 2004.

SILVEIRA, A. M. **Avaliação de peitos e fígados de frango de corte com lesões suspeitas de aflatoxicose**. 2009. 43 p. Monografia (Graduação) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina Veterinária, Porto Alegre, 2009.

SINHA, K. K.; SINHA, A. K. Effect of *Sitophilus oryzae* infestation on *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin contamination in stored wheat. **Journal of Stored Products Research**, Oxford, v. 27, n. 1, p. 65-68, 1991.

SOARES, P. L. M. **Estudo do controle biológico de fitonematóides com fungos nematófagos**. 2006. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2006.

STROBEL, G. A. Harnessing endophytes for industrial microbiology. **Current Opinion in Microbiology**, Oxford, v. 9, n. 3, p. 240-244, 2006.

STURZ, A. V.; CHRISTIE, B. R.; MATHESON, B. G.; ARSENAULT, W. J.; BUCHANAN, N. A. Endophytic bacterial communities in the periderm of potato tubers and their potential to improve resistance to soil-borne plant pathogens. **Plant Pathology**, London, v. 48, p. 360-369, 1999.

STURZ, A. V.; NOWAK, J. Endophytic communities of rhizobacteria and the strategies required to create yield enhancing associations with crops. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 15, p. 183-190, 2000.

WILHELM, E.; ARTHOFER, W.; SCHAFLEITNER, R. *Bacillus subtilis*, an endophyte of chestnut (*Castanea sativa*), as antagonist against chestnut blight (*Cryphonectria parasitica*). In: CASSELLS, A. C. (Ed.). **Pathogen and microbial contamination management in micropropagation**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1997. p. 331-337.

ZINNIEL, D. K.; LAMBRECHT, P.; HARRIS, N. B.; FENG, Z.; KUCZMARSKI, D.; HIGLEY, P.; ISHIMARU, C. A.; ARUNAKUMARI, A.; BARLETTA, R. G.; VIDAVER, A.; K. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 5, p. 2198-2208, 2002.

#### Comunicado Técnico, 187

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na: **Embrapa Milho e Sorgo**  
**Endereço:** Rod. MG 424 km 45 Caixa Postal 151  
 CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG  
**Fone:** (31) 3027 1100  
**Fax:** (31) 3027 1188  
**E-mail:** sac@cnpmis.embrapa.br  
 1ª edição  
 1ª impressão (2010): on line

#### Comitê de Publicações

**Presidente:** Antônio Carlos de Oliveira.  
**Secretário-Executivo:** Elena Charlotte Landau.  
**Membros:** Flávio Dessaune Tardin, Eliane Aparecida Gomes, Paulo Afonso Viana, João Herbert Moreira Viana, Guilherme Ferreira Viana e Rosângela Lacerda de Castro.

#### Expediente

**Supervisão editorial:** Adriana Noce.  
**Revisão de texto:** Antonio Cláudio da Silva Barros.  
**Normalização bibliográfica:** Rosângela Lacerda de Castro.  
**Tratamento das ilustrações:** Tânia Mara A. Barbosa.  
**Editoração eletrônica:** Tânia Mara A. Barbosa.